

EINSATZ DER NEGATIVEN CHEMISCHEN IONISATIONS-MASSENSPEKTROMETRIE MIT SELEKTIVEN REAKTANTGASMISCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON DIETHYLSTILBESTROL

vorgelegt von
Lebensmittelchemiker
Hans-Joachim Hübschmann
aus Mainz

vom Fachbereich 13
Lebensmitteltechnologie und Biotechnologie
der Technischen Universität Berlin
zur Verleihung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:
Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Friedrich Meuser
Berichter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Stan
Prof. Dr.-Ing. Klaus Rubach
Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juni 1985

Berlin 1985
D 83

Abstract

Hübschmann, Hans-Joachim:

EINSATZ DER NEGATIVEN CHEMISCHEN IONISATIONS-MASSENSPEKTROMETRIE MIT SELEKTIVEN REAKTANTGAS MISCHUNGEN ZUM NACHWEIS YDN DIETHYLSTILBESTROL

Die in der Masttierhaltung eingesetzten Anabolika zielen auf eine Steigerung der Mastleistung ab. Diethylstilböstrol (DES) steht im Verdacht, trotz aller Maßnahmen vielfach in der Tiermast angewendet zu werden. Die Substanz ist sehr preiswert, frei erhältlich und führt zu einer starken Gewichtszunahme der behandelten Tiere. DES wird heute als cancerogen eingestuft und steht deshalb im Mittelpunkt des analytischen Interesses. Im Gegensatz zur Kontrolle vor Ort im Mastbetrieb oder bei der Schlachtung, wo eine Probennahme von Kot und Urin bzw. Leber- und Nierengewebe eine leichtere Nachweisführung wegen der darin enthaltenen erhöhten Wirkstoffmengen ermöglicht, ist für eine wirksame Überwachung von Muskelfleischpartien und Fleischprodukten auf anabole Wirkstoffe wegen der vorliegenden Spurenkonzentrationen der Einsatz hochsensitiver Methoden erforderlich. Zum Nachweis der Anabolika werden deshalb häufig Proteinbindungsmethoden herangezogen, die die Spezifität und Sensitivität von Antikörper-Präparationen ausnutzen (Immunoassays) oder bei ebenso hoher Empfindlichkeit Gruppenspezifität aufweisen (Rezeptortests).

In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse aus dem Radioimmunassay (RIA) und dem Östrogenrezeptortest (ÖRT) kritisch diskutiert. Trotz intensiver Aufreinigung von Fleischextrakten durch Gelpermeation und HPLC können Matrixeinflüsse nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der methodisch bedingten indirekten Erfassung des Anabolikums kann keine positive Substanzidentifizierung zur Bestätigung erfolgen. Zur Vermeidung fehlerhafter Resultate müssen positive Befunde aus den zu Screening-Zwecken eingesetzten Proteinbindungsmethoden durch unabhängige Verfahren abgesichert werden. Als einzige Methode mit vergleichbarer Empfindlichkeit kann hierzu die Massenspektrometrie eingesetzt werden. Erstmals wird in diesem Zusammenhang der Einsatz selektiver Reaktantgase zur Analyse stark matrixhaltiger Fleischextrakte auf DES untersucht.

Durch Anwendung der negativen Chemischen Ionisation (NCI) wird die Ausbildung eines stabilen Anions des DES bei gleichzeitiger Transparenz eines Großteils der biologischen Matrix ausgenutzt. Die Probenzuführung erfolgt mit einer 'extended probe' modifizierten Schubstange.

Mehr als 20 Reaktantgase werden im Hinblick auf ihre Verwendbarkeit untersucht. Die Erzeugung geeigneter Gasgemische wurde in einem speziell für diesen Zweck konstruierten Mischsystem durchgeführt. Die hieraus hervorgegangenen Reaktantgasgemische HCN/H₂, MeOH/N₂O/H₂, N₂O/He/H₂ und CF₄/H₂ mit den Reaktantionen Cyanid, Methylat, Hydroxyl und Fluorid werden mit Testsubstanzen, die den Bereich der Gasphasenazidität vom stark sauren bis stark basischen überstreichen, charakterisiert.

Zum Nachweis von DES wird das Hydroxyl-Ionen generierende Gemisch ausgewählt und dessen Einsatz in Verbindung mit gering aufgearbeiteten Fleischextrakten demonstriert. Es wird eine Nachweisgrenze von 1 pg DES erzielt.

Für den Nachweis von DES steht damit ein umfassender Analysenverbund zur Verfügung. Neben den zu Screening und Einzelbestimmung einsetzbaren Methoden ÖRT und RIA kann durch die NCI-Massenspektrometrie mit 'extended probe'-Technik eine rasche Bestätigung von positiven Resultaten aus jeder Stufe des 'clean up' heraus erfolgen.

Abstract

Hübschmann, Hans-Joachim:

USE OF NEGATIVE CHEMICAL IONIZATION MASS SPECTROMETRY WITH SELECTIVE REACTANT GAS MIXTURES FOR THE DETECTION OF YDN DIETHYLSTILBESTROL.

Anabolic steroids used in fattening livestock are aimed at increasing fattening performance. Diethylstilbestrol (DES) is suspected to be widely used in animal fattening despite all measures. The substance is very cheap, freely available and leads to a strong weight gain of the treated animals. DES is now classified as carcinogenic and is therefore the focus of analytical interest. In contrast to on-site monitoring at the fattening plant or at slaughter, where sampling of feces and urine or liver and kidney tissue allows easier detection because of the increased amounts of active ingredient contained therein, effective monitoring of muscle meat lots and meat products for anabolic agents requires the use of highly sensitive methods because of the trace concentrations present. Therefore, protein binding methods that exploit the specificity and sensitivity of antibody preparations (immunoassays) or exhibit group specificity with equally high sensitivity (receptor assays) are often used to detect anabolic steroids.

In the present work, results from radioimmunoassay (RIA) and estrogen receptor test (ÖRT) are critically discussed. Despite intensive purification of meat extracts by gel permeation and HPLC, matrix interferences cannot be excluded. Due to the methodological indirect detection of the anabolic substance, no positive substance identification can be performed for confirmation. To avoid erroneous results, positive findings from protein binding methods used for screening purposes must be validated by independent procedures. Mass spectrometry is the only method with comparable sensitivity that can be used for this purpose. In this context, the use of selective reactant gases for the analysis of meat extracts with a high matrix content for DES is investigated for the first time.

By applying negative chemical ionization (NCI), the formation of a stable anion of DES is exploited with simultaneous transparency of a large part of the biological matrix. Sample introduction is accomplished with an 'extended probe' modified push rod.

More than 20 reactant gases are investigated with respect to their usability. The resulting reactant gas mixtures HCN/H₂, MeOH/N₂O/H₂, N₂O/He/H₂ and CF₄/H₂ with the reactant ions cyanide, methylate, hydroxyl and fluoride are characterized with test substances spanning the range of gas phase acidity from strongly acidic to strongly basic.

For the detection of DES, the hydroxyl ion-generating mixture is selected, and its use is demonstrated in conjunction with low-processed meat extracts. A detection limit of 1 pg DES is obtained.

A comprehensive set of analyses is thus available for the detection of DES. In addition to the ÖRT and RIA methods, which can be used for screening and individual determination, the NCI mass spectrometry with 'extended probe' technique can be used for rapid confirmation of positive results from any stage of the 'clean up'.

1. Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1980 bis September 1983 am Institut für Lebensmittelchemie im Fachbereich 13 der Technischen Universität Berlin angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Stan danken, daß er mir das Thema zur selbständigen Bearbeitung überließ und mir mit regem Interesse und zahlreichen Diskussionen beratend zur Seite stand.

Für ihre ungeteilte Unterstützung bei der zeitintensiven Wartung und Instandhaltung des Massenspektrometers und des Datensystems danke ich Herrn Gerd Kellner und Herrn Thomas Otto. Herrn Ulrich Wawzon danke ich für die Aufarbeitung des Probenmaterials und ebenso allen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie, die durch ihre freundliche Hilfe diese Arbeit unterstützt haben.

Gefördert wurde das Vorhaben vom Bundesgesundheitsamt Berlin und der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Nicht zuletzt gilt meine besondere Anerkennung meiner Familie, die mit Geduld und Verständnis das Entstehen der Arbeit begleitet hat.

Hans-Joachim Hübschmann

Weyhe, im März 1985

2. Inhaltsverzeichnis

1.	Vorwort	4
2.	Inhaltsverzeichnis	5
3.	Zusammenfassung.....	8
4.	Liste der verwendeten Abkürzungen	9
5.	Aktuelle Situation der Anabolika-Überwachung	11
5.1.	Rückstandssituation	11
5.2.	Methodenübersicht.....	14
5.2.1.	Histologische und biologische Verfahren.....	14
5.2.2.	Biochemische Verfahren	14
5.2.3.	Chemische und physikochemische Verfahren	16
6.	Massenspektrometrie	17
6.1.	Elektronenstoßionisation (electron impact, EI).....	17
6.2.	Chemische Ionisation	19
6.2.1.	Anwendungsbereich.....	19
6.2.2.	Prozesse im Reaktantgasplasma	20
6.2.2.1.	Ladungsübertragung (Charge Transfer)	21
6.2.2.2.	Protonenübertragung (Proton Transfer).....	21
6.2.2.3.	Hydrid-übertragung.....	25
6.2.2.4.	Ionenanlagerung (reagent ion capture)	25
6.2.3.	Elektronen-Molekül Reaktionen.....	26
6.2.3.1.	Erzeugung von thermischen Elektronen	26
6.2.3.2.	Elektronen-Einfang Reaktionen (electron capture)	27
6.2.3.3.	Resonanzeinfang (resonance electron capture)	28
6.2.3.4.	Dissoziativer Resonanzeinfang (dissociative electron capture)	28
6.2.3.5.	Ionenpaar Bildung (ion pair production).....	28
6.2.3.6.	Neutralisierungsprozesse	29
6.3.	NCI in der Rückstandsanalyse.....	29
6.4.	Problemstellung	30
7.	Experimenteller Teil	31
7.1.	Probenmaterial.....	31
7.2.	Aufarbeitung.....	31

7.2.1.	Extraktgewinnung.....	31
7.2.2.	Gelchromatographie	33
7.2.3.	Fraktionierung durch HPLC.....	34
7.3.	Durchführung des Östrogen-Rezeptor Tests.....	37
7.4.	Durchführung des Radioimmunassay	39
7.5.	Massenspektrometrie	42
7.5.1.	Konstruktion des Reaktantgas-Mischsystems.....	42
7.5.2.	Reaktantgase	44
7.5.3.	Extended-Probe Technik	45
7.5.4.	Testsubstanzen.....	47
7.5.5.	Geräte-Parameter	48
8.	Ergebnisse	49
8.1.	Aufarbeitung.....	49
8.1.1.	Extraktion	49
8.1.2.	Gelchromatographie	50
8.1.3.	HPLC.....	51
8.2.	Proteinbindungsmethoden	54
8.3.	Massenspektrometrie	56
8.3.1.	Festproben-Einlaß (solid probe/extended probe)	56
8.3.2.	Reaktantgase	57
8.3.2.1.	Acetonitril.....	58
8.3.2.2.	Chloroform	59
8.3.2.3.	Tetrafluormethan (R 14).....	60
8.3.2.4.	Essigsäure/Essigsäureanhydrid	62
8.3.2.5.	Cyanwasserstoff	63
8.3.2.6.	Methanol	64
8.3.2.7.	Ethanol.....	65
8.3.2.8.	Distickstoffmonoxid im Gemisch mit Helium und Wasserstoff.....	65
8.3.2.9.	Distickstoffmonoxid im Gemisch mit Methan.....	67
8.3.2.10.	Aceton	68
8.3.2.11.	Schwefelhexafluorid.....	70
8.3.2.12.	Ammoniak	70
8.3.3.	Bewertung und Auswahl der Reaktantgase	71
8.3.4.	Ionisierung der Testsubstanzen.....	75

8.3.4.1.	Clonidin.....	75
8.3.4.2.	Xylazin.....	76
8.3.4.3.	Tetradecanol.....	77
8.3.4.4.	Trenbolon	78
8.3.4.5.	Progesteron	78
8.3.4.6.	17 β -Östradiol.....	79
8.3.4.7.	Zeranol.....	80
8.3.4.8.	Stilböstrol	80
8.3.4.9.	Hexöstrol	81
8.3.4.10.	Dienöstrol	82
8.3.4.11.	Diethylstilböstrol	82
8.3.4.12.	Heptadecansäure und Stearinsäure	83
8.3.4.13.	3-Chlor-Benzoessäure	84
8.3.4.14.	Barbitursäure.....	84
8.3.5.	Bewertung der Reaktantgas-Mischungen	85
8.3.6.	Bestimmung von DES	89
9.	Resumée	93
10.	Anhang.....	97
10.1.	Spektren	97
10.2.	Schaltungsbeschreibung GPC-Steuerung	99
10.3.	Literaturverzeichnis	103
10.4.	Verzeichnis der Abbildungen.....	108

3. Zusammenfassung

Die in der Masttierhaltung eingesetzten Anabolika zielen auf eine Steigerung der Mastleistung ab. Diethylstilböstrol (DES) steht im Verdacht, trotz aller Maßnahmen vielfach in der Tiermast angewendet zu werden. Die Substanz ist sehr preiswert, frei erhältlich und führt zu einer starken Gewichtszunahme der behandelten Tiere. DES wird heute als cancerogen eingestuft und steht deshalb im Mittelpunkt des analytischen Interesses. Im Gegensatz zur Kontrolle vor Ort im Mastbetrieb oder bei der Schlachtung, wo eine Probennahme von Kot und Urin bzw. Leber- und Nierengewebe eine leichtere Nachweisführung wegen der darin enthaltenen erhöhten Wirkstoffmengen ermöglicht, ist für eine wirksame Überwachung von Muskelfleischpartien und Fleischprodukten auf anabole Wirkstoffe wegen der vorliegenden Spurenkonzentrationen der Einsatz hochsensitiver Methoden erforderlich. Zum Nachweis der Anabolika werden deshalb häufig Proteinbindungsmethoden herangezogen, die die Spezifität und Sensitivität von Antikörper-Präparationen ausnutzen (Immunoassays) oder bei ebenso hoher Empfindlichkeit Gruppenspezifität aufweisen (Rezeptortests).

In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse aus dem Radioimmunassay (RIA) und dem Östrogenrezeptortest (ÖRT) kritisch diskutiert. Trotz intensiver Aufreinigung von Fleischextrakten durch Gelpermeation und HPLC können Matrixeinflüsse nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der methodisch bedingten indirekten Erfassung des Anabolikums kann keine positive Substanzidentifizierung zur Bestätigung erfolgen. Zur Vermeidung fehlerhafter Resultate müssen positive Befunde aus den zu Screening-Zwecken eingesetzten Proteinbindungsmethoden durch unabhängige Verfahren abgesichert werden.

Als einzige Methode mit vergleichbarer Empfindlichkeit kann hierzu die Massenspektrometrie eingesetzt werden. Erstmals wird in diesem Zusammenhang der Einsatz selektiver Reaktantgase zur Analyse stark matrixhaltiger Fleischextrakte auf DES untersucht. Durch Anwendung der negativen Chemischen Ionisation (NCI) wird die Ausbildung eines stabilen Anions des DES bei gleichzeitiger Transparenz eines Großteils der biologischen Matrix ausgenutzt. Die Probenzuführung erfolgt mit einer 'extended probe' modifizierten Schubstange.

Mehr als 20 Reaktantgase werden im Hinblick auf ihre Verwendbarkeit untersucht. Die Erzeugung geeigneter Gasgemische wurde in einem speziell für diesen Zweck konstruierten Mischsystem durchgeführt. Die hieraus hervorgegangenen Reaktantgasgemische HCN/H_2 , $\text{MeOH}/\text{N}_2\text{O}/\text{H}_2$, $\text{N}_2\text{O}/\text{He}/\text{H}_2$ und CF_4/H_2 mit den Reaktantionen Cyanid, Methylat, Hydroxyl und Fluorid werden mit Testsubstanzen, die den Bereich der Gasphasenazidität vom stark sauren bis stark basischen überstreichen, charakterisiert.

Zum Nachweis von DES wird das Hydroxyl-Ionen generierende Gemisch ausgewählt und dessen Einsatz in Verbindung mit gering aufgearbeiteten Fleischextrakten demonstriert. Es wird eine Nachweisgrenze von 1 pg DES erzielt.

Für den Nachweis von DES steht damit ein umfassender Analysenverbund zur Verfügung, Neben den zu Screening und Einzelbestimmung einsetzbaren Methoden ÖRT und RIA kann durch die NCI-Massenspektrometrie mit 'extended probe'-Technik eine rasche Bestätigung von positiven Resultaten aus jeder Stufe des 'clean up' heraus erfolgen.

4. Liste der verwendeten Abkürzungen

Ag	Antigen
Ag-Ak	Antigen-Antikörper Komplex
Ak	Antikörper
AMG	Arzneimittel-Gesetz
BAR	Barbitursäure
CLO	Clonidin
CBS	3-Cl-Benzoesäure
Cpm	'counts per minute'
DCI	'direct chemical ionization'
DES	Diethylstilböstrol
DIEN	Dienöstrol
DNA	Desoxyribonuclein-Säure
EIA	'enzyme immuno assay'
ECD	'electron capture detector'
E-OST	Ethinyl-östradiol
FC43	Perfluor-Tributylamin
FDA	Food and Drug Administration
FIBG	Fleischbeschau-Gesetz
FP	Quellendruck ('forepressure')
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeations-Chromatographie
HEP	Heptadecansäure
HEX	Hexöstrol
HPLC	Hochdruck Flüssigkeits-Chromatographie
ID	Innendurchmesser
IE	Ionisierungsenergie
KGW	Körpergewicht
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetz
MID	'multiple ion detection'
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer
NCI	'negative chemical ionization'
NSB	'non specific bound'
OD	Außendurchmesser
ÖRT	Östrogenrezeptor Test
OST	17 β -Östradiol
PCI	'positive chemical ionization'
PPINICI	'pulsed positive ion negative ion chemical ionization'
PRO	Progesteron
RIA	'radio immune assay'
STE	Stearinsäure
STI	Stilböstrol
TA	'total activity'
TET	Tetradecanol

TIC	Gesamtionenstrom ('total ion current')
TRE	Trenbolon
XYL	Xylazin
ZER	Zeranol

Im Text wird zur Bezeichnung der Enthalpiedifferenz ΔH^{acid} die Schreibweise dH^{acid} benutzt.

Umrechnungsfaktoren für Energiegrößen (60):

$$1 \text{ eV} = 23.0 \text{ kcal} = 96,14 \text{ kJ}$$

5. Aktuelle Situation der Anabolika-Überwachung

Fleisch und Fleischerzeugnisse stehen seit Jahren im Brennpunkt lebensmittelchemischer und rechtlicher Diskussionen. Ursache hierfür ist der in der Verbraucheröffentlichkeit weithin bekannte und gefürchtete Einsatz verschiedener chemischer Substanzen zur "industriellen" Fleischproduktion und Bearbeitung. Ein Höhepunkt war der "Östrogenskandal" im ausgehenden Jahr 1980 und Anfang 1981, der durch Pressemeldungen aus Italien an die Öffentlichkeit gebracht wurde. Ausgangspunkt hierfür war das Auftreten von Diethylstilböstrol-Rückständen in kalbfleischhaltiger Babykost (1,2). Die Ergebnisse radioimmunologischer Untersuchungen aus der Bundesrepublik standen im Mittelpunkt kontroverser Diskussionen, mit der Folge, daß auf Basis der jetzt als nicht ausreichend zuverlässig erkannten Analysenverfahren (3, 4) neue Anstrengungen unternommen wurden, um die Methodenentwicklung in diesem Bereich voranzutreiben.

5.1. Rückstandssituation

Die in der Masttierhaltung eingesetzten Anabolika sollen die Mastleistung verbessern, also den Fleisch- und Fettansatz am Tier beeinflussen. In der Regel werden hierzu hormonwirksame Präparate eingesetzt. Diethylstilböstrol (DES) steht in diesem Zusammenhang im Mittelpunkt der Diskussion. Die Substanz ist sehr preiswert und ist im Chemikalienhandel frei erhältlich. Der Anwendung als Anabolikum (oral/intramuskulär) folgt eine überaus intensive Gewichtszunahme der behandelten Tiere (s. Abb. 1). DES wird heute als zweifelsfrei cancerogen eingestuft (3,5 - 8). Es kommt dem DES somit die Funktion der Leitsubstanz zu, für die alle offenen Fragen im Zusammenhang mit der Anwendung von anabolen Wirkstoffen zu prüfen sind.

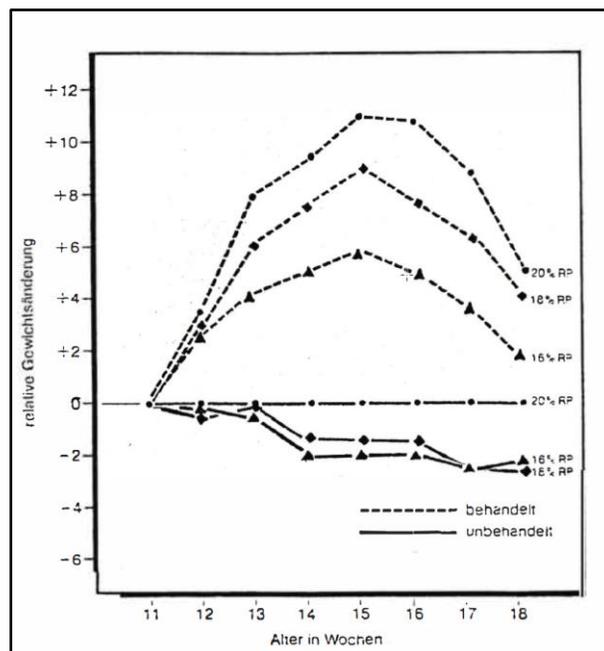


Abb. 1: Einfluß anaboler Wirkstoffe auf die Gewichtszunahme von Bullenkälbern. Der Effekt wird besonders bei den vergleichenden Daten mit verminderten Proteinanteilen im Futter deutlich (RP=Rohprotein) (9); Applikation in 11.Lebenswoche

Schon 1938 wird von E.C. Dodds und Mitarbeitern die starke östrogene Wirkung des von ihnen synthetisierten Stilbenderivates erkannt (10 - 12). Anfang der 40er Jahre bis 1971 wurde DES in den USA häufig als Humantherapeutikum angewandt, um Spontanaborte und andere Schwangerschaftskomplikationen zu vermeiden. Das Auftreten von Karzinomen bei weiblichen und männlichen Nachkommen, die in-utero DES ausgesetzt waren, führte zu Studien, die es als Kanzerogen bestätigten (5). Bekannt ist die Bindungsfähigkeit des DES an DNA; die Aufklärung des Mechanismus steht noch aus (123).

Diethylstilböstrol steht im Verdacht, trotz aller Maßnahmen vielfach in der Tiermast eingesetzt zu werden. Nach den rechtlichen Vorschriften besteht heute ein Anwendungsverbot für DES (und die übrigen Stilbenderivate HEX und DIEN) und andere Östrogen-wirksame Substanzen für die Fleischerzeugung, soweit deren orale Wirksamkeit die des DES nicht mindestens um den Faktor 5 im Mäuse-Uterus Test unterscheidet. Andere oral anzuwendende Stoffe können bei Schlachttieren zu therapeutischen Zwecken angewendet werden, wenn sie als Arzneimittel zugelassen sind und die vorgesehenen Wartezeiten eingehalten werden. Die rechtliche Situation wird durch das Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG), das Fleischbeschaugesetz (FIBG) und das Arzneimittelgesetz (AMG) bestimmt.

Zur Frage der Gesundheitsschädlichkeit von DES als Rückstand in Lebensmitteln hat sich das Bundesgesundheitsamt Berlin gutachterlich geäußert (14):

"Für die Beurteilung von DES-Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs gilt, daß nach derzeitigem Kenntnisstand eine Grenzkonzentration nicht angegeben werden kann, unterhalb derer eine carcinogene Wirkung ausgeschlossen werden kann."

Und:

"Soweit der Bereich dieser Konzentrationen (5 ng DES/g Futter; d.Verf.) bzw. Dosierungen (1,5 µg DES/kg KGW; d,Verf.) deutlich unterschritten wird, ist deshalb nicht damit zu rechnen, daß der kurzfristige oder gelegentliche Verzehr DES-haltiger Lebensmittel ein besonderes Risiko darstellt."

Ein verbindlicher Richtwert für die praktische Beurteilung von DES-Rückständen wird nicht gegeben. Im Gegensatz dazu liefert die Food and Drug Administration (USA) konkrete Daten zu dieser Problematik. Unter der Annahme eines Risikos nicht größer als 1 : 1 Mio auf Basis von Experimental-Studien, wird die zu erreichende Nachweisgrenze für eine analytische Methode berechnet. Werte unterhalb dieser Grenze werden als rückstandsfrei "no residue" definiert (8):

"Applying procedures used by FDA to estimate required detection limits from carcinogenicity data on DES yield the following concentrations:

Liver	1,2 ppt
Muscle	0,6 ppt

The difference in the concentrations obtained for liver and muscle results from the application of different consumption factors (i.e. people consume less liver than muscle)."

Da die zur Zeit verfügbaren Methoden nicht ausreichend empfindlich sind, um routinemäßig die von der Food and Drug Administration geforderten Grenzwerte zu erreichen, ist bei Anwendung dieses Kriteriums der qualitative Nachweis im ppb-Bereich ausreichend, um das untersuchte Lebensmittel als nicht verkehrsfähig zu beurteilen. Diese Auslegung steht nicht im Gegensatz zu der vom Bundesgesundheitsamt Berlin dargestellten Empfehlung (s.o.).

Die Wirkungsweise von DES und den übrigen als Anabolika eingesetzten Präparaten beruht auf hormonanalogen Eigenschaften. Zur Anwendung gelangen östrogenwirksame Substanzen wie die Stilbenderivate Diethylstilböstrol, Hexöstrol, Dienöstrol und das Anabolikum mykotoxinischen Ursprungs Zeranol. 17 β -Östradiol und Ethinylöstradiol werden in Kombinations-Präparaten angewandt. Als androgenwirksame Substanzen werden Trenbolon und Trenbolonacetat eingesetzt. Kombinations-Präparate aus androgen- und östrogenwirksamen Bestandteilen zeigen synergistische Wirksamkeit (15, 16, 17). Der genaue Mechanismus der Wirkungsausprägung ist bisher noch unbekannt (16). Gemeinsamer Effekt ist der Anstieg der Stickstoff-Retention und damit verbunden eine erhöhte Protein-Bildung bei gleichzeitiger Verringerung des Protein-Katabolismus.

Auf molekularer Basis geben die Geometrie des Moleküls, insbesondere Planarität und Abstände der terminalen Hydroxyl-Gruppen Aufschluss über die möglichen Funktionen. Röntgenstrukturanalysen zeigen, daß die Phenyl-Ringe des DES nicht koplanar liegen und die Ethyl-Gruppen aus der Ringebene ragen. Obwohl beide Hydroxyl-Gruppen als Wasserstoff-Donor und -Acceptor fungieren können, weist die asymmetrische Form des DES, in der die Hydroxylgruppen unterschiedlich reagieren, eine hohe Ähnlichkeit zur molekularen Geometrie des 17 β -Östradiol auf (18). Die intramolekularen Abstände in DES und einem wasserstoff-gebundenen Sauerstoff in Östradiol-Hydrat 12.1 Å sind identisch. Vergleichbare geometrische Verhältnisse sind bei Zeranol und einer Reihe von Anti-Hormonen zu finden. Dies legt die Vermutung nahe, daß östrogenwirksame Anabolika in analoger Weise zu dem natürlich vorkommenden 17 β -Östadiol reagieren. Eine hormonelle Aktivität dieser Substanzen nach Genuß von kontaminierten Lebensmitteln kann daher erwartet werden.

Die Metabolisierung von DES führt durch Peroxidase-Oxidation unter anderem zu dem ebenfalls als Anabolikum eingesetzten Dienöstrol (19), ein vollständiger Überblick der Abbauege wird in (20) gegeben. Es kann im Falle der Anwendung von DES bei hinreichender Empfindlichkeit daher ebenfalls DIEN gefunden werden. In der Regel werden nach Applikation von anabol wirksamen Substanzen z.B. DES 10-20 mg pro Tag oral, HEX 45-60 mg subcutan, ZER 36 mg subcutan (15) der weitaus größte Teil über Kot und Urin innerhalb kurzer Zeit wieder ausgeschieden. Allein für das DES ist ein enterohepatischer Kreislauf bekannt, der über Leber und Galle führt. DES kann so in aktiver Form wieder resorbiert werden (20). Die zu erwartenden Gehalte in den tierischen Geweben liegen für Leber und Niere um einen Faktor größer als 10 höher als im Muskelfleisch für DES (9): Muskel 90 pg/g, Leber 1400 pg/g, Niere 2700 pg/g). Die Analytik der Anabolika aus Kot und Urin kommt daher mit weniger sensitiven Methoden aus. Da jedoch insbesondere bei Importfleisch weder Urin und Kot, noch Leber oder Niere zur Verfügung stehen, kann zur wirksamen Kontrolle auf ein Verfahren zur Bestimmung von DES und anderer anabol wirksamer Substanzen in Muskelfleisch und Fleischprodukten nicht verzichtet werden.

5.2. Methodenübersicht

5.2.1. Histologische und biologische Verfahren

Histologisch-biologische Untersuchungen machen sich die Organspezifität von hormonwirksamen Substanzen zunutze. Hierzu gehören neben anderen der Kapaunenkammtest, Vesiculardrüsentest, Allen-Doisy Test und der Mäuseuterus Test. Gemeinsam ist diesen Testverfahren, daß nach Kastration oder Ovariectomie Gaben von Androgenen oder Östrogenen zu vermehrtem Wachstum des Zielorgans z.B. des Hahnenkammes führt. Im Falle des Allen-Doisy Testes geben histologische Untersuchungen der Vaginalschleimhaut Aufschluß über Östrogengaben (21).

Der Mäuseuterus-Test wird für lebensmittelanalytische Zwecke eingesetzt (22). Der Test ist nur für Substanzen mit starker östrogener Aktivität empfindlich; so können als untere Nachweisgrenze lediglich bis zu 2 µg/kg DES im Lebensmittel über verstärktes Uteruswachstum erfaßt werden (23, 24), Metaboliten werden nicht erfasst. Anabolika-Rückstände konnten in einem Feldversuch mit über 160 behandelten Tieren mit dem Mäuseuterus-Test nur in 4 Fällen nachgewiesen werden (25). Eine Hormonselektivität besteht nicht, es kann lediglich Gruppenspezifität ausgenutzt werden. Darüberhinaus können eine Reihe von nicht hormonellen Substanzen das Uterusgewicht ebenfalls beeinflussen (21).

5.2.2. Biochemische Verfahren

Verfahren, die die Sensitivität bei gleichzeitiger Spezifität von Immunoglobulinen und Biorezeptoren ausnutzen, gewinnen neben der breiten Anwendung in der Klinischen Chemie auch in der Lebensmittel-Analytik zunehmend an Bedeutung (3, 26). Für die Erfassung von Rückständen aus der Anwendung von anabol wirksamen Präparaten wird die Bindung von Östrogenen an das Rezeptorprotein des Östrogenrezeptors und die Antigen-Antikörper Bindung innerhalb der Immunreaktion ausgenutzt.

Der Östrogenrezeptor (27) wird aus dem Cytoplasma der Uterusschleimhaut nach Ultrazentrifugation als lösliches Protein gewonnen (28). Die hohe Bindungsaffinität zu Östrogenen führt zu einem gruppenspezifischen Analysenverfahren, das empfindlich für den Nachweis und die Bestimmung von Östrogenrückständen eingesetzt wird (21, 29, 30). Als Messgröße wird ein radioaktiv markiertes Hormon eingesetzt (s.a. Kap. 7.3.). Ein Vorliegen von Östrogenrückständen führt bei der Ausbildung des Hormon-Rezeptor Komplexes zur Konkurrenz von markiertem und nichtmarkiertem Hormon um Bindungsstellen, was im Test nach Abtrennung des Komplexes durch Verringerung der Radioaktivitätsmenge gegenüber einer Eichung detektierbar ist. Die messbare Radioaktivität ist somit umgekehrt proportional der in der Probe enthaltenen Östrogenmenge. Eine qualitative Aussage über die Identität einzelner östrogen wirksamer Anabolika ist wegen der Gruppenspezifität des ÖRT nur nach vorhergehender Auftrennung der Östrogene möglich.

Immunologische Methoden wie Enzymimmunoassay (EIA) und Radioimmunoassay (RIA) verwenden als spezifisches Protein Antikörper, die zielgerichtet auf charakteristische Strukturbereiche der zu analysierenden Substanz wirken (31). Die Herstellung der Antikörper erfolgt im Organismus von Versuchstieren unter Ausnutzung des Immunsystems. Die Zielsubstanz (Hapten) wird

proteingekoppelt als Immunogen dem Tier injiziert (32, 33, 34). Die Kopplung des Haptens an ein Protein wird in der Regel mit Rinderserumalbumin (BSA) durchgeführt und ist unabdingbar, um eine Reaktion des Immunsystems zur Antikörperproduktion auszulösen (35). Die aus der Immunantwort hervorgehenden Immunoglobuline unterscheiden sich in ihrer variablen Region, die als Matrize auf eine determinante Gruppe des Haptens zu verstehen ist. Ein Immunogen enthält im Allgemeinen mehr als eine determinante Gruppe, sodaß mit einer Vielzahl unterschiedlicher Antikörper mit verschiedener Spezifität und Sensitivität als Ergebnis der Immunisierung zu rechnen ist (36). Antiseren dieser Präparationen sind selten frei von Kreuzreaktivitäten, die durch Ag-Ak Reaktion mit gleichen aber wenig spezifischen Strukturmerkmalen anderer Moleküle aus dem Testansatz hervorgerufen werden. Das Gemisch der Spezifitäten variiert von Tier zu Tier.

Wird eine Antikörperspezies hoher Qualität gefunden, kann durch Clonen eine Antikörperpräparation mit einheitlichen Eigenschaften hergestellt werden. Nach der von G. Köhler und C. Milstein (38) entwickelten Technik werden immunkompetente B-Lymphozyten mit Zellen einer Tumorzelllinie fusioniert. Das entstehende Hybrid kann in vitro kultiviert werden. Man gelangt nach Selektion zu einzelnen Klonen, die jeweils einen ausgewählten Antikörper herstellen. Eine Verbesserung der Spezifität bzw. Kreuzreaktionssicherheit wird hierdurch nicht erhalten. Die Einheitlichkeit der Präparation erlaubt es, optimale Testbedingungen zu wählen, um so Schärfe und Reproduzierbarkeit zu erhöhen.

Während sich der Terminus "Kreuzreaktion" auf die Ag-Ak-Reaktion mit einer anderen, aber bekannten Substanz bezieht, hier sind zum Beispiel eine Reihe von persistenten Pestiziden zu nennen (39), gehen Antikörper mit einer Reihe weiterer Stoffklassen Bindungen ein, über deren Beschaffenheit Aussagen nur ansatzweise vorliegen. Es hat sich durchgesetzt, diese Effekte als "unspezifische Bindungen" (non-specific bound) zu bezeichnen.

Der im Folgenden zu beschreibende Testablauf für Proteinbindungsmethoden (35) wie ÖRT und RIA zeigt auf, daß immunologischen Tests ein lediglich indirekter Weg über eine Indikatorreaktion zur Bestimmung der Testsubstanz zugrunde liegt. Als Folge dieser Methodik kann anhand eines Testergebnisses keine Aussage über das Eintreten oder Nichteintreten von Kreuzreaktionen und unspezifischen Bindungen getroffen werden (40). Die definierte Spezifität klonierter Antikörper sichert zwar eine weitgehende Freiheit vor einflußnehmenden Kreuzreaktivitäten zu, kann aber im Falle von positiven Testergebnissen, also dem scheinbaren Vorhandensein der Zielsubstanz im Analysenmaterial, die erforderliche Sicherheit zur Begründung von gutachterlichen Befunden nicht liefern. Eine unabhängige Methode muß in solchen Fällen die Korrelation zwischen dem Resultat der Proteinbindungsmethode und dem tatsächlichen Vorliegen der vermuteten Substanz bestätigen (41). Eine solche unabhängige und direkte Methode kann mit der Massenspektrometrie zur Verfügung gestellt werden.

Die Durchführung der Tests erfolgt nach dem Prinzip der kompetitiven Ag-Ak Bindung (42). Um die Bindungsstellen des Proteins konkurrieren markierter Tracer und nicht markierte Substanz Ag aus dem Probenmaterial. Als Tracer wird meist ein Tritium-markiertes Antigen Ag* eingesetzt:



Eine Auszählung des an Antikörper gebundenen Tracers Ag* durch Szintillationsfluorimetrie kann nach Trennung des Ag-Ak Komplexes vom freien ungebundenen und ebenfalls anteilig radioaktivem Material erfolgen. Die Trennung erfolgt durch Aktivkohlesuspensionen, deren Porenweiten durch Dextrane definiert werden. Aus mitgeführten Standardkurven können unbekannte Mengen quantifiziert werden. Für einen Null-Wert wird ausschließlich Tracer eingesetzt. Dieser Wert zeigt bei der Szintillationszählung den höchsten Gehalt an Radioaktivität. Als negative Korrelation zu den Zählergebnissen (Verdrängung von markierter durch nicht markierte Substanz) ergibt sich der Gehalt der Zielsubstanz im Analysenmaterial.

Als Nachweisgrenzen werden für den RIA auf DES 10 ppt (= 10 pg/g) angegeben (43). Bei Berücksichtigung von 2 Standardabweichungen werden Rückstandskonzentrationen mit einer befriedigenden Zuverlässigkeit bis zu 20 pg/g in Plasma und 90 pg/g in Nierengewebe erhalten (44).

Für den ÖRT werden für DES Nachweisgrenzen von 50 ppt (= 50 pg/g) und für HEX und DIEN je 1 ppb (= 1000 pg/g) angegeben (43).

5.2.3. Chemische und physikochemische Verfahren

Neben den Proteinbindungsmethoden finden gaschromatographische Verfahren insbesondere bei der Untersuchung zubereiteter Lebensmittel Verwendung (2, 45). Es erfolgt eine spezifische Detektion durch Koppelung mit einem Massenspektrometer (46, 47). Eine solche direkte Methode kann durch sichere Zuordnung der detektierten Molekülfragmente eine zweifelsfreie Aussage über das Vorhandensein von anabolen Wirkstoffen ermöglichen. Chromatographische Methoden, die nach Derivatisierung mit Heptafluorbuttersäureanhydrid den Elektronen-Einfang Detektor verwenden, werden ebenfalls beschrieben (47, 48).

Um die Probe der als Endpunktsbestimmung fungierenden GC/MS-Analyse zuzuführen, ist eine mehrstufige, sehr zeitaufwendige und peinlich genau einzuhaltende Probenaufarbeitung durchzuführen (2, 49). Die Aufarbeitung schließt ein Eindampfen zur Trockne ein, das für die synthetischen Anabolika DES, HEX und DIEN kritisch zu bewerten ist (43). Die starke Absorptionsneigung insbesondere des DES kann gerade in diesem Schritt zu bedeutenden Verlusten führen. Darüberhinaus ist eine Derivatisierung des Extraktes für die Gaschromatographie unumgänglich (50), wobei wiederum mit Absorptionsverlusten im Trocknungsschritt zu rechnen ist. Der analytische Wert der Derivatisierung liegt neben der Chromatographierbarkeit bei Temperaturen unterhalb der Grenze zur thermischen Spaltung in der Erhöhung des Molekulargewichtes, sodaß auf diese Weise in der Massenspektrometrie Moleküle und Fragmente erhalten werden, die im höheren Massenbereichen liegen, als die Vielzahl ihrer durch die biologische Matrix bedingten Begleitstoffe.

Als Nachweisgrenzen für die massenspektrometrische Bestimmung durch Elektronenstoß-Ionisation werden nach H.-J. Stan und B. Abraham (45) für die Stilbenderivate DES, HEX und DIEN 1 ppb = ng/g angegeben. B. Bergner-Lang und M. Kächle (2) weisen darauf hin, daß für HEX keine geeigneten Massen zur Verfügung stehen, die einen Nachweis im ppb-Bereich zulassen. Die Nachweisgrenze für Östrogene wird mit 0,02 ppb (= 20 pg/g) angegeben.

Die Anwendung der positiven Chemischen Ionisation bringt in diesem Zusammenhang für die Spurenanalyse keinen Gewinn, da die Gesamtionen-Intensität gegenüber der EI-Ionisation vermindert ist (51).

Dünnschichtchromatographische Methoden bewähren sich in der Regel nur bei Proben mit höheren Östrogengehalten, z.B. bei der Untersuchung von Kot und Urin (52, 53). Die erreichbaren Nachweisempfindlichkeiten liegen bei hoher Aufreinigung im mittleren ppb-Bereich (54).

Hochdruckflüssigkeitschromatographische Verfahren werden ebenfalls in erster Linie zur Analyse von anabol wirksamen Substanzen aus Kot und Urin heraus eingesetzt. Die Trennleistungen der HPLC-Säulen sind begrenzt und es erfolgt daher eine prinzipielle Eingrenzung einzelner Verfahren auf wenige Wirkstoffe, so zum Beispiel auf DES (55). Die zur Bestimmung notwendige Empfindlichkeit wird häufig durch Einsatz des elektrochemischen Detektors erzielt (Nachweisgrenze DES 1 µg/kg (55)). Durch Variation der Elektrodenpotentiale kann bei nicht ausreichender Trennung bessere Identifizierbarkeit erreicht werden (56). Die Nachweisgrenzen werden für HEX mit 1 ppb (1 µg/kg) und DIEN und OST mit 2 ppb (2 µg/kg) angegeben (57).

6. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie zählt heute zu den Routine-Analysenverfahren in der Chemie. Charakteristische Eigenschaften sind die große Empfindlichkeit bei hohem Informationsgehalt des Analyseergebnisses bezüglich des Molekulargewichtes und der Struktur der untersuchten Verbindungen (58, 59).

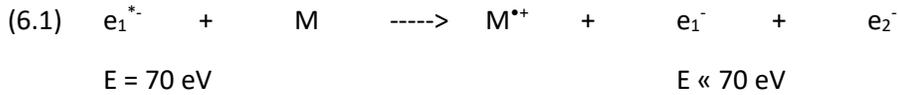
Die verschiedenen massenspektrometrischen Arbeitstechniken unterscheiden sich wesentlich in der Art der Probenzuführung und den eingesetzten Ionisierungstechniken. Die gebräuchlichsten Verfahren zur Ionisierung sind die Elektronenstoß-Ionisation (EI) und die Chemische Ionisation (CI). Als Analyserortypen stehen in der Routine Sektorfeld- und Quadrupolgeräte zur Verfügung. Zum Nachweis der Ionen und ihrer Registrierung werden ausschließlich Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV) eingesetzt. Die Gerätesteuerung und Datenaufnahme sowie -auswertung wird über ein angepasstes Computersystem ausgeführt.

Prinzipiell können sowohl positive als auch negative Ionen erzeugt und analysiert werden. Der weitaus größte Teil der entstehenden Ionen ist positiv geladen und wurde bisher ausschließlich detektiert. Erst seit wenigen Jahren erlangt die Erfassung von positiven und negativen Ionen Bedeutung für Strukturaufklärung und Gemischanalytik (60). Mehrfach geladene Partikel haben in der Routineanalytik marginale Bedeutung.

6.1. Elektronenstoßionisation (electron impact, EI)

Die im Hochvakuum in Gasform vorliegenden Probenmoleküle werden in der Ionenquelle durch Beschuß von Elektronen mit einer Energie im Bereich von über 50 eV ionisiert. Die gebildeten Ionen werden durch ein elektrisches Feld dem Quellenraum entzogen, durch ein Linsensystem fokussiert und als Ionenstrahl dem Analyserortteil zugeführt.

Durch das Auftreffen eines beschleunigten Elektrons e_1^{*-} hoher Energie auf das Probenmolekül M wird ein Elektron e_2^- herausgeschlagen, sodaß ein positiv geladenes Molekülradikal M^{*+} entsteht:



Die kinetische Energie des stoßenden Elektrons e_1^{*-} vermindert sich zu e_1^- um die Ionisierungsenergie (IE) des Moleküls sowie um den Betrag an kinetischer Energie, der im Molekülion und dem herausgeschlagenen Elektron e_2^- verbleiben.

Der Energiebetrag, der dabei auf das Molekül selbst übertragen wird, ist weitaus höher als zur Ionisierung notwendig. Zusätzlich besitzt das Ausgangsmolekül einen im Vergleich jedoch geringen Betrag an thermischer Energie. Kann die inhärente Energie vom Molekülion nicht durch Anregung, Rotation oder Schwingung stabilisiert werden, tritt Fragmentierung zu stabilen geladenen und ungeladenen ('neutral loss') Bruchstücken des Moleküls auf. Die Bildung positiver Ionen tritt ein, wenn der übertragene Energiebetrag mindestens dem Ionisierungspotential (IP) des Moleküls entspricht. Die Ionisierungspotentiale zur Bildung des einfach geladenen Ions liegen in der Höhe von 7 - 15 eV (61).

In geringem Maß treten Molekülionen schon unterhalb des Ionisierungspotentials auf, was auf den nicht monoenergetischen Elektronenstrahl zurückzuführen ist. Es liegt eine gaußförmige Verteilung vor mit einer Streubreite von ca. +/- 1 eV (62). Ist die Energie des stoßenden Elektrons genau gleich groß dem Ionisierungspotential, muß ein vollständiger Energieübertrag (durch einen zentralen Stoß) erfolgen. Das Auftreten von Molekülionen ist bei diesem Energieniveau äußerst gering.

Höhere Energien des Elektronenstrahls steigern die Wahrscheinlichkeit der zur Ionisierung notwendigen Energieübertragung. Als Folge wird ein Ansteigen des Auftretens von Molekül- und Fragmentionen mit steigender Elektronenenergie beobachtet. Die Intensität erreicht ein Niveau bei etwa 50 eV, sodaß ein weiteres Erhöhen der Elektronenenergie keine weitere Intensitätssteigerung der Molekülionen bewirkt. Zentrale Stöße können zu intramolekularen Umlagerungen führen. Das standardisierte Arbeiten bei 70 eV liefert reproduzierbare und vergleichbare EI-Massenspektren. Die übertragene Energie ist in der Regel so hoch, daß Fragmentierungen und 'rearrangements' eintreten, die wertvolle Informationen für die Strukturaufklärung der Substanz darstellen. Isomere liefern häufig identische Massenspektren. Die Molmasse ist wegen der radikalischen Natur des gebildeten M^{*+} in vielen Fällen wenig intensiv oder gar nicht zu detektieren. Durch das ungepaarte Elektron besitzt das Molekülkation hohe innere Energie und neigt dadurch zur Stabilisierung durch Fragmentierung. Die mit der Molmasse verbundene strukturelle Information geht verloren.

Negative Molekülionen können bei der EI Ionisation prinzipiell nicht durch Einfang der hochenergetischen Primärelektronen e_1^{*-} entstehen. Unter diesen Bedingungen können im Bereich der negativen Ionen nur Fragmente erwartet werden. Tatsächlich treten auch unter EI-Bedingungen negative Molekülionen auf. Es findet dabei eine Anlagerung von thermischen Sekundärelektronen ($E < 2 \text{ eV}$) statt, die ihre hohe kinetische Energie durch Kollision übertragen haben:



Die Bildung des Molekülanions ist druckabhängig und kann durch Zusatz von SF₆, das einen hohen Einfangquerschnitt für thermische Elektronen hat (63), unterdrückt werden (60). Der vorliegende Sekundärionenprozess wird damit bestätigt. Das Abbremsen der Primärelektronen zu thermischen Elektronen durch Kollision wird bei der Chemischen Ionisation provoziert und zu analytischen Zwecken ausgenutzt.

6.2. Chemische Ionisation

6.2.1. Anwendungsbereich

Während für EI-Bedingungen in der Ionenquelle Hochvakuum erforderlich ist, werden bei der Chemischen Ionisation höhere Quellendrücke ausgenutzt, geräteabhängig bis zu 1 Torr, um Ionen-Molekül-Reaktionen zu ermöglichen. Das Prinzip wurde 1966 zuerst von Munson und Field beschrieben (64).

Ziel der Chemischen Ionisation ist es, starke Fragmentierungen, wie diese bei der EI auftreten, zu vermeiden und eine sichere Information über wenige strukturspezifische Fragmente, und vor allem über die Molmasse der Analysensubstanz zu erhalten. Zur Strukturanalyse werden sowohl die Spektren durch Elektronenstoß, als auch die der Chemischen Ionisation aufgenommen.

In der Rückstandsanalyse wird eine Steigerung des Signal/Rausch-Verhältnisses erreicht, da sich das massenspektrometrische Signal nicht mehr auf viele Fragmente verteilt, sondern zu einer Intensitätssteigerung der Molmasse bzw. weniger dominierender Fragmente führt. Gleichzeitig werden Bestimmungen zuverlässiger, weil eine Detektion des Substrates auf der höher spezifischen Molmasse in einem Massenbereich möglich wird, wo eine Überlagerung der Matrix wenig wahrscheinlich ist.

Schwerflüchtige polare Verbindungen können mit direkter Chemischer Ionisation (DCI) analysiert werden, wobei die zu untersuchende Substanz auf einem programmiert heizbaren Filament einer Feststoff-Sonde direkt in das Reaktantgasplasma der Ionenquelle eingebracht wird. Die Ionisation erfolgt sowohl auf Basis einer Plasma/Feststoff- bzw. Plasma/Liquidoberflächen-Interaktion als auch nach Übergang der Substanz in die Gasphase (65). Weitere Anwendungen der Chemischen Ionisation sind durch die Kopplung von Massenspektrometrie mit der ^{Hochdruckflüssigkeitschromatographie} geschaffen worden, wobei das Eluens der HPLC gleichzeitig als Reaktantgas ausgenutzt werden kann (66, 67).

Die Ionisierungsbedingungen bei der Chemischen Ionisation sind so beschaffen, daß lediglich geringe Energiebeträge auf das Substratmolekül übertragen werden. Ein der Ionenquelle kontinuierlich zugeführtes Reaktantgas wird mit hochenergetischen Primärelektronen ($E > 70$ eV) ionisiert, was zur Bildung des Reaktantgasplasmas führt. Das Plasma besteht aus für das Reaktantgas charakteristischen positiven und negativen Ionen, Radikalen, Neutralteilchen und einer von der Art des Reaktantgases abhängigen Konzentration an nahezu thermischen Sekundärelektronen.

Das Reaktantgas liegt gegenüber der zu untersuchenden Substanz in hohem Überschuß vor ($> 10^4 : 1$). Die Ionisierung der Substanz erfolgt bei Kollision mit den Ionen des Plasmas (Ionen-Molekül-Reaktion) und auch durch Einfang bzw. Kollision mit Sekundärelektronen. Energieüberschüsse

tragen zur Erhöhung der Rotations- und Schwingungsenergie bei und führen zu Fragmentierungen. Aufgrund des generell geringeren Energiegehaltes des Plasmas bleibt das Ausmaß der Fragmentierung gegenüber der EI-Ionisation gering. Eine weitere Verringerung des Energiegehaltes der Substanzen und damit eine zusätzliche Stabilisierung tritt durch Kollision mit weiteren Reaktantgasteilchen ein (Kollisionsstabilisierung). Prinzipiell können durch CI sowohl positive als auch negative Ionen simultan erzeugt werden. Während die Erfassung von positiven Ionen nach chemischer Ionisation (PCI) seit Jahren ihren festen Platz in vielen Bereichen wie z.B. in der Gemischanalyse, der Aufklärung labiler Verbindungen oder in der biochemischen Analytik inne hat (58), findet die gezielte Erzeugung und Detektion von negativen Ionen (NCI) bis heute nur in wenigen Fällen Eingang in die Routineanalytik (68 - 72).

Durch Auswahl des Reaktantgases bzw. einer Mischung von Gasen, die auch dem Dampfraum über Flüssigkeiten entnommen werden können, lassen sich die entsprechenden Reaktantgasionen sowie die bei dem Prozess entstehenden thermischen Elektronen so einsetzen, daß ein breites Spektrum von Anwendungen möglich wird, das zu zusätzlichen Selektivitäten auf ausgewählte Substanzklassen führt.

6.2.2. Prozesse im Reaktantgasplasma

Das Reaktantgasplasma wird in der Ionenquelle durch Beschuß eines kontinuierlich zugeführten Gases mit hochenergetischen Primärelektronen erzeugt. Ein breites Spektrum unterschiedlicher Gasphasenreaktionen wird durch diesen Vorgang ausgelöst. Die Steuerung der Substanz/Plasma-Wechselwirkung wird durch Auswahl des zugeführten Gases erreicht. Als Kriterium für die Auswahl eines Reaktantgases steht die Ausbildung eines oder weniger dominierender Reaktantionen, um eine definierte Umsetzung der Substanz zu ermöglichen.

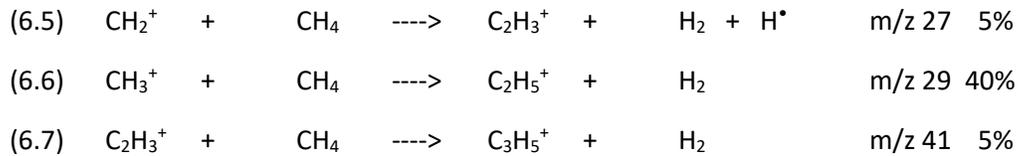
Die Erzeugung des gewünschten Reaktantions ist abhängig von Quelldruck und -temperatur. Das Zusammenspiel mehrerer entgegengerichteter Einflüsse wie Kollisionsstabilisierung von angeregten Vibrations- und Rotationszuständen durch Neutralteilchen (besonders im Hinblick auf die Ionisierung des Substratmoleküls zu sehen), der Polymerbildung innerhalb des Reaktantgases, Rekombination und Selbstentladung (im Falle negativer Ionen) bedarf der Optimierung. Die Varianzbreite dieser Quellenparameter ist ein wesentliches Kriterium für die routinemäßige Anwendung.

Am Beispiel des Methans als eine der am häufigsten eingesetzten Reaktantgase (60, 73, 74, 75) können die Umsetzungen aufgezeigt werden, die zur Bildung charakteristischer Reaktantgasionen führen. Es entstehen eine Vielzahl von Ionen sowie sekundäre und nahezu thermische Elektronen:



Durch Umsetzung der Ionen mit CH_4 entsteht das charakteristische Reaktantgascluster:





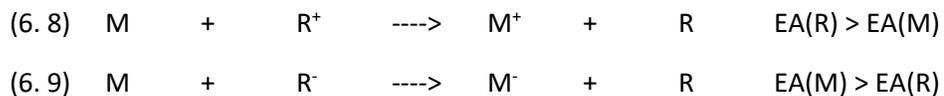
Gute CI-Bedingungen werden bei Erreichen des Verhältnisses von CH_5^+ / $\text{CH}_4^{\bullet+}$ mit 10:1 beschrieben (61).

Das Zusammentreffen von Reaktantgasionen mit Substratmolekülen kann neben einer einfachen Ladungsübertragung zu einer echten chemischen Reaktion führen, als deren Produkt das ionisierte Substratmolekül bzw. ein Fragment dessen zu erwarten ist. Es handelt sich hierbei um bimolekulare Reaktionen, d. h. die Umsetzungen sind druckabhängig und es existieren für bestimmte Reaktionswege optimale Zustände.

Das Protonierungsverhalten in der Gasphase unterscheidet sich grundlegend von der wässrigen Phase. Alle Einflüsse, die durch Solvatisierung und Polarisierung im flüssigen Medium nur schwer auszuschalten sind, fallen in der Gasphase weg. So ergibt sich häufig eine unterschiedliche Reihenfolge der Aziditäten bzw. Basizitäten (61).

6.2.2.1. Ladungsübertragung (Charge Transfer)

Die Ionisierung des Probenmoleküls wird durch Übertragung eines Elektrons erreicht:



Zum Ablauf der Reaktion muß die Elektronenaffinität EA des jeweils neutralen korrespondierenden Acceptors größer sein als die des Elektronendonators.

In Gleichung (6.8) ist das Reaktantgas häufig ein Edelgas. Bei dieser Charge Transfer Reaktion wird die Rekombinationsenergie (RE ca. 10-25 eV) auf das Probenmolekül übertragen. Die interne Energie des Molekülions verbleibt als Differenz zur Ionisierungsenergie. In der Regel tritt starke Fragmentierung auf, die Spektren zeigen große Ähnlichkeit mit den Ergebnissen der Elektronenstoß-Ionisation (76).

In der Analytik ist die Ladungsübertragung nach Gleichung (6.9) ohne Bedeutung, dient prinzipiell aber zu Studien bei der Aufklärung von relativen Elektronenaffinitäten (77). Der übertragene Energiebetrag ist gegenüber Gleichung (6.8) erheblich geringer und ist der Differenz der Elektronenaffinitäten proportional. Fragmentierungen treten in direkter Folge nicht auf.

6.2.2.2. Protonenübertragung (Proton Transfer)

Die Protonenübertragung von einem Reaktantgas-Ion auf ein Substratmolekül oder vice versa ist im weitergehenden Sinn als die Abstraktion eines geladenen Molekülteils anzusehen. Voraussetzung für den Ablauf des Transfers ist ein Affinitätsgefälle für das betreffende Teilchen.





Bei Berücksichtigung der grundlegenden Bedeutung speziell der Protonenübertragung sowohl für PCI nach (6.10) als auch für NCI nach (6.11) wird diesem Ionisierungsmechanismus eine grundsätzliche Eigenständigkeit eingeräumt. Durch Protonenübertragung können sowohl positive als auch negative Ionen gebildet werden.

Die Reaktion nach Gleichung (6.10) läuft exotherm ab, falls die Protonenaffinität PA des Substratmoleküls M höher ist als die des neutralen Reaktantgasteilchens R. Die Differenz der Protonenaffinitäten ist das Maß für die Enthalpie der Reaktion und bestimmt dadurch den Betrag an innerer Energie des Molekülions MH^+ . Durch Auswahl des Reaktantgases entsprechend der kalkulierbaren Reaktionsenthalpie läßt sich das Ausmaß der eintretenden Fragmentierung kontrollieren (72). Zum Erreichen hoher Ionisierungsausbeuten wird eine starke exotherme Protonierungsreaktion benötigt (z.B. durch Methan). Hier laufen die Charakteristika der PCI entgegengesetzt zu den Erfordernissen der Spurenanalyse. Je stärker exotherm die eingesetzte Reaktion ist, desto stärkere Fragmentierungen und der Verlust an Intensität der substanzspezifischen Molmasse müssen hingenommen werden. Anhand der Protonenaffinität der konjugierten Base R kann eine Beurteilung des mittleren Energiegehaltes des MH^+ -Ions erfolgen (61).

Tabelle 6/1: Protonenaffinitäten bei verschiedenen Reaktantgasen

Reaktant Gas	Reaktant Ion RH^+	konjugierte Base	Protonenaffinität (R) kJ/mol
H_2	H_3^+	H_2	420
CH_4	CH_5^+	CH_4	530
H_2O	H_3O^+	H_2O	700
$(\text{CH}_3)_3\text{-CH}$	$(\text{CH}_3)_3\text{-C}^+$	$(\text{CH}_3)_2\text{-C=CH}_2$	815
NH_3	NH_4^+	NH_3	865
CH_3NH_2	CH_3NH_3^+	CH_3NH_2	915

Erwartungsgemäß hat ein protoniertes Molekülion, das aus der Reaktion mit Ammonium hervorgegangen ist, weniger innere Energie als das gleiche aus der Umsetzung im Methan Plasma entstandene Ion.

Die beim Protonen-Transfer übertragene Energie wird selbst bei Verwendung von Wasserstoff als Reaktantgas 500 kJ/mol (ca. 5 eV) nicht übersteigen (61). Als Folge wird gegenüber der Elektronenstoßionisation eine Erhöhung der relativen Intensitäten von (pseudo-) Molekülionen $(\text{M}+\text{H})^+$ im Spektrum beobachtet. Verstärkend wirkt die geringe innere Energie und damit höhere Stabilität des $(\text{M}+\text{H})^+$ -Ions mit gerader Elektronenzahl im Vergleich zu dem in EI gebildetem M^{*+} Radikal.

Ebenfalls als Protonenübertragungsreaktion ist die Eigenprotonierung eines Moleküls M durch eines seiner Fragmente oder durch das Molekül selbst zu betrachten (72). Eine solche Reaktion ist häufig bei der Elektronenstoßionisation zur Bildung des $(\text{M}+1)^+$ Ions zu beobachten.



John Bartmess und Robert McIver (78) haben Reaktantgase und organische Verbindungsklassen entsprechend der Reaktionsenthalpie ihrer funktionellen Gruppen für die Dissoziation der Brønsted Säure in ein Proton und die korrespondierende Base nach Gleichung (6.12) in eine Skala eingeordnet (s. Abb. 2).

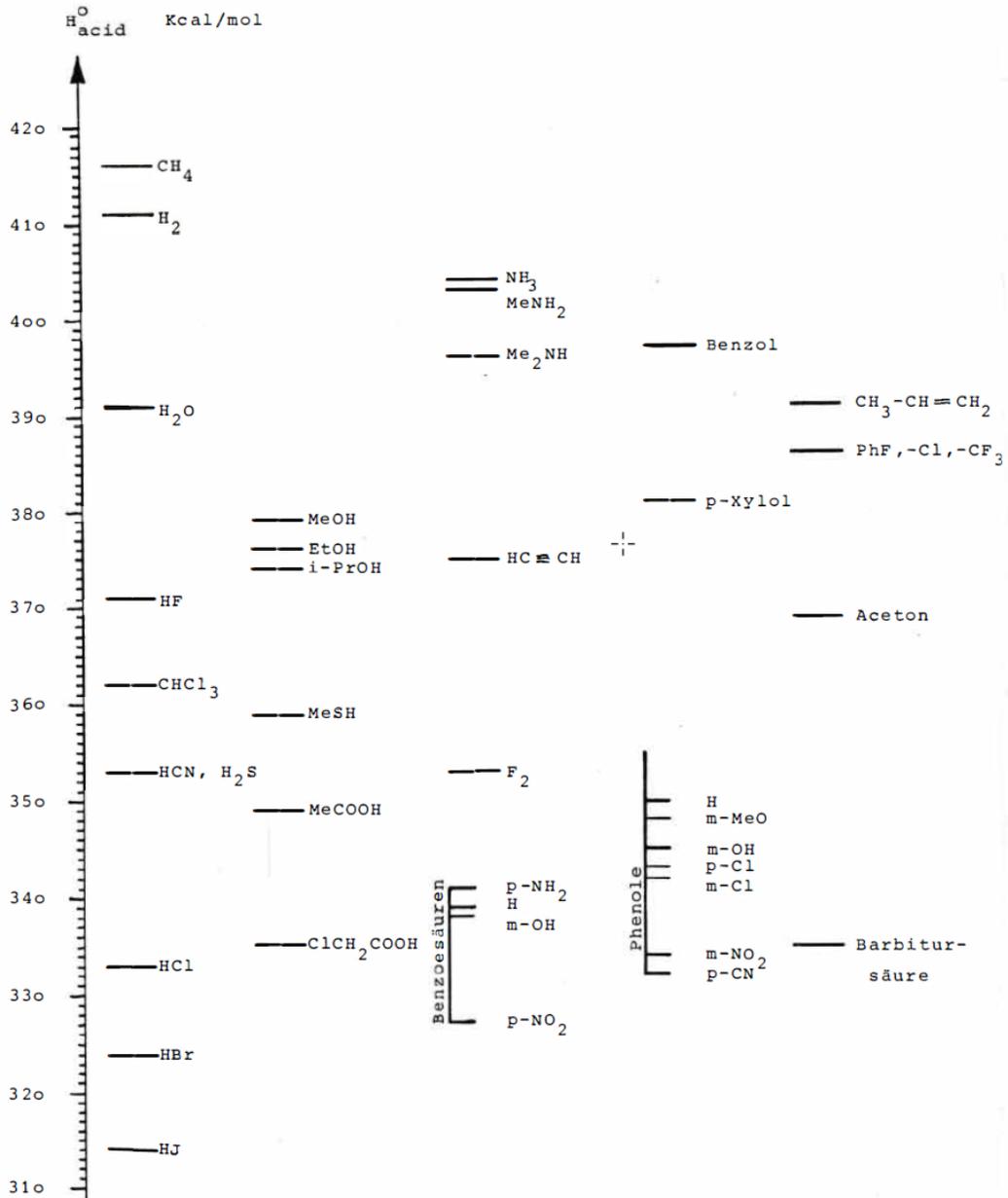
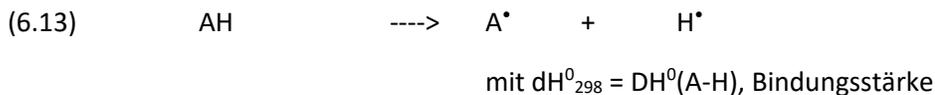


Abb. 2: Gasphasenaziditäts-Skala nach J. Bartmess u. R. McIver (78)
 (Da die Enthalpie in (6.12) positiv ist, steigt die Azidität der Verbindungen mit fallendem dH-Wert.)

Die Ermittlung der Werte für $dH_0 \text{ acid}$ erfolgt über bereits bekannte Bindungsstärken, Ionisierungspotentiale und Elektronenaffinitäten:



$\text{IP}(\text{H}) = \text{Ionisierungspotential}$

von Wasserstoff, const.

für alle Brønstedt-Säuren

$\text{EA}(\text{A}) = \text{Elektronenaffinität}$

$$(6.15) \quad dH_0 \text{ acid} = DH^0(\text{A-H}) + \text{IP}(\text{H}) - \text{EA}(\text{A})$$

Die Auswertung von absoluten Einzeldaten ergab Stützpunkte für die Skala (Ammoniak, i-Butan). Die Bestimmung relativer Aziditäten aus der Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten lieferte eine gute Korrelation zu den erwarteten Werten.

Der analytische Wert der Gasphasenaziditäts-Skala liegt in der Möglichkeit, für eine vorliegende Verbindungsklasse ein möglichst sanft ionisierendes Reaktantgas auszuwählen. So wird Methan als stärkere Base eingestuft ($dH^0 \text{ acid}$ 416 kJ/mol) als Ammoniak ($dH^0 \text{ acid}$ 404 kJ/mol), was sich durch geringere Fragmentierung bei Verwendung von Ammoniak in der Praxis bestätigt. Gleichzeitig eröffnet diese Skala die Chance zur Auswahl eines selektiven Reaktantgases. Diese Beurteilungen sind speziell für das Arbeiten mit NCI von besonderer Bedeutung (s. Kap. 8.3.5).

Die Protonenübertragung bei der negativen Chemischen Ionisation kann nach Gleichung (6.11) als Protonenabstraktion vom Probenmolekül verstanden werden. Auf diese Weise werden alle Substanzen mit azidem Wasserstoff, wie Alkohole, Phenole, Ketone u.a, einer schonenden Ionisierung zugänglich.

Die Reaktion nach (6.11) läuft ab, falls die Protonenaffinität des zum Reaktantgasanion korrespondierenden Neutralteils größer ist als die des Substratmoleküls. Als Reaktantgas wird zur Ionisierung eine im Vergleich stärkere konjugierte Base ausgewählt. Substanzen, die von sich aus eine stärkere Basizität besitzen als das Reaktantgas, bleiben unverändert und werden nicht ionisiert. So wird Methanol Amine und Aliphaten sowie underivatisierte Aromaten transparent erscheinen lassen, Aniline und Phenole dagegen ionisieren können.

Intensive Fragmentierungs-Reaktionen können bei der Protonen-Abstraktion ausgeschlossen werden. Die durch den exothermen Ablauf freiwerdende Energie ist im Wesentlichen in der neugebildeten Bindung zwischen R und H befindlich (72). Das gebildete Anion erhält durch die Ionisierung keine Überschuss-Energie.

6.2.2.3. Hydrid-übertragung



Hohe Hydrid-Ionen Affinitäten werden für CH_3^+ , CH_5^+ , CF_3^+ und H_3^+ beschrieben. Lediglich mit höheren Alkanen und verzweigt-kettigen Alkanen reagieren die Ionen $C_2H_5^+$ und $s-C_3H_7^+$ unter Anlagerung eines Hydrid-Restes. NO^+ Ionen zeigen Hydrid-Abstraktion ausschließlich von Alkanen mit einem tertiären Wasserstoff (72). Außerhalb der Kohlenwasserstoff-Analytik wird dem Hydrid-Transfer bei der analytischen Massenspektrometrie nur geringe Bedeutung beigemessen.

6.2.2.4. Ionenanlagerung (reagent ion capture)

Die Bildung von Ionen im Reaktantgasplasma kann neben dem Austausch und der Abstraktion von Ladungsträgern ebenso durch Anlagerung von Ionen an das Substratmolekül erfolgen. Die zur Bildung des Anlagerungsproduktes führenden Reaktionen sind reaktantgastypisch und weisen auf teils charakteristische Strukturmerkmale des Substrates hin. Das Ausmaß der Clusterbildung kann durch Verdünnen des polaren Reaktantgases mit einem nicht polaren Gas (z.B. Wasserstoff) gesteuert werden (72). Die Ionenanlagerung läuft über die Ausbildung eines relativ langlebigen Kollisions-Komplexes. Der Komplex dissoziiert leicht wieder in die Ausgangskomponenten oder Produkten davon. Unter günstigen Bedingungen tritt eine Stabilisierung zur Weiterreaktion ein (72).

Durch Assoziation:



Durch Assoziation an das Substanzmolekül nach Gleichung (6.17) reagieren die Reaktantionen NH_4^+ und NO^+ nach Kollisionsstabilisierung. Im Methanplasma dient die Anlagerung von $C_2H_5^+$ zur weiteren Bestätigung der Molmasse, erbibt aber Ionen mit geringerer Intensität (61, 75).

Im Falle der Chemischen Ionisation mit Ammoniak kann das Ammoniumion nicht nur als schwache Säure fungieren, es wirkt gleichzeitig als elektrophiles Agens auf organische Moleküle. Eine hohe Protonenaffinität seitens des Substratmoleküles M ist nicht vorhanden ($PA < 205$ kcal/mol). Insbesondere lagern NH_4^+ Carbonyl-Verbindungen an (monofunktionelle Ketone, Aldehyde, Ester, Säuren, u.a.), die nicht ausreichend basisch zur Bildung des MH^+ Ions sind. Verbindungen mit höheren Protonenaffinitäten (Amide, Amine, α,β -ungesättigte Ketone) reagieren mit Protonentransfer.

Die Anlagerung negativer Reaktantgasionen nach Gleichung (6.18) wird von Kajdas und Tümmeler (79) bei langkettigen aliphatischen Kohlenwasserstoffen mit Hydroxylienen beschrieben (80).

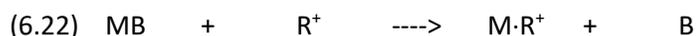
Durch Addition:



Die Adduktbildung kann neben einer assoziativen Anlagerung bei schwachen Basen zu einer neuen kovalenten Bindung führen (65). Das gebildete Ion ist stabiler als das vergleichbare Assoziationsprodukt. Die resultierenden Massen sind im Spektrum nicht zu unterscheiden.

Die Bildung von Additionsprodukten nach Gleichung (6.19) wird beschrieben für Amine mit Alkoholen, Äthern und Acetalen (65). Die Adduktbildung mit isotopenmarkierten Reaktantionen wird benutzt zur Molekulargewichtsbestimmung und Verfolgung von Fragmentierungssequenzen.

Durch Substitution:



Substitutionsreaktionen, als Äquivalent der SN₂-Substitution in Lösung, laufen in der Gasphase vergleichsweise häufiger ab. Austauschreaktionen, an denen Halogene beteiligt sind, laufen 10¹⁷-fach schneller ab. Die Ursachen hierfür liegen vor allem in der geringen Aktivierungsenergie von unter 0,2 eV (61). Generell werden Substitutionsreaktionen beobachtet, falls eine exotherme Reaktion vorliegt und eine Protonenübertragung nicht leicht möglich ist (72).

Viele Aromaten geben einen Peak bei (M+15)⁺, was auf eine Substitution von H durch ein O⁻-Radikal zurückzuführen ist (81). Bimolekulare Substitutionsreaktionen werden ebenfalls für Fluorid und Chlorid beschrieben (82). Fluorid ist hierbei das stärkere Nucleophil und verdrängt Chlorid aus Alkylhalogeniden. Chlorid selbst reagiert mit einer Reihe von alkylierenden und oxydierenden Substanzen, die andernfalls keine NCI-Spektren ergeben würden (68).

Substitutionsreaktionen sind von geringer Bedeutung in der Chemischen Ionisation, da nur minimale Strukturinformation zur Verfügung gestellt wird. Eine Identifizierung der Molmasse ist nicht möglich.

6.2.3. Elektronen-Molekül Reaktionen

Vergleichsweise wenig Aufmerksamkeit wurde bisher der Detektion von negativen Ionen zur Routineanalytik in der Massenspektrometrie gewidmet. Zum einen ist dies auf einen Mangel an notwendiger Geräteausstattung, aber im Wesentlichen auf einen völlig unterschiedlichen Entstehungsmechanismus zurückzuführen (60, 72).

6.2.3.1. Erzeugung von thermischen Elektronen

Der Beschuß eines Reaktantgases mit hochenergetischen Primärelektronen führt durch Kollision und damit verbundener Ionisierung des Gases zu Sekundärelektronen, die durch weitere Stöße mit neutralen Gasmolekülen ihre kinetische Energie nahezu verlieren. Wegen ihrer geringen inneren Energie (95% < 0,1 eV) (83) werden diese Elektronen allgemein als "thermische Elektronen" bezeichnet.

Gregor und Guilhaus (83) beschreiben die Effizienz der Erzeugung hoher thermischer Elektronendichten in Abhängigkeit von der Reaktantgasart. Der Einfangquerschnitt für Sekundärelektronen ist hier der bestimmende Parameter beim Abbremsen zu thermischen Elektronen. Der

Grad der Elektronenanlagerung und damit die Höhe des Signals für die Analysesubstanz zeigt bei den Edelgasen eine nahezu lineare Abhängigkeit vom Atomradius. Die erhaltenen Massenspektren weisen im Wesentlichen keine Unterschiede der relativen Intensitäten bei Verwendung verschiedener Gase auf.

Möglichkeiten zur Bildung von thermischen Elektronen bietet weiterhin die "Argon Entladung" nach Manfred von Ardenne (84) und das Arbeiten unter den Bedingungen der Chemischen Ionisation, wie diese zur Erzeugung positiver Ionen bereits eingesetzt wird.

6.2.3.2. Elektronen-Einfang Reaktionen (electron capture)

Bei gleicher Energie haben die Elektronen im CI-Plasma eine vielfach höhere Geschwindigkeit (Mobilität) als die an Masse schwereren Ionen:

$$\begin{aligned} (6.23) \quad E &= \frac{1}{2} m \cdot v^2 \\ m(e^-) &= 9,12 \cdot 10^{-28} \text{ g} \\ m(\text{CH}_5^+) &= 2,83 \cdot 10^{-22} \text{ g} \end{aligned}$$

Hieraus folgt eine 100-1000-fach höhere Empfindlichkeit bei Elektroneneinfang als Ionisierungsmethode gegenüber der durch Diffusion begrenzten Ionen-Molekül Reaktion (61, 85). Auf diese Weise können für Substanzen mit hoher positiver Elektronen-Affinität durch 'electron capture' höhere Empfindlichkeiten erreicht werden als durch positive Chemische Ionisation. Es wird durch die Anwendung der NCI möglich, Spurenkomponenten in komplexen biologischen Matrices nachzuweisen (59). Substanzen, die einen hohen NCI-Response haben, sind Verbindungen mit oxydierenden und/oder alkylierenden Eigenschaften. Diese Verbindungsklassen decken einen weiten Bereich von z.B. umweltrelevanten Kontaminanten ab, sodaß im Nachweis und der Bestimmung von Umweltgiften ein wesentliches Anwendungsgebiet der NCI zu finden ist (86).

Die Elektroneneinfangreaktion unter NCI-Bedingungen wird häufig mit der ECD-Technik verglichen. Substanzen, die einen guten ECD 'response' aufweisen, werden ebenfalls durch NCI empfindlich nachgewiesen (87, 88).

Die Vorteile der NCI-Massenspektrometrie liegen gegenüber der ECD-Detektion darin, daß neben der Retentionszeit des GC-Laufes die Massenauflösung einen zusätzlichen Informationsbetrag liefert. Über das Massenspektrum ist eine positive Identifizierung der Analysesubstanz möglich. Koeluate werden über die Maximierung einzelner Massen sicher erkannt. Mit der Information über das Molekulargewicht und eventueller Fragmentierungsmechanismen werden substanzspezifische absolute Parameter verfügbar.

In der Praxis wird eine deutliche Verringerung des chemischen Untergrundes erkennbar. Es zeigt sich hier, daß viele Substanzen, die der biologischen Matrix zuzuordnen sind, negative Ladungen nicht stabilisieren können und somit massenspektrometrisch im NCI nicht angezeigt werden. Auf diese Weise werden Analysenverfahren möglich, die wenig aufgearbeitete Extrakte über den Festprobeneinlaß dem MS zuführen. Die Verringerung des Untergrundes, das Wegfallen von Derivatisierungen und das Einbringen höherer Gesamtmengen führt zu Nachweisempfindlichkeiten bis in den ppt-Bereich (86).

Parallelen zur ECD-Technik finden sich in der Erzeugung von nahezu thermischen Elektronen, die in analoger Weise Elektronen-Molekül Reaktionen eingehen. Das Signal ergibt sich beim ECD indirekt über die Abschwächung der Elektronendichte bei Elution ECD-aktiver Verbindungen (89).

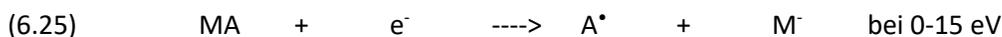
6.2.3.3. Resonanzeinfang (resonance electron capture)



Die bedeutendste Reaktion zur Erzeugung negativer Ionen stellt der Resonanzeinfang von thermischen Elektronen nach Gleichung (6.24) dar. Der auf das Substanzmolekül übertragene Energiebetrag ist minimal und liegt nahe bei 0 eV. Der Resonanzeinfang ist somit eine der schonendsten Ionisierungsreaktionen der NCI. In vielen Fällen ist diese Reaktion gleichzeitig mit anderen NCI-Umsetzungen zu beobachten. Insbesondere stark halogenhaltige Verbindungen z.B. mehr als 6 Cl-Substituenten im Molekül werden durch Elektroneneinfang empfindlicher nachgewiesen als durch Elektronenstoßionisation (71).

Der Schlüssel zur sensitiven Detektion negativer Ionen durch Resonanzeinfang liegt in der Erzeugung einer genügend hohen Population von thermischen Elektronen. Das nach Gleichung (6.24) gebildete Molekülanion ist stabil, falls die Elektronenaffinität des Moleküls M größer ist als die kinetische Energie des Elektrons. Die Intensität der Bildung von $M^{\bullet -}$ hängt bei ausreichender Elektronendichte von der Elektronenaffinität des Probenmoleküls ab, dem Energiespektrum der Elektronenpopulation und der Häufigkeit, mit der gebildete Molekülanionen zur Stabilisierung mit Neutralteilchen kollidieren (Kollisionsstabilisierung) (86).

6.2.3.4. Dissoziativer Resonanzeinfang (dissociative electron capture)



Treffen Sekundärelektronen mit einer Energie von bis zu 15 eV auf das Probenmolekül, kann die Spaltung des Moleküls eintreten. Die überschüssige Energie wird nicht ausreichend durch Rotation und Vibration aufgefangen, sodaß Kollision mit Neutralteilchen zur Stabilisierung des Ions führen könnte. Das Molekül bildet unter Abspaltung eines höherenergetischen Radikals ein stabiles Anion (61, 77).

Der Beitrag des dissoziativen Resonanzeinfanges am Gesamtaufkommen negativer Ionen hängt im Wesentlichen von der Energieverteilung innerhalb der Elektronenpopulation ab. Dougherty beschreibt für die Bildung von Anionen nach Gleichung (6.25) Elektronenenergien mit einem Optimum von wenig über 12 eV (86). Die Reaktion (6.25) ist ebenfalls neben der Ionenpaarbildung (s. Kap. 6.2.3.5.) für die Entstehung geringer Intensitäten von negativen Ionen unter EI-Bedingungen verantwortlich.

6.2.3.5. Ionenpaar Bildung (ion pair production)



Bei einer Energie der Elektronen von über 10 eV werden Prozesse beobachtet, die zu einer Spaltung des Probenmoleküls in ein Kation und ein Anion führen.

Unter EI-Bedingungen ist diese Reaktion (6.26) im Wesentlichen an der Bildung negativer Ionen beteiligt. Die Intensitäten sind um den Faktor 10 bis 1000 niedriger als für positive Ionen (61). Die Elektronenaffinität des Moleküls AB ist erheblich zu niedrig, um ein hochenergetisches Elektron zur Bildung des Molekülanions einzufangen.

Für die Ionisation unter CI-Bedingungen ist die Ionenpaar-Bildung von marginaler Bedeutung, da die Wahl der CI-Meßbedingungen Umsetzungen mit niedriger Energiebilanz optimiert.

6.2.3.6. Neutralisierungsprozesse

Positive Ionen stabilisieren ihre Ladung bei hoher innerer Energie länger als negative Ionen (86). Lediglich die Abstraktion eines Elektrons von einem Neutralteil oder der Elektroneneinfang führen zum Ladungsausgleich. Die Abstraktion eines Protons unterliegt als bimolekulare Reaktion der durch Diffusion begrenzten Umsatzrate.

Negative Ionen können leicht ein Elektron an ihre Umgebung abgeben ('autodetachment'), insbesondere, falls die innere Energie des Ions die Elektronenaffinität des korrespondierenden Neutralteils übersteigt (86). Ein Energieaustausch erfolgt unter Beibehaltung der Ladung durch Kollision mit Neutralteilchen, sodaß infolge mehrfacher Stöße stabile Anionen entstehen. Das Ausmaß der Kollisionsstabilisierung ist von der mittleren freien Weglänge in der Ionenquelle abhängig. Der Wahl des optimalen Reaktantgas Quellendruckes kommt daher in diesem Zusammenhang eine stärkere Bedeutung zu, als bei der positiven Chemischen Ionisation.

6.3. NCI in der Rückstandsanalyse

Die negative Chemische Ionisation eröffnet ein breites Spektrum an Charakteristika und Wahlfreiheiten, die diese Methode in der Rückstandsanalyse einsetzbar erscheinen lassen. Der biologische 'background' als nichtabtrennbarer Rückstand der Matrix aus der Probenaufarbeitung wird stark vermindert angezeigt. Mit Ausnahme von freien Carboxyl-Gruppen und wenigen prosthetischen Gruppen sind die Biomoleküle in der NCI transparent (68). Die Ursache ist darin zu finden, daß Biomoleküle funktionsbedingt negative Elektronenaffinitäten besitzen und Elektronen in der Gasphase nur schwach anlagern (86).

(Toxische) Kontaminanten in Nahrungsmitteln und der Umwelt liefern dagegen häufig intensive NCI-Spektren. Wegen ihrer teils oxydierenden Substanzen oder alkylierenden Eigenschaften besitzen diese hohe Elektronenaffinitäten, die zum Einfang von Elektronen in der Gasphase oder zur Anlagerung von Anionen führen können und damit stabile Ionen bilden (90,91).

Derivatisierungen mit dem Ziel der günstigeren Chromatographierbarkeit werden häufig mit perfluorierten Derivaten durchgeführt (z.B. Heptafluorbuttersäure-Anhydrid, Perfluorbenzoyl-Chlorid), um gleichzeitig hohe positive Elektronenaffinitäten für einen sensitiven Nachweis einzuführen. Dies gilt ebenso für Analysen mit dem Elektroneneinfang-Detektor.

Aus Gründen der stetigen Verdünnung der Analysesubstanz während der Aufarbeitung (92), des Verlustes durch Absorption an Glasgeräten und des Eintragens zusätzlicher Kontaminanten durch

Gerätschaft und Chemikalien muß bei der Spurenanalyse (Rückstandsanalyse im ppb-Bereich) auf eine hohe Aufreinigung verzichtet werden. Die eingesetzte Identifizierungsmethode kann somit als Endpunktbestimmung der Aufarbeitung angesehen werden. Wird das Signal der verbleibenden umgebenden Matrix als Rauschen bezeichnet, ergibt sich mit jedem weiteren Aufarbeitungsschritt eine kalkulierbare Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses. Die Anforderungen an die Nachweismethode steigen jedoch, da die Absolutmenge der Zielsubstanz sich stetig verringert (s. Abb. 3).

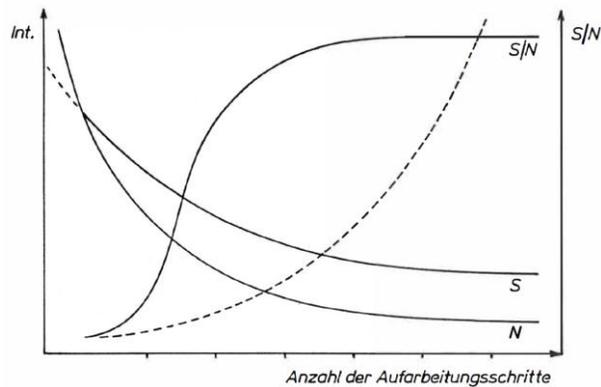


Abb. 3: Signalverlauf in Bezug auf die Anzahl der Aufarbeitungsschritte (die unterbrochene Linie spiegelt die für die Analysenmethode erforderliche Leistungsfähigkeit wieder).

Die negative Chemische Ionisation liefert mit den gegebenen Eigenschaften die Möglichkeit, die Bestimmung der Zielsubstanz schon nach einer möglichst geringen Zahl von Aufarbeitungsschritten mit der notwendigen Empfindlichkeit durchzuführen. Hauptgesichtspunkt ist die Wahl eines geeigneten Reaktantgases zur selektiven Ionisierung, das ein minimales 'clean-up' der Probe zulässt. Es ist hierbei essentiell zu ermitteln, zu welchem Ausmaß andere Komponenten ionisiert werden oder, ob Ionen gebildet werden, die mit gleicher Masse die Ionen der Zielsubstanz überlagern.

Als Einlaß-System zur Analyse gering aufgearbeiteter Extrakte kommt wegen der hohen nichtflüchtigen Matrixanteile nur der Festproben-Einlaß zur Anwendung, Hierbei kann der Einsatz einer Schubstange mit 'extended probe'-Modifikation (93 1 94) entscheidende Vorteile bei der Rückstandsanalyse bringen. Die Probenlösung wird auf die Stabspitze aufgetragen und damit direkt in das CI-Plasma positioniert. Die Ionisierung erfolgt hierdurch innerhalb kürzester Zeit und führt zur Steigerung des Signal/Rausch-Verhältnisses gegenüber der herkömmlichen Arbeitsweise mit Quarz- oder Aluminiumtiegel zur Probenaufnahme bei der 'solid probe'-Technik.

6.4. Problemstellung

Durch die beschriebenen Proteinbindungsmethoden RIA und ÖRT können Screeninguntersuchungen sehr empfindlich und effizient durchgeführt werden. Positive Befunde bedürfen aber der Absicherung durch eine unabhängige Methode, wobei heute ein positiver Wirkstoffnachweis im erforderlichen Empfindlichkeitsbereich allein durch Einsatz der Massenspektrometrie erreicht werden kann. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer massenspektrometrischen Methode auf Grundlage der negativen Chemischen Ionisation mit selektiven Reaktantgas-Gemischen zum Nachweis von DES. Ziel ist die

Verwendbarkeit der bereits für die Proteinbindungsmethoden anfallenden stark matrixhaltigen Probenlösungen aus den verschiedenen Stufen des 'clean-up' vom Rohextrakt bis hin zur aufgereinigten HPLC-Fraktion durch Verwendung der Festproben-Schubstange mit 'extended probe'-Modifikation. Dadurch wird beim Vorliegen von positiven Screeningresultaten sofort eine Referenzanalyse mit dem identischen Aufarbeitungsextrakt möglich. Eine erneute zeitintensive Probenaufarbeitung würde damit entfallen.

Ein solcher Ansatz ist bisher für die Rückstandsanalyse von anabolen Wirkstoffen in Fleisch nicht unternommen worden.

7. Experimenteller Teil

7.1. Probenmaterial

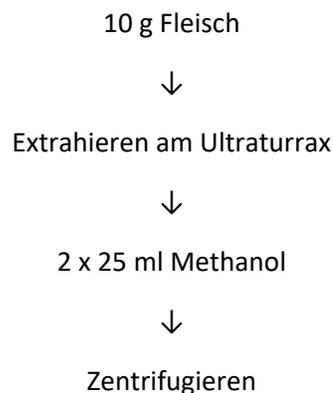
Für die 'real-life'-Analysen wurden Lamm- und Kalbfleischproben aus dem Berliner Lebensmitteleinzelhandel verwendet. Die Herkunft und Vorgeschichte der Proben waren nicht bekannt. Zur Ausarbeitung der Methode wurde einem Teil der Fleischproben vor dem Homogenisieren DES in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

Es kamen weiterhin tiefgefrorene Kalbfleischproben zur Verwendung, die aus einem kontrollierten Fütterungsversuch unter Anwendung von DES und DIEN stammten. Die Proben wurden vom Bundesgesundheitsamt im Rahmen der Entwicklung einer amtlichen Methode zur Bestimmung von Rückständen östrogenen Anabolika in Lebensmitteln dem Institut zur Verfügung gestellt.

7.2. Aufarbeitung

Die Aufarbeitung der Fleischproben gliedert sich in die Abschnitte Extraktion, Gelchromatographie und HPLC. Die erhaltenen Extrakte können sowohl für Proteinbindungsmethoden als auch für die NCI-MS Bestimmung eingesetzt werden (s. Abb. 34). Die Extraktionsschritte und die Durchführung der HPLC folgen der von H. Grohmann (43) beschriebenen Methode.

7.2.1. Extraktgewinnung



5 min bei 3000 Upm



Überstand über Quarzwatte dekantieren

in 250 ml Schütteltrichter



Aussalzen

100 ml 6%ige NaCl-Lösung



Extrahieren

3 x 20 ml Toluol



Waschen der Toluol-Phase

20 ml dest. Wasser



Waschen der Toluol-Phase

50 ml 0.1 m NaHCO₃-Lösung (pH 10, 35)



Einengen der Toluol-Phase am Rotationsverdampfer

mit wenig Methanol

a.) Zur Verwendung für die NCI-MS Analyse



Konzentrat mit Methanol

auf definiertes Volumen bringen

b.) Bei Weiterverarbeitung



Trockenrückstand

(in verschließbaren Reacti-Vials)

7.2.2. Gelchromatographie

Der nach der Extraktion gewonnene Trockenrückstand wird in Ethylacetat aufgenommen und quantitativ auf eine Gelsäule übertragen. Das Verfahren der Gelchromatographie wird in analoger Weise zu der von W. Specht und M. Tillkes (95, 96) durchgeführten Aufreinigung von Pflanzenextrakten zur Pestizidanalyse eingesetzt.

Als Trennsäulenmaterial wurde Bio-Beads 5-X3 (200-400 mesh) eingesetzt. Das Laufmittel war ein Cyclohexan/Ethylacetat Gemisch 1:1 v/v) mit einer Förderrate von 5,0 ml/min. Das Volumen der Probenschleife betrug 5.0 ml. Die Eichung der Säule wurde mit Tritium-markiertem Standard als Dotierung zu einer fetthaltigen Matrix durchgeführt, wobei in Abständen von 2 min Fraktionen zu je 10 ml gesammelt wurden.

Zusammensetzung der Testmischung:

100 000 cpm DES*

5 g Pflanzenöl

in 25 ml Elutionsmittel

Die einzelnen Fraktionen werden nach dem Eindampfen des Elutionsmittels und Trocknung zur Feststellung der Lipidelution gewogen. Zur Identifizierung der anabolikahaltigen Fraktion(en) werden Aliquote der gesammelten Fraktionen (3x je 200 µl) mit 5 ml Szintillator-Lösung versetzt und ausgezählt.

Um einen selbsttätigen halbautomatischen Betrieb der zeitintensiven Gelpermeations-Trennung zur alleinigen Sammlung der geeichten anabolikahaltigen Fraktionen zu ermöglichen, wurde ein Steuergerät entwickelt, das die folgenden Funktionen ausführte:

- a.) freie Wahl des Vorlauf-Volumens
- b.) freie Wahl des Fraktions-Volumens
- c.) selbsttätiges Ausschalten und/oder Signal nach Ende der Analyse
- d.) laufende Anzeige des Betriebszustandes

Als zentrale Bauteile zur Füllstandsindikation wurden NTC-Widerstände verwendet. Die Umschaltung zur Fraktionssammlung wurde über ein Dreiwegventil mit minimalem Innenvolumen (Fa. Labomatic) realisiert.

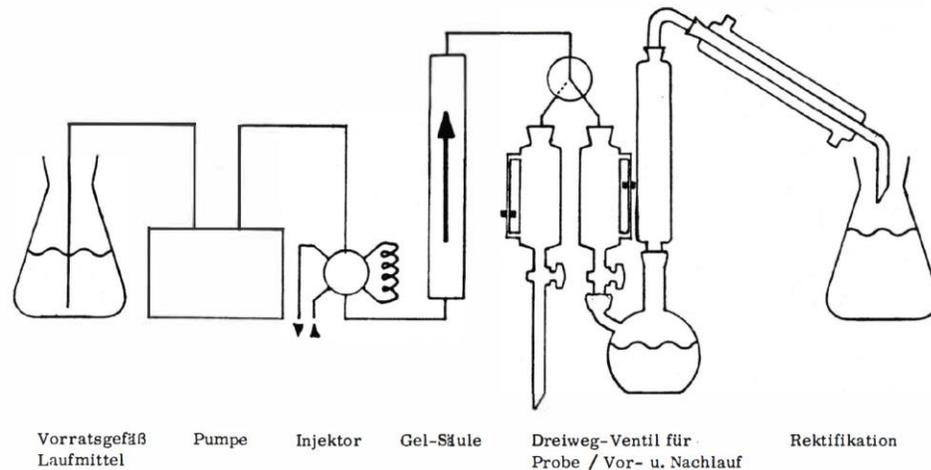


Abb. 4: Prinzipschaltbild der Gelchromatographie (Schaltung der Steuereinheit s. Anhang)

Der Vorlauf jeder Analyse reinigt gleichzeitig die Trennsäule. Das komplette Eluat, das nicht für die geeichte Probenfraktion geschnitten wird, läuft in ein Sammelgefäß, das bei Bedarf direkt in eine Destillationsanlage entleert werden kann.

7.2.3. Fraktionierung durch HPLC

Eine Fraktionierung durch HPLC ist notwendig, um den zu Screeningzwecken eingesetzten Östrogen-Rezeptor Test ebenfalls zu Einzelbestimmungen heranziehen zu können. Die Selektivität ist durch die Auflösung der Trennung gegeben (43).

Zum Nachweis von Substanzen, für die ausreichend aktive Antiseren zur Verfügung stehen, kann mit Erfolg anstelle des ÖRT ein Immunassay durchgeführt werden. Die Interpretation kann bei der immanenten Unsicherheit positiver Ergebnisse auf diese Weise durch den zweiten Parameter Retentionszeit unterstützt werden.

Als HPLC-Pumpe wird ein Modell Gynkothek 600 eingesetzt. Das Elutionsmittel setzt sich zusammen aus Methylenchlorid und iso-Octan (80:20) mit einem Zusatz von 1,7 % Methanol (43). Die Flußrate beträgt 1 ml/min. Als Probenaufgabeschleife wurde eine 100 µl Schleife verwendet. Eine Verbreiterung der eluierenden Peaks konnte im Vergleich zu einer standardmäßigen 20 µl Schleife nicht festgestellt werden. Die Trennsäule, Knauer LiChrosorb Si60 7 µm (Länge 25 cm, ID 0,4 cm) ist durch eine Schaltungsanordnung mit einer Vorsäule verbunden. Diese ist mit dem gleichen Füllmaterial versehen wie die Trennsäule. Nachdem die Abtrennung der nachzuweisenden Anabolika von den Hauptbegleitstoffen des Fleischextraktes erfolgte und diese auf die Trennsäule übertragen wurden, wird die Vorsäule mit mindestens der doppelten Elutionsmenge zurückgespült (s. Abb. 5a-c). Nach Beendigung des Rückspülens, wird die Chromatographie auf der Trennsäule weitergeführt.

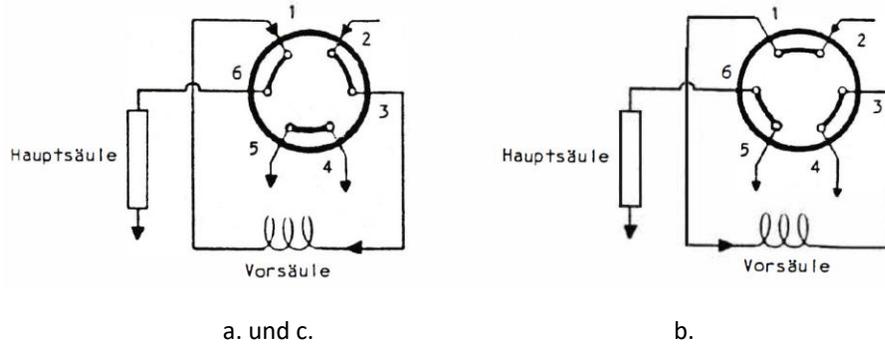


Abb. 5: Säulenschaltung zur HPLC-Trennung
 a. Vortrennung über Vorsäule
 b. Rückspülen der Vorsäule
 c. Chromatographie

Da die Anabolika während der Analyse wegen ihrer geringen Konzentrationen und der geringen Extinktionskoeffizienten kein deutlich über dem Untergrund liegendes Signal erzeugen, kann die Trennung nicht mit einem UV-Detektor verfolgt werden. Als Nachweisgrenze für die UV-Detektion werden 50-100 ng Substanz angegeben (43). Die Elutionsvolumina der einzelnen Substanzen müssen daher durch eine Eichung vor der Analyse bestimmt werden. Die Eichung des HPLC-Systems erfolgt über eine Standardmischung, die je 1 µg E-OST, DES, HEX, DIEN, OST und ZER enthält. Bei nicht befriedigender Auflösung kann der Methanolanteil des Laufmittels entsprechend variiert werden.

Die UV-Detektion erfolgt mit einem ZEISS Photometer PM 2D, das mit einer 8 µl Durchflusszelle ausgerüstet ist. Die Meßwellenlänge beträgt 270 nm.

Ebenfalls zur Eichung werden tritiummarkierte Analoge von DES, OST und ZER eingesetzt. Zur Erstellung des Konzentrationsprofils werden Fraktionen zu je 1.0 ml gesammelt. Der Fraktionswechsel wird auf dem UV-Chromatogramm durch Senkrechten angezeigt. Die gesammelten Fraktionen werden mit 5 ml Szintillator-Flüssigkeit versetzt und ausgezählt. Die als cpm (counts per minute) ausgewiesenen Intensitäten aufgetragen entsprechend der Fraktionsnummer zeigen als Histogramm die zur Einzelbestimmung zu verwendenden Anteile.

In Abb. 6 sind beide Methoden einander gegenübergestellt. Es wird eine sehr gute Korrelation erreicht. Um ein Verschleppen der Eichsubstanzen in die Analyse auszuschalten, wird nach jeder Eichung dreimal Fleischextrakt injiziert, dessen Eluat verworfen wird. Hierbei wird gleichzeitig die Trennsäule mit biologischem Material konditioniert.

Die aus dem Aufarbeitungsgang erhaltenen Trockenrückstände werden in einer definierten Menge methanolhaltigem Elutionsmittel (5-10%) aufgenommen und vollständig darin gelöst. Nach kurzem Zentrifugieren wird der Überstand für die HPLC-Trennung eingesetzt.

Pro Substanz und Analyse werden 4-5 Fraktionen zu je 1,0 ml gesammelt. Um hohe Nachweisempfindlichkeiten zu erreichen, sollten die Fraktionswechsel so gewählt werden, daß die Anabolika in möglichst einer Fraktion eluieren. Die qualitative Nachweissicherheit wird jedoch wesentlich erhöht durch die Aufnahme eines Konzentrationsprofils. Mit der Hinzunahme jeweils benachbarter Fraktionen kann Auskunft über die Blankwerte der Fleischprobe erhalten werden.

Bei der späteren Zuordnung der Fraktionen entsprechend der Eichung hat sich die Verwendung eines Signalgebers bewährt, der bei jedem Fraktionswechsel dem Schreiber einen Impuls übermittelt, der in Form einer Senkrechten von der Detektorspur bis zur Basislinie aufgezeichnet wird.

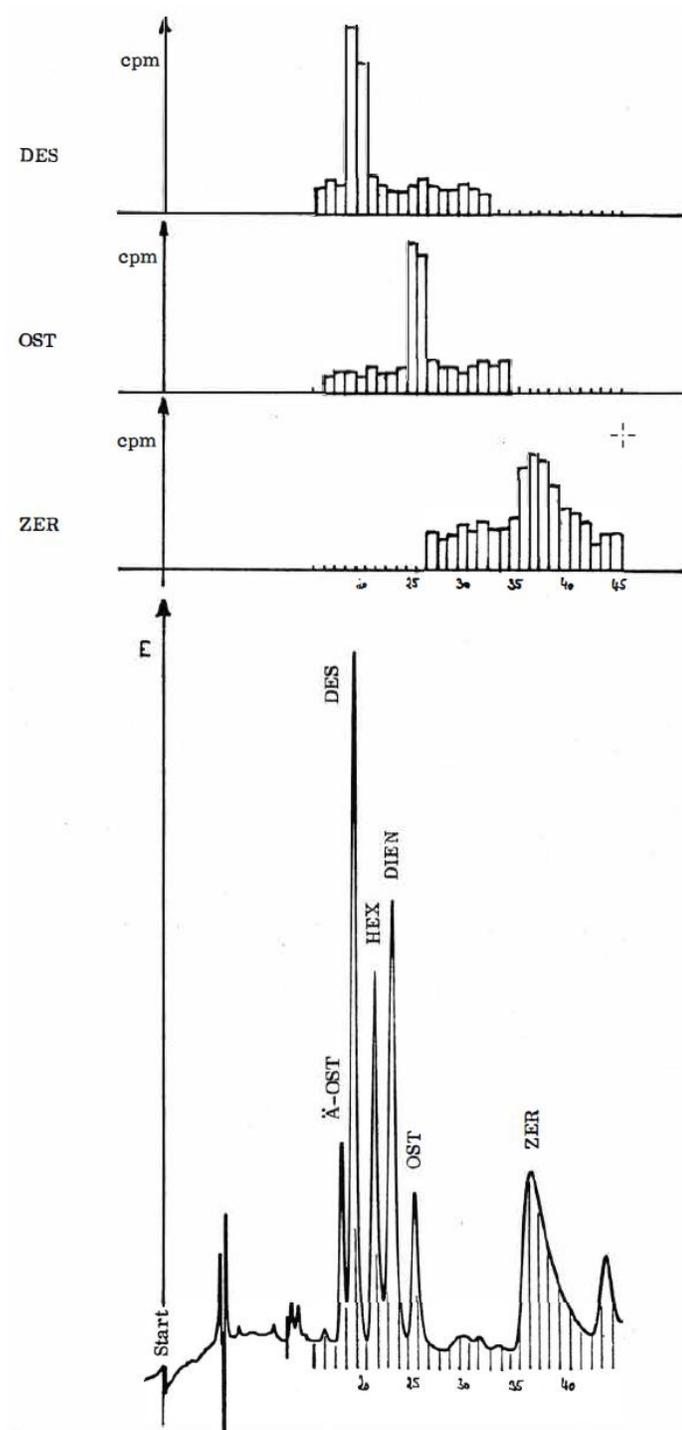


Abb. 6: Eichung der HPLC über UV-Detektion und Tritium-markierte Analoge

7.3. Durchführung des Östrogen-Rezeptor Tests

Das von G. Ingerowski und H.-J. Stan (21, 29) entwickelte Screening-Verfahren beruht auf der kompetitiven Bindung von tritiummarkiertem Hormon und östrogenaktiven Substanzen um die Bindungsstellen des Östrogenrezeptors.

Die Rezeptorpräparation wurde entsprechend der angegebenen Vorschrift aus ausgewählten Rinderuteri (Alter, Cyclus) durchgeführt und tiefgefroren (-35 °C) aufbewahrt (43, 29). Die Bestimmung der Aktivität der Cytosol-Lösung erfolgt über den 50%-Bindungswert. Hierzu wird analog dem unten beschriebenen Analysenschema eine konstante Substratmenge an tritiummarkiertem OST* vorgegeben und mit variablen Rezeptormengen versetzt. Die Rezeptormenge, die 50% der vorgegebenen Substratmenge bindet, wird für den späteren Test eingesetzt.

Die Eichung erfolgt mit ethanolischen Eichlösungen mit Gehalten von 10 - 3000 pg Substanz (OST oder DES). Ein Eichansatz ist mit jeder durchzuführenden Analyse mitzuführen, um systematische Fehler durch Reagenzien- und Rezeptorzubereitung, Zeitverlauf und Temperatur zu eliminieren.

Die praktische Durchführung des Tests richtet sich zur besseren Übersicht nach einem Pipettierschema, das alle Pipettier-Vorgänge in Reihenfolge mit Mengenangaben erfasst. Als Gefäße haben sich verschließbare Eppendorf-Kunststoffreaktionsgefäße bewährt.

Gefäß Nr.	Eichwert	Ethanol	Puffer	³ H-OST	Rezeptor-Lösung	Kohle Suspension
	pg/20µL	µl	µl	µl	µl	µl
1	-	20	600	500	-	-
2	-	20	600	500	-	-
3	-	20	100	500	100	500
4	-	20	100	500	100	500
5	3000	-	100	500	-	500
6	3000	-	100	500	-	500
7	10	-	-	500	100	500
8	10	-	-	500	100	500
9	30	-	-	500	100	500
10	30	-	-	500	100	500
11	100	-	-	500	100	500
12	100	-	-	500	100	500
13	300	-	-	500	100	500
14	300	-	-	500	100	500
15	1000	-	-	500	100	500
16	1000	-	-	500	100	500
17	3000	-	-	500	100	500
18	3000	-	-	500	100	500
19	-	20	-	500	100	500
20	-	20	-	500	100	500
21	-	20	-	500	100	500
22	-	20	-	500	100	500
usw.						

Abb. 7: Pipettierschema ÖRT

Es werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Reaktionsgefäße 1 und 2 ergeben den 100% -Absolutwert der eingesetzten Radioaktivitätsmenge, Gefäße 3 und 4 den 100%- Bindungswert an das Rezeptorprotein. Die Gefäße 5 und 6 fungieren als Blindwert ohne Rezeptorlösung, gefolgt von der Eichreihe in Gefäßen 7 bis 18. Direkt anschließend reihen sich die Fleischproben ein. Das Gesamtvolumen ist jeweils konstant und wird durch variierenden Puffermengen angeglichen.

Zur Durchführung des ÖRT werden folgende Reagenzien angesetzt. Wässrige Lösungen sind ausschließlich mit bidestilliertem Wasser herzustellen.

Puffer: Tris-Puffer pH 8,0
1,2 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0.37 g Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)
2,5 g Saccharose
in 1,0 l bidest. Wasser lösen, mit HCl auf pH 8,0 einstellen

³H-OST 17β-östradiol (2,4,6,7-³H)-Lösung (Fa. Amersham/Buchler)
³H-OST nach Abblasen des Lösungsmittels
in Tris-Puffer im Ultraschallbad lösen;
Aktivität 10000 cpm/500 µl

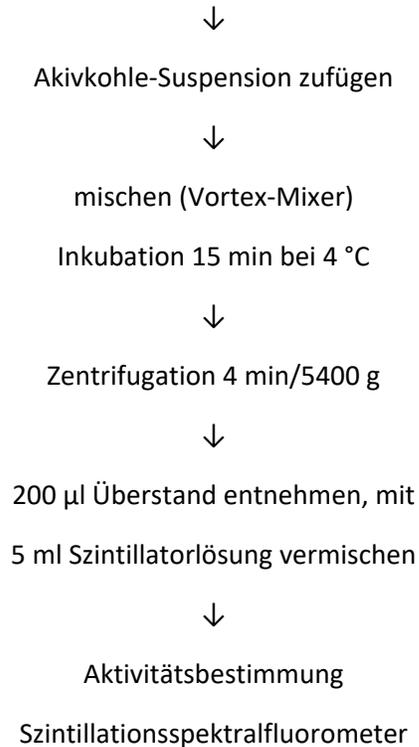
Kohlesuspension:

0,1 g Gelatine werden unter Erwärmen in 200 ml Tris-Puffer gelöst.
Die abgekühlte Lösung wird mit 0,5 g Norite A und 5 mg Dextran versetzt.
Die Suspension muß mit einem Vortex-Mixer 20 min gründlich geschüttelt werden.

Zu Testbeginn muß die ³H-OST-Lösung jeweils frisch bereitete werden. Alle Reagentien sollten im Kühlschrank aufbewahrt werden und bei Verwendung eine Temperatur von 4°C nicht überschreiten.

Ablauf des Östrogen-Rezeptor Testes:

500 µl Eluat der HPLC-Fraktion
unter N₂ zur Trockne bringen
(bzw. Leergefäß der Eichreihe)
↓
zufügen von Ethanol, Puffer, ³H-OST
und Rezeptor lt. Tabelle
↓
mischen (Vortex-Mixer)
Inkubation über Nacht bei 4 °C
(37 °C, 1h)



Auswertung:

Zur Analyse gelangen die entsprechend der Eichung ermittelten anabolikahaltigen HPLC-Fractionen, sowie je zwei Fractionen vor und hinter dem eluierenden Peak. Aus den gemessenen Aktivitäten in cpm des Szintillationszählers wird für jede untersuchte HPLC-Fraktion wie für die Eichreihe die prozentuale Menge gebundenen markierten 17β-Östadiols berechnet:

$$m = \frac{(c - b)}{h} \cdot 100\%$$

mit c Ergebnis der Szintillationsmessung in cpm für Fractionen u. Eichpunkte
 b Aktivität des Blindwertes in cpm
 h Aktivität des 100%-Bindungswertes in cpm

Die erhaltenen Werte für die Eichreihe werden gegen die Logarithmen der Konzentrationen aufgetragen. Die unbekannt Konzentrationen ergeben sich aus der Eichkurve. Der Gesamtgehalt an östrogenwirksamen Substanzen ergibt sich durch Addition der Östrogengehalte in den gesammelten Fractionen unter Berücksichtigung der vor und nach dem Substanzpeak ermittelten Leerwert-Fractionen.

7.4. Durchführung des Radioimmunassay

Als spezifisches Bindungsprotein wird für den Radioimmunassay ein DES-spezifisches Antiserum (H 3073 Op. Nr. 254, Fa. Hoechst) eingesetzt. Das Serum weist Kreuzreaktivitäten für HEX und DIEN von unter 10%. auf (Herstellerangabe).

Für die Analyse von DIEN und ebenfalls auch für DES wurde ein polyvalentes Anti-Stilben-Serum (H 3074, Op. Nr. 6139, Fa. Hoechst) eingesetzt.

Die verwendeten Seren werden nach den Vorschriften des Herstellers in Gelatine-Phosphat Puffer gelöst. Zur Ausführung des Assays werden die folgenden Reagentien benötigt. Wässrige Lösungen müssen mit bidestilliertem Wasser hergestellt werden.

Puffer: Gelatine-Phosphat Puffer pH 7.2
 1,4 g Kaliumhydrogenphosphat
 4,2 g Dinatriumhydrogenphosphat
 0,16 g Natriumazid
 in 1,0 l bidest. Wasser lösen, darin unter Erwärmen
 0,5 g Gelatine lösen

³H-DES: monoethyl- ³H-Diethylstilbestrol-Lösung (Fa. Amersham-Buchler)
 ³H-DES wird nach Abblasen des Lösungsmittels
 in Gelatine-Phosphat Puffer im Ultraschallbad gelöst;
 Aktivität 10000 cpm/100 µl

Kohlesuspension:
 Holzkohlesuspension 0,2 g/100 ml bidest. Wasser
 Die Suspension muß vor Verwendung gründlich
 am Vortex-Mixer geschüttelt werden.

In jedem Testansatz ist eine Eichreihe mitzuführen (Gefäße 5 bis 20, s. Abb. 8). Die Eichlösungen werden mit Pufferlösung erstellt. Die exakt eingesetzte ³H-DES Menge wird über den TA-Wert (total activity) Gefäße 1 und 2 ermittelt; der NSB-Wert (non-specific bound) Gefäße 3 und 4 erhält kein Antiserum und liefert den Blindwert für die Szintillationszählung. Die Analysenwerte schließen sich an.

Die Durchführung des Assays erfolgt in verschließbaren Einweg-Kunststoff-Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf) nach der von Hoffmann (44, 97) empfohlenen Methode.

500 µl Eluat der HPLC-Fraktion
unter N₂ zur Trockne bringen
(bzw. Leergefäß der Eichreihe)
↓
zufügen von Puffer, ³H-DES
und Antiserumverdünnung lt. Tabelle
↓
mischen (Vortex-Mixer)
↓
Inkubation über Nacht bei 4 °C

(37 °C, 1h)



Holzkohle-Suspension zufügen



mischen (Vortex-Mixer)

Inkubation 15 min bei 4 °C



Zentrifugation 4 min/5400 g



200 µl Überstand entnehmen, mit

5 ml Szintillatorlösung vermischen



Aktivitätsbestimmung

Szintillationsspektralfluorometer

Gefäß Nr.	Eichwerte	Puffer	³ H-DES	Antiserum Verdünnung	Kohle Suspension
	pg/100 µl	µl	µl	µl	µl
1	-	1200	100	-	-
2	-	1200	100	-	-
3	-	700	100	-	500
4	-	700	100	-	500
5	-	600	100	100	500
6	-	600	100	100	500
7	10	500	100	100	500
8	10	500	100	100	500
9	20	500	100	100	500
10	20	500	100	100	500
11	50	500	100	100	500
12	50	500	100	100	500
13	100	500	100	100	500
14	100	500	100	100	500
15	200	500	100	100	500
16	200	500	100	100	500
17	500	500	100	100	500
18	500	500	100	100	500
19	1000	500	100	100	500
20	1000	500	100	100	500

21	-	600	100	100	500
22	-	600	100	100	500
23	-	600	100	100	500
24	-	600	100	100	500
usw.					

Abb. 8: Pipettierschema RIA

Zur Auswertung werden über die Aktivitätswerte aus der Szintillations-Messung die Bindungsraten m pro Fraktion berechnet:

$$m = \frac{(c - b)}{h} \cdot 100\%$$

mit c Aktivität von Eichwerten und Analysen in cpm
 b Aktivität des NSB-Wertes in cpm
 h Aktivität des Null-Wertes in cpm

Die für die Eichreihe erhaltenen Ergebnisse werden gegen die Logarithmen der Konzentrationen aufgetragen.

Gemeinsam mit den aus der HPLC-Eichung ermittelten anabolikahaltigen Fraktionen werden je zwei Fraktionen vor und nach dem eluierenden Peak für die Analyse geschnitten. Die erhaltenen Leerwerte werden gemittelt und von den Werten der wirkstoffhaltigen Fraktionen subtrahiert. In der Regel unterstützt die Anfertigung eines Konzentrationsprofils die Bewertung der Resultate.

7.5. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an einem Finnigan 4023 Instrument mit PPINICI Option durchgeführt. Es erlaubt die simultane Detektion von positiven und negativen Ionen.

7.5.1. Konstruktion des Reaktantgas-Mischsystems

Abbildung 9 zeigt das Schema des Reaktantgas Mischsystems. Es wurde speziell für das Finnigan Massenspektrometer angefertigt (heizbare Mischkammer: Fa. Finnigan; Steuerung u. Installation Eigenbau) und anstelle der werkseitig vorgesehenen CI-Gas Versorgung für die hier beschriebenen Experimente eingebaut. Die Konstruktion basiert auf Arbeiten von W. Blum und W.J. Richter (98), die eine solche Anordnung zum schnellen Wechsel unterschiedlicher Reaktantgase eingesetzt haben. Das Mischsystem ermöglicht die simultane Zuführung und Mischung von bis zu vier Komponenten, von denen zwei als Flüssigkeiten vorliegen können.

Die Reaktantgas-Leitungen RG1 bis RG4 sind von den Druckflaschen durch jeweils ein Paar Magnetventile (Predyne, New Britain, Conn.) getrennt. Diese sind in entgegengesetzter Richtung geschaltet, sodaß ein eventuelles Öffnen durch Druckanstieg im System sicher verhindert wird. Die Leitungen RG1 und RG2 ermöglichen wahlweise die Zuführung von permanenten Gasen oder dem Inhalt aus dem Dampfraum über Flüssigkeiten RG1' und RG2'. Die Leitungen RG3 und RG4 werden benutzt, um Hauptkomponenten der Mischung zuzuführen. Die Regulierung erfolgt über die Nadelventile NV3 und NV4.

Um die Zuführung und Regulierung von Flüssigkeitsdämpfen zu ermöglichen, wurden sämtliche Teile, mit denen die Dämpfe in Kontakt kommen können, in einem isolierten heizbaren Metallgehäuse untergebracht (im Schema eingerahmt). Die Temperaturkontrolle erfolgt über einen PT100-Meßwiderstand.

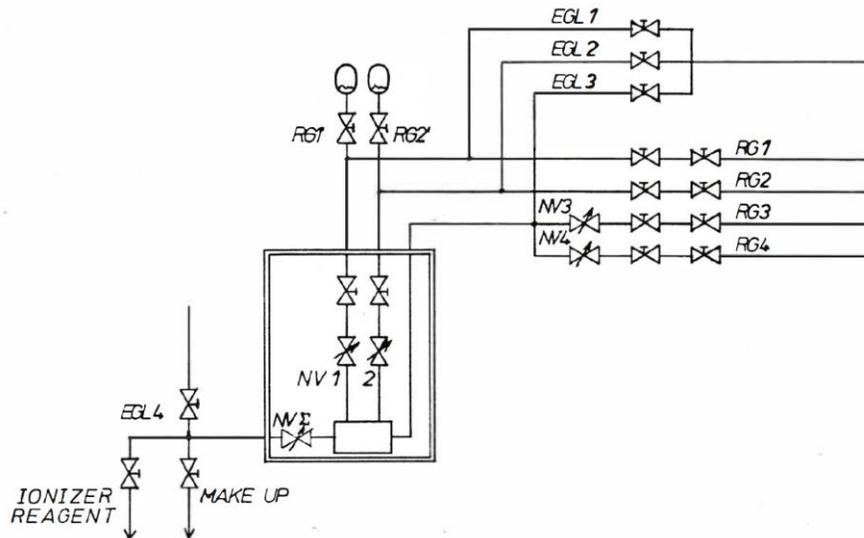


Abb. 9: Reaktantgas-Mischsystem

RG1 – RG4	Reaktantgaszuführungen
RG1' und RG2'	Gasräume über Flüssigkeiten
NV1 – NV4	Nadelventile
NVΣ	Nadelventil zur Summenregelung
EGL1 – EGL4	Systemevakuierung
Ionizer Reagent	Einspeisung in das MS über Festprobeneinlaß
Make up	Einspeisung in das MS über GC-Zuführung

Die Heizschlangen sind am Boden in ausgefrästen Höhlungen einer ca. 10 mm dicken Aluminiumplatte untergebracht. Es ist in diesem Teil des Systems unbedingt notwendig, eine mäßig hohe, aber konstante Temperatur zu halten, um die Kondensation von Dämpfen hinter den Reduzierventilen zu verhindern. Darüberhinaus läßt sich das Mischsystem in diesem Teil durch Ausheizen bei gleichzeitiger Evakuierung leicht reinigen. Sämtliche AUF/ZU-Ventile und Nadelventile (Nupro Comp., Cleveland, Ohio) sind hier in Ganzmetall-Ausführung verwendet worden, um eine Absorption von Gasen in Dichtungsmaterialien sowie deren Quellung oder thermische Zersetzung auszuschließen. Dies erlaubt einen schnelleren Wechsel der Reaktantgas-Zusammensetzung ohne Memory-Effekte.

Als zentralen Bestandteil enthält der heizbare Block die Mischkammer. Diese wird von einem durchbohrten Edelstahlblock mit ca. 4 ml Volumen gebildet. Der Auslaß der Kammer ist mit dem Präzisions-Nadelventil NVΣ (Nupro Comp., Cleveland, Ohio) verbunden. Es ermöglicht die Feineinstellung des Quellendruckes.

Das Finnigan 4000 GC/MS-System bietet die Möglichkeit, CI-Gasmischungen auf zwei unterschiedlichen Wegen dem Quellenraum zuzuführen. Die "MAKE UP"-Leitung führt das CI-Gas über den GC-Einlaß zu. Die "IONIZER REAGENT"-Leitung führt zum Festproben-Einlaß und leitet das CI-Gas durch die Öffnung für die Schubstange der Ionenquelle zu. Hierbei wird die

Schubstange mit der 'extended probe'-Spitze in der Weise umspült, daß das Probenmaterial in axialer Richtung in die Quelle hineingetragen wird. Die Zuleitungen zur Quelle sollten so kurz wie möglich gehalten werden. Die CI-Gas Leitung wurde durch den beheizten Interface-Ofen geführt und die Quellenzuführung hinter dem IONIZER-REAGENT Magnetventil mit einer zusätzlichen Widerstandsheizung (12 V, 1 A) umwickelt, um Kondensationen auszuschließen.

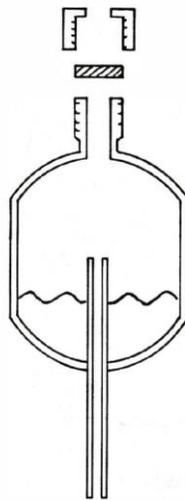


Abb. 10: Flüssigkeitsgefäß des Reaktantgas-Mischsystems ('liquid vessel')

Die Gefäße für die Reaktantgas-Flüssigkeiten sind dicht über dem beheizten Block angebracht, sodaß die aufsteigende Wärme die Verdampfung fördert. Abbildung 10 zeigt die Form der Glasgefäße. Das Volumen beträgt ca. 100 ml. Die obere Öffnung dient zum Beschicken und ist durch eine Schraubkappe mit Septum verschlossen. Der Boden wird von einem ca. 8 cm langen dickwandigen Glasrohr durchbrochen (OD 1/8"), dessen eine Hälfte bis in die Mitte des Gefäßes reicht, um den entstehenden Dampf dem Mischsystem zuzuleiten. Das untere Ende des Rohrs ist über eine Klemmverschraubung mit einem AUF/ZU-Ventil verbunden. Aus Sicherheitsgründen wird über das Glasgefäß ein Drahtkäfig gestülpt.

Zur völligen Evakuierung des Mischsystems können über die Magnetventile EGL1 bis EGL4 (Predyne, New Britain, Conn.) die Gasleitungen, die Mischkammer und die Inlet-Leitungen mit dem Vorkvakuum des MS-Systems verbunden werden.

Alle Magnetventile wurden elektrisch anstelle der originalen Finnigan-Teile angeschlossen, sodaß die Handhabung in gewohnter Weise vom Bedienpult möglich ist. Die Steuerung der Mischkammer-Heizung erfolgt mit einer handelsüblichen Phasenanschnittsteuerung, die Temperaturkontrolle über den Widerstandswert des PT100-Elementes.

7.5.2. Reaktantgase

Tab.7/1: Reaktantgase

Bezeichnung	Formel	Hersteller, Qualität/Zuführung
Aceton	CH ₃ -CO-CH ₃	Merck, p.a. /liquid vessel
Acetonitril	CH ₃ -CN	Merck, p.a. /liquid vessel

Chloroform	CH-Cl ₃	Merck, p.a. /liquid vessel
Cyanwasserstoff	HCN ¹⁾	p.a. /liquid vessel
Distickstoffmonoxid	N ₂ O	Linde, 2.5 /minican
Essigsäure	CH ₃ -COOH	Merck, p.a. /liquid vessel
Essigsäureanhydrid	CH ₃ -CO-O-CO-CH ₃	Merck, p.a. /liquid vessel
Ethanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	Merck, p.a. /liquid vessel
Helium	He	Linde, 5.0 /Druckflasche
Methan	CH ₄	Linde, 4.5 /Druckflasche
Methanol	CH ₃ -OH	Merck, p.a. /liquid vessel
Schwefelhexafluorid	SF ₆	Linde, 2.8 /minican
Tetrafluormethan	CF ₄	Linde, 2.8 /minican
Wasserstoff	H ₂	Linde, 5.0 /Druckflasche

¹⁾ Zur Herstellung des Cyanwasserstoffgases wird NaCN im 'liquid vessel' vorgelegt und mit einem Septum fest verschlossen. Nach Evakuierung wird durch das Septum mit einer Spritze in kleinen Portionen verdünnte Phosphorsäure (1:1 v/v) zugefügt. Ein Aufschäumen ist unbedingt zu vermeiden.

Alle Flüssigkeiten, die als Reaktantgas eingesetzt wurden, hatten einen ausreichend hohen Dampfdruck und konnten ohne Zusatzheizung des Glasgefäßes eingesetzt werden. Bei Essigsäure und Essigsäure-Anhydrid konnten bei Verwendung eines Heißluftföns stabilere Einstellungen erhalten werden. Für Ethanol, das in Mischungen eingesetzt wurde, mußte ebenfalls zusätzlich beheizt werden, um einen den permanenten Gasen äquivalenten Vordruck zu erzeugen.

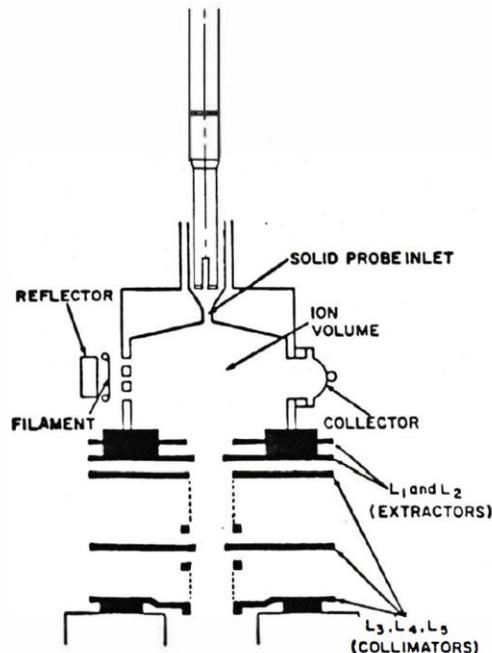


Abb. 11: Schema der Ionenquelle mit 'solid probe'

7.5.3. Extended-Probe Technik

Die Schubstange des Festproben-Einlaßsystems wurde anstelle der vorgesehenen Glas- bzw. Aluminiumtiegel mit einem in Kupfer gefassten Golddraht versehen (OD 0,7 mm), dessen Länge

so bemessen ist, daß die Spitze mit der aufgetragenen Probe in die Ionenquelle direkt vor den Elektronenstrahl zwischen Filament und Kollektor gelangt (s. Abb. 11 und 12).

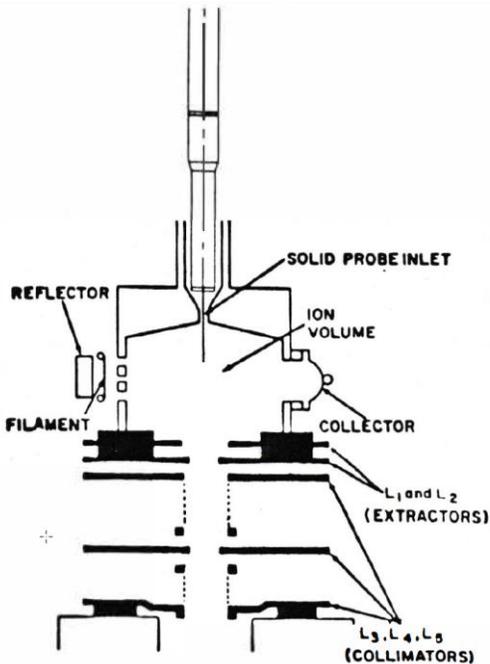


Abb. 12: Schema der Ionenquelle mit 'extended probe' modifizierter Schubstange

Die Justage wurde bei ausgebauter Ionenquelle vorgenommen. Bei eingeschobener Schubstange soll der Golddraht durch die Öffnung der GC-Zuführung (ID 0.22 mm) gerade nicht mehr zu sehen sein. Hierzu wird der Draht mittig zur Öffnung justiert und die Länge ab Schubstangenspitze bestimmt. Die effektive Länge des Goldstabes ergibt sich nach Abzug des halben Durchmessers der Öffnungsweite der GC-Zuführung (s. Abb. 13).

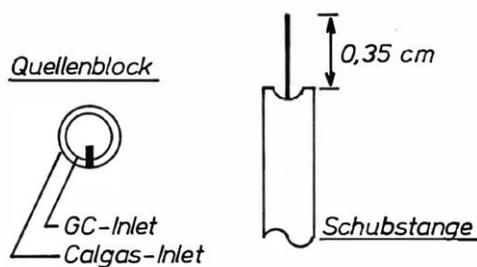


Abb. 13: Einstellung der Länge des Golddrahtes

Die originale Schubstange erwies sich im Verlauf der Untersuchungen aufgrund von Kontaminationen der Stabspitze als wenig vorteilhaft. Die Spitze ist durch Federhaltung für die konventionellen Tiegel stark profiliert gestaltet und bietet eine große Oberfläche mit Nuten und Kanten. Eine mechanische Reinigung unter Verwendung von Lösungsmitteln brachte nur begrenzten Erfolg. Das Abflammen der Spitze dagegen beseitigt die Kontamination.

Da für das Arbeiten mit 'extended probe'-Technik die Schubstangen-Heizung aus Trägheitsgründen nicht eingesetzt wird, wurde aus V4A-Stahl (Rhenia, Berlin) eine

oberflächenarme und leicht zu reinigende Schubstange speziell für den Einsatz mit der 'extended probe'-Technik gefertigt (s. Abb. 14).

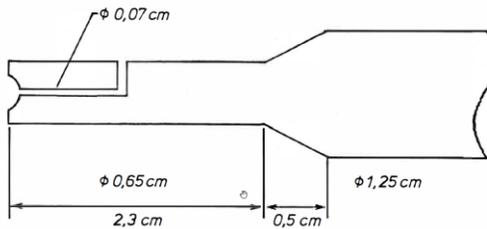


Abb. 14: Schubstange für die 'extended probe' Technik

Die Spitze der Schubstange ist im Durchmesser kleiner als die Finnigan-Schubstange und ist neben der Bohrung für den Goldstab (ID 0,7 mm) mit einer Ausgleichsöffnung zu Reinigungszwecken versehen. Der Spitzendurchmesser (OD 0,65 cm) wurde so gering wie möglich gehalten (Anschlag!), um die Wärmekapazität herabzusetzen. Für den Zustrom des Reaktantgases ist die Stirnfläche leicht konkav ausgebildet und wird an den Rändern durch 4 halbrunde Aussparungen unterbrochen.

Die Probenlösung kann mit einer Mikroliter-Spritze in variabler Menge auf die Spitze des Goldstabes aufgetragen werden. Die Temperatur des Stabes sollte zum Auftragen unterhalb des Siedepunktes des Lösungsmittels liegen, um eine Verbreiterung des Substanzflecks zu vermeiden.

Vor dem Einführen wird die Schubstange auf Raumtemperatur abgekühlt, um ein vorzeitiges Verdampfen der Substanz in der Schleuse zu verhindern. Dort niedergeschlagene Kondensate können zu einem ständigen Untergrund führen.

Aus Gründen der Sicherheit wird zum Schutz vor Verschleppung die Stabspitze mit dem Golddraht nach jeder Analyse in einer schwachen Bunsenflamme abgeflammt.

7.5.4. Testsubstanzen

Neben den in der praktischen Rückstandsanalytik interessierenden Anabolika werden für die Ionisierungsversuche weitere Testsubstanzen eingesetzt. Diese Substanzen werden als exemplarische Vertreter von Verbindungsklassen mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen eingesetzt und überstreichen die Gasphasenaziditäts-Skala vom stark-basischen bis stark-sauren Bereich. Die vollständige übersieht aller eingesetzter Substanzen ist in Tabelle 7/2 gegeben.

Die angegebene Reaktionsenthalpie für die Wasserstoff-Abstraktion wurde der Aziditäts-Skala (s. Abb. 2) (78) für die entsprechende funktionelle Gruppe entnommen und berücksichtigt nicht den Einfluß der Einbindung in die Gesamtstruktur (z.B. Xylazin).

Die Auswahl der Testsubstanzen versucht gleichzeitig, der zu erwartenden biologischen Matrix Rechnung zu tragen, indem Vertreter für die Gruppen der Fett-Alkohole und -Säuren mit aufgenommen wurden.

Tab. 7/2: Testsubstanzen

Substanz	Abk.	dH ⁰ acid	Bezugsquelle
		kcal/mol ¹⁾	
Clonidin	CLO	396	Boehringer, Ingelheim
Xylazin	XYL	395	Bayer AG, Leverkusen
Tetradecanol	TET	373	Sigma, München
Progesteron	PRO	367	Merck, Darmstadt
Trenbolon	TRE	367	Roussel-Uclaf, Paris
Östradiol	OST	350	Merck, Darmstadt
Zeranol	ZER	350	ICT, Frankfurt
Stilböstrol	STI	350	Serva, Heidelberg
Hexöstrol	HEX	350	ICN Pharma, New York
Dienöstrol	DIEN	350	ICN Pharma, New York
Diethylstilböstrol	DES	350	Serva, Heidelberg
Stearinsäure	STE	346	Sigma, München
Heptadecansäure	HEP	346	Sigma, München
3-Cl-Benzoessäure	CBS	336	Merck, Darmstadt
Barbitursäure	BAR	335	Merck, Darmstadt

¹⁾ Werte für funktionelle Gruppe, siehe Text

7.5.5. Geräte-Parameter

Die Arbeiten wurden an einem Finnigan 4023 Massenspektrometer mit integriertem INCOS-Datensystem ausgeführt. Das Gerät war mit einer PPINICI-Einheit ausgerüstet, Die simultane Registrierung von positiven und negativen Ionen wurde während der Druckoptimierung der Reaktantgase und bei der Analyse der Testsubstanzen ausgenutzt.

Die Kalibrierung des Gerätes wurde für alle vergleichenden Untersuchungen in der vom Hersteller angegebenen Weise mit FC43 (Perfluor-Tributylamin) als Referenz durchgeführt. Für den Nachweis von Anabolika in Fleischextrakten wurde dem Massenbereich von m/z 200-300 besondere Bedeutung eingeräumt.

Die Elektronenenergie betrug 70 eV. Für ausgewählte Reaktantgas-Mischungen wurden Optimierungen durchgeführt.

Die Multiplier-Spannung betrug bei der Registrierung der Testsubstanzen 1600 V. Die Aufnahme der Reaktantgas-Cluster wurde bei 800 V durchgeführt.

Die Reaktantgas-Zuführung kann bei dem verwendeten Gerätetyp wahlweise über das "MAKE UP"-Ventil parallel zum GC-Einlaß oder über den "IONIZER REAGENT"-Einlaß erfolgen. Es wurde bei diesen Untersuchungen ausschließlich der "IONIZER REAGENT"-Einlaß verwendet, da in dieser Betriebsart die Schubstange vom Trägergas umspült wird und verdampfendes Probenmaterial mit dem Gasstrom in die Quelle hineinträgt.

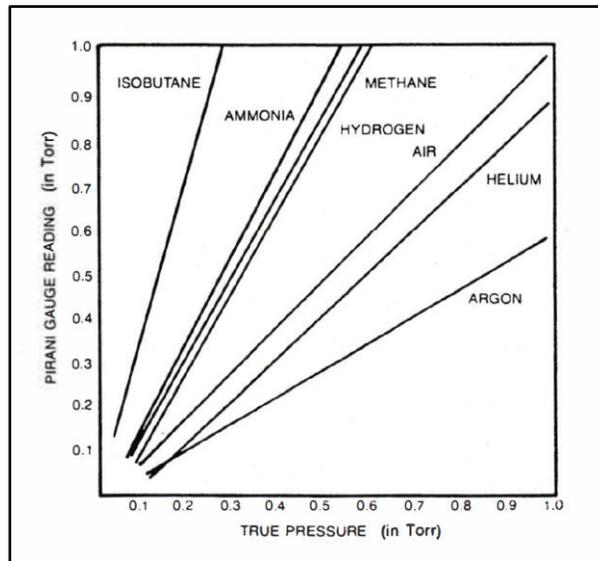


Abb. 15: Druckablesung einer Pirani-Meßröhre in Abhängigkeit von der Gasart (Herstellerangabe)

Die Einstellung der Quellen-Temperatur betrug in der Regel 240° C. An exemplarischen Beispielen, bei denen eine starke Abhängigkeit der Clusterzusammensetzung von der Quelltemperatur zu erwarten war, wurde eine Optimierung durchgeführt.

Der Quellendruck ist mit einer Pirani-Meßröhre bestimmt worden. Das Meßverfahren nutzt die Wärmeleitfähigkeit der Gase zur Abkühlung eines Heizfadens innerhalb einer Wheatstone'schen Brücke aus. Als wesentliche Parameter gehen die spezifische Wärme und Dichte des Gases in das Meßergebnis ein. Entsprechend unterschiedlich sind die Eichgeraden der Pirani-Meßröhre für verschiedene Gase (s. Abb. 15). Angegebene Quellendrücke beziehen sich deshalb allein auf den Anzeigewert. Die Reproduktion von CI-Bedingungen erfolgte in jedem Fall über die Intensitäten des Reaktantgasclusters.

8. Ergebnisse

8.1. Aufarbeitung

8.1.1. Extraktion

Die grundlegende Überlegung der hier verwendeten Aufarbeitung liegt in der Extraktion und Aufkonzentrierung einer hinreichend großen Probenmenge. Die Extraktion dient der Abtrennung von den Hauptkomponenten Wasser, Fett und Protein. Der eingesetzte Aufarbeitungsgang liefert bei hohen Ausbeuten (43) (s. Tab. 8/1) Extrakte, in denen die zu bestimmende(n) Substanz(en) in einer sehr komplexen, in hohem Überschuß vorhandenen biologischen Matrix vorliegen.

Tab. 8/1: Mittlere Wiederfindungsraten für DES, OST und ZER (43)

Substanz	Zusatz	mittl. Wiederfindung	n
DES	100 pg/g	63 %	3
OST	300 pg/g	57 %	4
ZER	100 pg/g	70 %	3

Es kann innerhalb der Rückstandsanalytik nicht die Aufgabe der Aufarbeitung sein, die Zielsubstanz aus der sie umgebenden Matrix völlig herauszulösen. Durch eine Aneinanderreihung von Trennungsschritten erfährt der Extrakt eine sich akkumulierende und nicht kontrollierbare Verunreinigung durch die unvermeidbaren Kontaminanten in Reagentien, Lösungsmitteln und Gefäßen. Absorptionserscheinungen der Spurenkomponenten an Glaswänden verringern die absolut vorhandenen Mengen zusätzlich. Wiederholte Trocknungsschritte sind zu vermeiden, wenn möglich auszuschließen. Aus dieser Erwägung heraus ergibt sich, die terminalen Bestimmungsmethoden der Probenaufarbeitung auch als "Endpunktmethoden" zu bezeichnen.

Es ist eine unabdingbare Voraussetzung für die an dieser Stelle vorgesehenen Endpunktsbestimmungen, sehr spezifisch und ausreichend empfindlich (ppb-Bereich) aussagekräftige Ergebnisse zu liefern.

Neben der Massenspektrometrie, die als spezifischen Parameter die Information über das Molekulargewicht einer Verbindung bzw. deren typische Fragmente zur Verfügung stellt, werden in zunehmender Anzahl immunologische Verfahren eingesetzt, die aufgrund der Reaktivität gegenüber gezielt ausgewählten Strukturmerkmalen der Zielsubstanz hohe Selektivität in komplexen Matrices besitzen. Die notwendige Empfindlichkeit wird durch Kopplung mit verstärkenden Detektorsystemen wie z.B. Radioaktivität und Enzymaktivität erreicht.

Die bei dieser Aufarbeitung anfallenden Extrakte sind in der Regel braun gefärbt (Matrix) und werden für die MS-Analyse nicht bis zur völligen Trockne eingedampft, sondern lediglich aufkonzentriert.

8.1.2. Gelchromatographie

Die Aufgabe des Gelchromatographie-Schrittes ist es, eine zusätzliche Fettabtrennung von den zu analysierenden Wirkstoffen durchzuführen. Dies gilt für stark fetthaltige Gewebe und zubereitete Lebensmittel, bei denen der Fettanteil nicht augenfällig ist. Auf keinen Fall darf eine starke Belastung der HPLC-Trennsäule mit Lipiden erfolgen, da hier ein Verschleppen in die Anabolika-Fractionen zu befürchten ist.

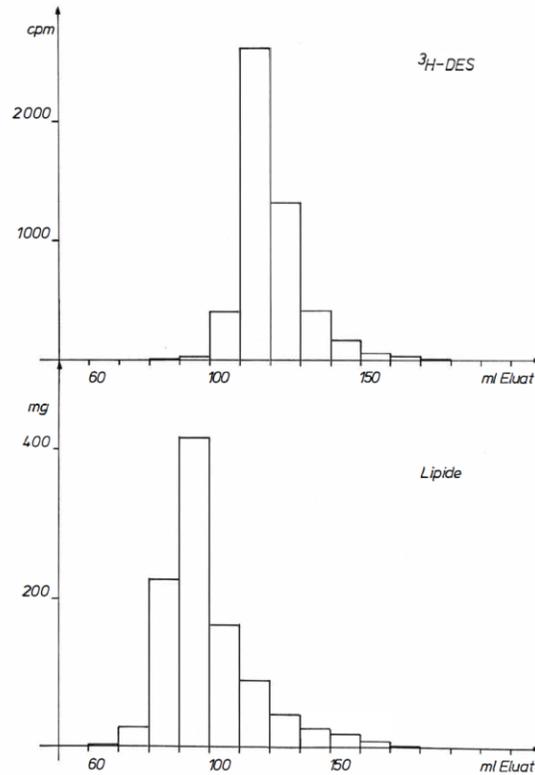


Abb. 16: Trennung von Lipiden und ^3H -DES auf der GPC-Säule

Die Eichung mit tritium-markiertem DES in öliger Lösung zeigt, daß selbst hohe Fettanteile die Abtrennung nicht beeinflussen (Abb. 16) Auf die Säule gelangten 1 g Öl dotiert mit DES einer Aktivität von ca. 20000 cpm. Die Elution des Hauptteils der Lipidkomponenten erfolgt in den Fraktionen ab 70 ml bis 100 ml; der ^3H -DES-Standard eluiert in den Fraktionen ab 100 ml bis 130 ml.

Die mittlere Ausbeute an ^3H -DES für das Eluat ab 100 ml bis 130 ml beträgt nach Aufkonzentrierung 95,9 %. Für die weitere Verarbeitung wurde jeweils dieser Teil des Eluates gesammelt und für die HPLC-Trennung eingesetzt.

8.1.3. HPLC

Die Trennung eines Teils der erhaltenen Extrakte mittels HPLC ist notwendig, um für den gruppenspezifischen ÖRT Substanzspezifität zu erhalten. Die Trennung dient gleichzeitig als Aufreinigungsschritt. Es wird mit der Retentionszeit ein für die Bewertung der Immunassay-Resultate zusätzlicher substanzspezifischer Parameter eingeführt.

Die Trennbedingungen werden durch Variation des Methanol-Anteils so gewählt, daß eine vollständige Abtrennung des in Fleisch natürlich vorkommenden Sexualhormons 17β -Östradiol von den synthetischen Östrogenen erfolgt.

Die Eichung der Trennsäule mit ^3H -markierten Analogon ergibt in Abhängigkeit der gesammelten Fraktionen ein Konzentrationsprofil (100 μl Injektionsvolumen, 1 ml Fraktionen, davon 500 μl zur Szintillationszählung eingesetzt), das für DES als Reinsubstanz (s. Abb. 17) und als Dotierung zu

einem Fleischextrakt (s. Abb. 18) die vollständige Elution in zwei Fraktionen anzeigt. Die benachbarten Fraktionen können direkt zur Kalkulation der Basislinie eingesetzt werden.

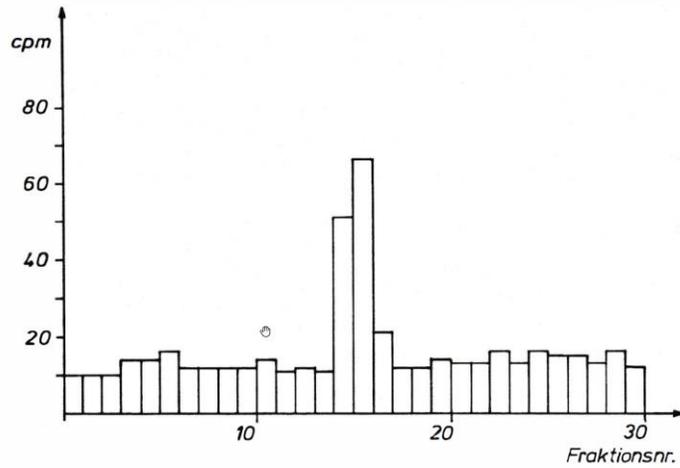


Abb. 17: Konzentrationsprofil für $^3\text{H-DES}$ (500 μl Laufmittel + 3900 cpm $^3\text{H-DES}$)

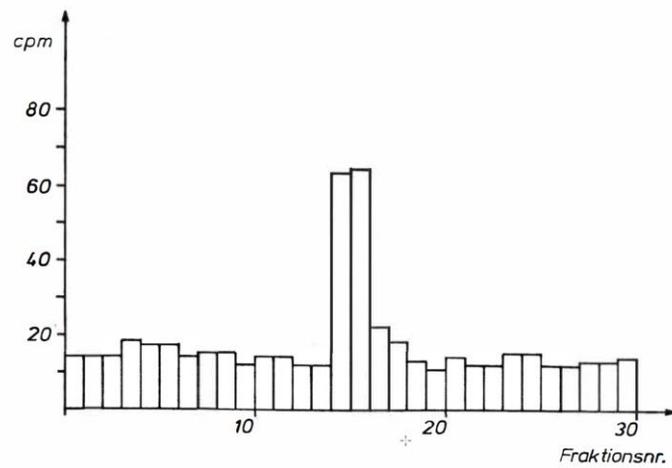


Abb. 18: Konzentrationsprofil für $^3\text{H-DES}$ als Dotierung zu einer Fleischprobe (500 μl Extrakt + 3900 cpm $^3\text{H-DES}$)

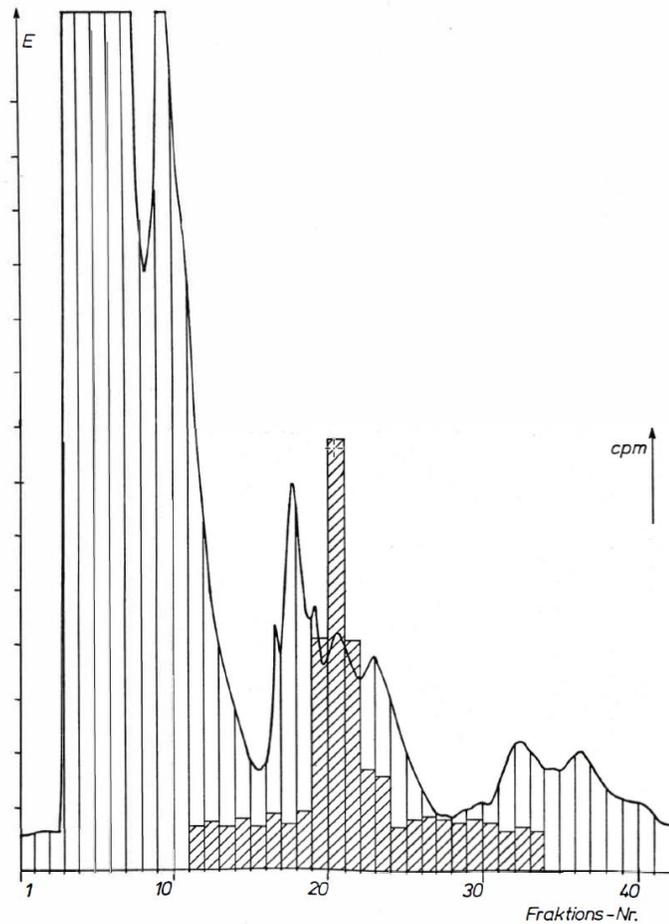


Abb. 19: Fleischprobe nach Gelpermeation UV-Detektion und Aktivitätsprofil von $^3\text{H-DES}$

Eine Änderung des Retentionsverhaltens der Kieselgel-Trennsäule bei Belastung mit Fleischextrakten wurde nicht beobachtet. Jedoch ist die Packung der Vorsäule in regelmäßigen Abständen auszutauschen, um ein Verschleppen der retardierten Matrix auf die Trennsäule zu verhindern. Eine Beurteilung der Absorptionskapazität kann dabei anhand der Durchdringung mit gelb gefärbten Matrixbestandteilen erfolgen.

Substanzverschleppungen konnten bei Verunreinigung des Einlaßsystems als Folge der Verwendung konzentrierter Substanzlösungen zur UV-Eichung beobachtet werden (43). Beim Einsatz radioaktiv markierter Verbindungen in erheblich geringeren Substanzkonzentrationen wurden dagegen keine Memory Effekte festgestellt.

Die erzielten Retentionszeiten sind in allen untersuchten Fällen unabhängig vom Fleischprobenmaterial. Abbildung 19 zeigt die HPLC-Trennung einer mit $^3\text{H-DES}$ dotierten Fleischprobe nach der Gelpermeation. Bei Verwendung einer 100 μl Probenschleife gelangt bei Aufarbeitung von 10 g Fleisch ein Äquivalent von 2 g Fleisch auf die Trennsäule.

Die UV-Spur zeigt deutlich, daß nachwievor die biologische Matrix dominiert. Im Aktivitätsprofil wird die Elution des $^3\text{H-DES}$ den Fraktionen 20, 21 und 22 zugeordnet.

Es zeigt sich hier, daß die fraktionsweise Analyse der HPLC-Trennung nicht ohne die Berücksichtigung auch der neben den Wirkstoff-Fractionen gelegenen Anteilen auskommt, um neben der Quantifizierung auch die Qualität der Trennung abzusichern.

8.2. Proteinbindungsmethoden

In prinzipiellen Versuchen konnte von H. Grohmann (43) gezeigt werden, daß die Wiederfindungsraten für DES in Fleisch bei abnehmender Zusatzmenge deutlich ansteigen.

Tab. 8/21: DES-Wiederfindungsraten bei abnehmender Zusatzmenge im RIA (43)

DES-Zusatz	Wiederfindung
10,0 ng/g	68 %
5,0 ng/g	58 %
1,0 ng/g	110 % u. 80 %
0,1 ng/g	130 %

Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß die HPLC-Trennung zwar eine gute Auftrennung der Wirkstoffe liefert, Begleitsubstanzen jedoch in hohem Überschuß vorliegen und trotz Vorsäule in die Wirkstoff-Fractionen gelangen. Diese können mit dem Antikörper nicht definierte Reaktionen eingehen. Führen diese unspezifischen Wechselwirkungen zum Blockieren der haptenspezifischen Bindungsstellen, wird ein höherer Gehalt an Östrogenen vorgetäuscht.

Tatsächlich zeigen Bindungskurven, die gegenüber der Verwendung von Reinsubstanzen mit dotierten Fleischextrakten durchgeführt wurden, Abweichungen von ca. 10% im unteren ppb-Bereich (43). Bei höheren Substanzkonzentrationen nähern sich die Bindungskurven an.

Die Analyse DIEN-haltiger Fleischproben aus einem kontrollierten Applikationsversuch mit dem polyvalenten Antiserum konnte aufgrund der unspezifischen Bindungen für keine der Proben zweifelsfreie Ergebnisse liefern. Die Analysen wurden mit dem ÖRT und dem RIA parallel durchgeführt.

Die in Abbildung 20 dargestellten Konzentrationsprofile für zwei DIEN-kontaminierte Fleischpartien und die Kontrollprobe zeigen den Einfluß unspezifischer Bindungseffekte auf das Analyseergebnis des Radioimmunassays. Als Ursache für dieses Verhalten wird eine geringe Aktivität des polyvalenten Serums gegenüber DIEN im Vergleich zu DES gesehen, sodaß Einflüsse der Matrix stärker in den Vordergrund treten.

Die Analyse von Fleischproben auf DIEN mit dem ÖRT liefert in vergleichbarer Weise für einzelne Proben unsichere Ergebnisse. Den abgebildeten Konzentrationsprofilen (s. Abb. 21) aus der ÖRT-Analyse liegen die gleichen Proben zugrunde wie diejenigen, die für die Abbildung 20 der RIA-Resultate ausgewählt wurden.

Grundsätzlich steht mit den Proteinbindungsmethoden eine bisher nicht ergründete Vielzahl von äußerst selektiven und sehr empfindlichen Bestimmungsverfahren zur Verfügung. Besondere Umsicht verlangt jedoch die Bewertung der Ergebnisse nahe den Nachweisgrenzen. Aus Gründen, die aus der Struktur der aktiven Zentren der Antikörper (und der Rezeptorproteine) herrühren, können statistische und zufällige Reaktionen von Begleitstoffen aus der Matrix nicht

ausgeschlossen werden. Interferenzen dieser Begleitstoffe führen durch unspezifische Bindungen zu einem Vortäuschen der nachzuweisenden Substanz, indem das aktive Zentrum als solches blockiert wird oder Einfluß auf die Tertiär-Struktur der Zentren ausgeübt wird. Als Folge werden positive Resultate bei gleichzeitiger Unsicherheit über die Präsenz der Zielsubstanz in der Probe erhalten. Die Häufigkeit falsch positiver Ergebnisse steigt mit der Annäherung an die Nachweisgrenze im unteren ppb-Bereich.

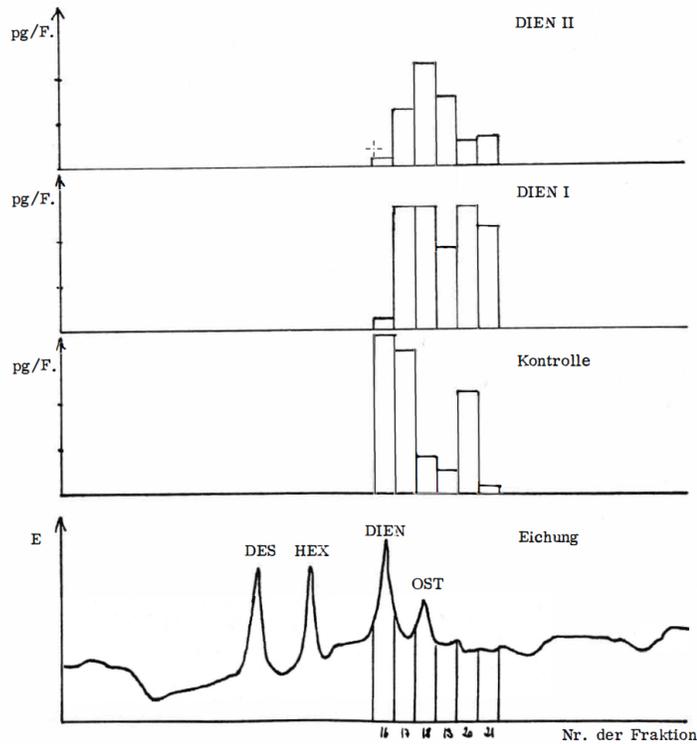


Abb. 20: Auswertung von HPLC-RIA Analysen von DIEN-haltigen Fleischproben und Kontrollprobe/polyvalentes Antiserum

Bei der hier verwendeten Analysenkombination aus Fraktionierung durch HPLC und Endpunktbestimmung mittels RIA und/oder ÖRT steht mit der Retentionszeit (Fraktionsnummer) ein eichfähiger substanzspezifischer Parameter zur Verfügung. Erst mit dieser Zusatzinformation kann bei dem in der Rückstandsanalytik von Anabolika in Fleisch unumgänglichen Arbeiten im ppb-Bereich auf die Güte der Bestimmung geschlossen werden.

In Anbetracht der Tragweite der zu treffenden Entscheidungen (Östrogenskandal; Strafverfolgung; Vernichtung von Produktionen) ist zu fordern, daß in allen Fällen, in denen positive Gehalte im Spurenbereich auftreten, eine Absicherung über eine unabhängige Methode entsprechender Selektivität und Empfindlichkeit erfolgt.

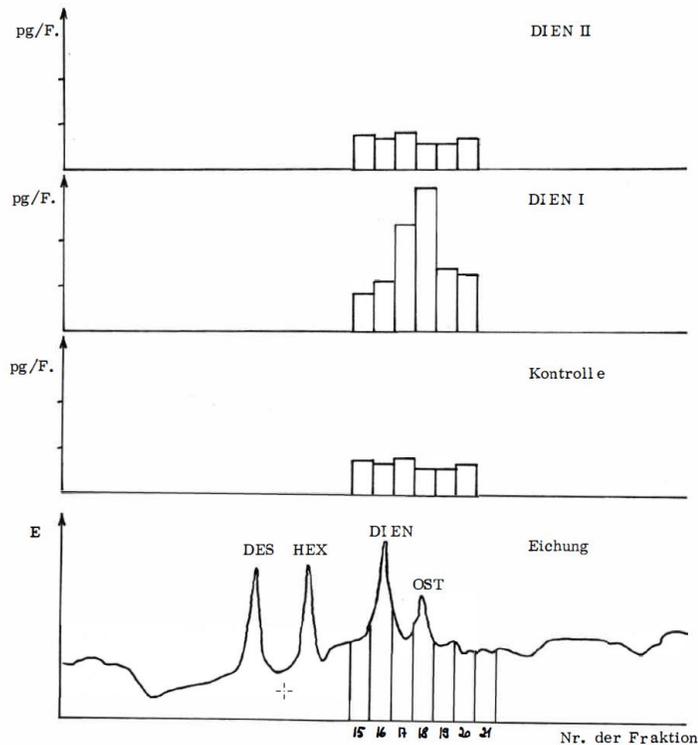


Abb. 21: Auswertung von HPLC-ÖRT Analysen von DIEN-haltigen Fleischproben mit Kontrollprobe

8.3. Massenspektrometrie

Die analytische Massenspektrometrie bietet sich zur Zeit als einziges Verfahren an, vergleichbares Maß um neben den Proteinbindungsmethoden ein an Spezifität bei gleichzeitig hoher Nachweisempfindlichkeit zu erreichen.

Die innerhalb dieses Analysenschemas (s. a. Abb. 34) durchgeführte bewußt kurze Aufarbeitung des Probenmaterials zielt im Grundsatz auf Methoden ab, die unter Ausnutzung ihrer Spezifität in der Lage sind, möglichst gering aufgereinigte Extrakte zu verarbeiten. Nicht zuletzt sei auf den Zeitbedarf chromatographischer Verfahren hingewiesen. Bei hinreichender Spezifität kann an dieser Stelle auf eine Substanzgemisch-Auftrennung sogar verzichtet werden, da in der Praxis der Anwendung anabol wirksamer Substanzen auch bei Kombinationspräparaten und Misch-Applikationen eine eng begrenzte Anzahl von Wirkstoffen erwartet werden darf. Bei Detektion der Molmassen sichert die Massenauflösung die erforderliche Selektivität.

8.3.1. Festproben-Einlaß (solid probe/extended probe)

Um die für den RIA bzw. die HPLC-Trennung anfallenden Extrakte im Bedarfsfall zur Bestätigung positiver Resultate massenspektrometrisch untersuchen zu können, wurde das Festproben-Einlaßsystem gewählt. Die vorhandene Schubstange und eine Eigenanfertigung wurden mit einem gefassten Goldstab (extended probe) versehen, sodaß ein Aufbringen variabler Extraktvolumina auf einer eng begrenzten Oberfläche möglich wurde. Die Auftragsmengen liegen im Bereich bis zu 5 µl.

Eine Heizung der 'extended probe' ist nicht erforderlich. Die Spitze des Stabes reicht bis in die Ionenquelle hinein und wird innerhalb von 30 s über die Verdampfungstemperatur der Analysensubstanz erhitzt. Auf diese Weise wird für absolute Mengen im unteren pg-Bereich ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis erreicht. Es ist dadurch möglich auch bei Anwesenheit erheblicher Mengen an Matrixstoffen, die zur Absicherung von positiven RIA (ÖRT) -Ergebnissen erforderliche Empfindlichkeit zu erhalten. Als Material zur Herstellung des Goldstabes wurde Golddraht zweier verschiedener Reinheitsgrade (technisch u. Feingold) verwendet. Im Verlaufe der Untersuchungen konnten erste Beobachtungen über Unterschiede im Abdampfverhalten der Analysensubstanzen und beim Fragmentierungsmuster nicht bestätigt werden. Bei der Handhabung bot jedoch der Draht aus Feingold wegen seiner Geschmeidigkeit Vorteile.

8.3.2. Reaktantgase

Mehr als 20 Reaktantgase und Reaktantgas-Mischungen wurden untersucht. Dabei wurden ausschließlich solche Mischungen ausgewählt, von denen auf Basis der Gasphasenaziditätsskala (s. Abb. 2) abzuleiten war, daß DES und die übrigen als Anabolika zur Anwendung gelangenden Substanzen noch ionisiert werden können. Eine Einordnung der Reaktantionen in die Gasphasenaziditätsskala neben den für die systematische Untersuchung eingesetzten Testsubstanzen ist in Abbildung 22 wiedergegeben. Die eingehend untersuchten Reaktantgase und Mischungen sind in Tabelle 8/3 zusammengefasst. In der Tabelle sind die zur Wasserstoff-Abstraktion erzeugten Reaktantionen und weitere typische Komponenten des Reaktantgasclusters aufgeführt.

Tabelle 8/3: Übersicht der optimierten Reaktantgasgemische

Nr.	Reaktantgas/Mischung	Reaktant Ion			weitere Ionen		
		m/z	Struktur	Int. ¹⁾	m/z	Struktur	Int. ¹⁾
1	Acetonitril	26	CN-	95	59	(M+H ₂ O)-	100
2	Acetonitril/H ₂	26	CN-	10	40 59	(M-H)- (M+H ₂ O)-	47 100
3	CH ₃ + N ₂ O/He/H ₂	117	CCl ₃ -	-	35/37	Cl-	100/30
4	Tetrafluormethan	19	F-	100			
5	Tetrafluormethan + H ₂	19	F-	100	39	HF·F-	<5
6	Essigsäure	59	CH ₃ COO-	100			
7	Essigsäure + H ₂	59	CH ₃ COO-	100			
8	Essigsäure-Anhydrid	59	CH ₃ COO-	20	119	(M-H+H ₂ O)-	100
9	HCN	26	CN-	100	42	OCN-	70
10	HCN + viel H ₂	26	CN-	100	17	OH-	45
11	HCN + wenig H ₂	26	CN-	90	66	(CN) ₂ ·N-	100
12	HCN + N ₂ O/He/H ₂	26	CN-	100	17 59	OH- (CN) ₂ ·OH-	21 50
13	Methanol + N ₂ O/H ₂	31	CH ₃ O-	100	32	O ₂ -	11
14	N ₂ O + He	16	O-	100	32 46	O ₂ - NO ₂ -	<5 <5
15	N ₂ O + He/H ₂	17	OH-	100	32	O ₂ -	<5
16	N ₂ O + H ₂	17	OH-	100	32	O ₂ -	<5
17	N ₂ O + Methan	17	OH-	100	26 32	CN- O ₂ -	10 20
18	N ₂ O + Methan/He	17	OH-	100	32	O ₂ -	8
19	Aceton	57	Enolat	100	42 72	(M-H-CH ₃)- CH ₃ ·(M-H)-	8 <5
20	Aceton + N ₂ O/He/H ₂	57	Enolat	100	42	(M-H-CH ₃)-	8

21	SF ₆	19	F-	6	108 127 146	SF4- SF5- SF6-	4 49 100
22	NH ₃	16	NH ₂ -	100			

¹⁾ Int. = % relative Intensität

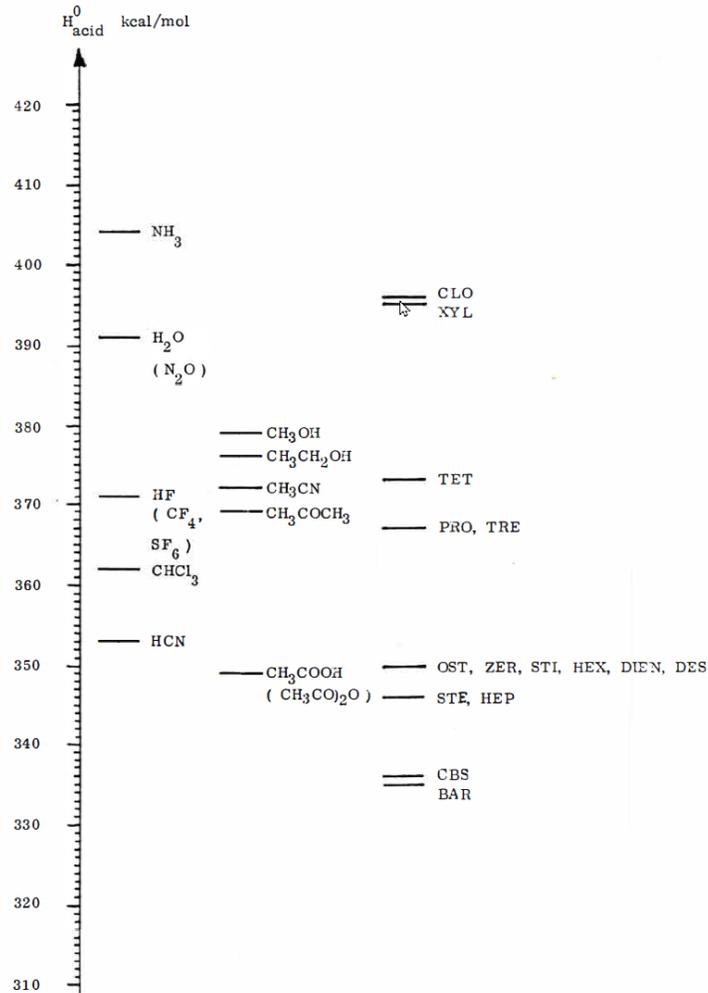


Abb. 22: Einordnung der Reaktantgase und Testsubstanzen in die Gasphasenaziditäts-Skala

8.3.2.1. Acetonitril

CH₃-CN

M 41.02 g/mol

dH⁰acid (CH₃CN) = 372 kcal/mol

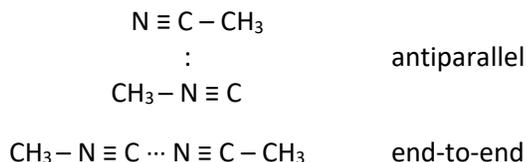
Acetonitril wurde pur und in Mischungen mit Wasserstoff eingesetzt. Die Bildung von Cyanid erfolgt bei geringer absoluter Intensität mit reinem Acetonitril am besten; es werden allerdings Dimere im stark dominierenden positiven Spektrum gefunden.

Tab.8/4: Acetonitril

m/z	Ion	Relative Intensität			
		CH ₃ -CN		CH ₃ -CN/H ₂	
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
16	CH ₄ ⁺ /NH ₂ ⁺			7	
19	H ₂ O·H ⁺			35	
26	CN ⁻		95		10
29	C ₂ H ₅ ⁺			40	
30	NO ⁺	20			
32	O ₂ ⁺ /O ₂ ⁻	68			10
40	(M-H) ⁺ / ⁻	30			47
41	M ⁺	8			
42	(M+H) ⁺ a)	100	15	100	
54	CH ₂ CH ₂ CN ⁺ b)	28			
59	(M+H ₂ O) ⁻		100		100
81	(2M-H) ⁺	5			
83	(2M+H) ⁺ c)	8			

Anm.: a) als Fragment des Dimers nach Verlust von CH₂CN
 b) aus Propionitril als Verunreinigung des CH₃-CN
 c) als Fragment des Trimer nach Verlust von CH₂CN

Die Struktur der Dimeren wird als stabile 'antiparallele' Dipol oder 'end-to-end'-Konfiguration beschrieben (99):



Die Zumischung von Wasserstoff verringert den relativen Gehalt an Cyanid und fördert die Bildung des (M-H)⁻ Ions. Addukte werden bei Anwesenheit von Wasserstoff nicht beobachtet.

8.3.2.2. Chloroform

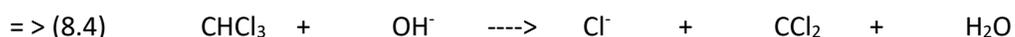
CHCl₃ M 117.92 g/mol dH⁰acid(CHCl₃) = 362 kcal/mol

Zum Hydroxylionen generierenden Gemisch aus N₂O/He/H₂ wird Chloroform aus dem Dampfraum des 'liquid vessel' zugemischt. Nach der Aziditätstabelle ist für die Zumischung von Chloroform die Reaktion (8.1) zu erwarten.



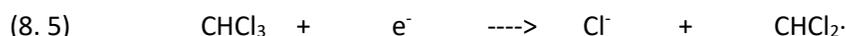
Eine Wasserstoff-Abstraktion zur Bildung von CCl₃⁻ m/z 117 ist lediglich zu geringen Teilen zu beobachten. Im Cluster der negativen Ionen ist Chlorid vorherrschend, während freie Hydroxylionen nicht mehr nachgewiesen werden können. Im positiven Spektrum werden vergleichbare relative Intensitäten für die Clusterionen des Basisgemisches gefunden.

T.O. Tiernan (82) beschreibt bei der Umsetzung von Chloroform mit Fluorid die Bildung von CCl_3^- -Ionen m/z 117 mit einer relativen Intensität von über 70%. Da im vorliegenden positiven Cluster die Ionen des Basisgemisches mit den gleichen relativen Intensitäten gefunden werden (s. Tab. 8/12) wie ohne Zumischung, wird eine ebenso intensive Bildung von OH^- -Ionen angenommen. Die gebildeten Hydroxylionen reagieren vollständig mit Chloroform unter intermediärer Bildung des CCl_3^- -Ions. Infolge der im Vergleich zur Umsetzung mit Fluorid höheren übertragenen Energie wird Chlorid zur Stabilisierung abgespalten. Es wird der folgende Ablauf vorgeschlagen:



Auf diesem Wege werden per 'echter' Chemischer Ionisation durch Zerfall des CCl_3^* -Ions in dem Maß Chlorid-Ionen erzeugt, wie OH^- -Ionen durch das Ausgangsgemisch gebildet werden.

Zusätzlich eröffnet sich die Bildung von c1 -Ionen durch Einfang von thermischen Elektronen in einer 'dissociative attachment' Reaktion:



Eine weitere Reaktion (8.6) findet nicht statt. Es findet sich vielmehr das Neutralteil $\text{CHCl}_2\cdot$ im positiven Spektrum in einer Reihe von Addukten mit H^+ und H_3O^+ wieder.



Tab. 8/5: Chloroform + $\text{N}_2\text{O}/\text{He}/\text{H}_2$

m/z	Ion	Relative Intensität	
		Pos.	Neg.
19	H_3O^+	100	
30	NO^+	28	
32	O_2^+	7	
35	$^{35}\text{Cl}^-$		100
37	$^{37}\text{Cl}^-$		30
45	$\text{N}_2\text{O}\cdot\text{H}^+$	29	
84	$\text{CH}^{35}\text{Cl}_2\cdot\text{H}^+$	47	
86	$\text{CH}^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}\cdot\text{H}^+$	33	
102	$\text{CH}^{35}\text{Cl}_2\cdot\text{H}_3\text{O}^+$	5	
104	$\text{CH}^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}\cdot\text{H}_3\text{O}^+$		< 3
117/119	CCl_3^-		< 1

8.3.2.3. Tetrafluormethan (R 14)

CF4 M 87.99 g/mol $\text{dH}^0\text{acid (HF)} = 371 \text{ kcal/mol}$

Durch Fluorid werden ausgeprägte $(\text{M-H})^-$ -Anionenintensitäten für organische Säuren, Ketone, Aldehyde und Phenole erhalten (82). Ester werden gespalten. Bei Anwesenheit von Halogenen nimmt die Substitutionsreaktion den Vorrang ein, Amine, Kohlenwasserstoffe und aromatische Verbindungen werden als transparent beschrieben. Zur Erzeugung von Fluorid wurde

Tetrafluormethan rein und im Gemisch mit Wasserstoff als Reaktantgas verwendet. Ziel der Optimierung war es, möglichst hohe Intensitäten an Fluorid-Ionen zu erhalten. Der Einsatz von reinem Tetrafluormethan brachte nicht das gewünschte Ergebnis, da die erforderlichen Quellendrücke zum Erreichen guter CI-Bedingungen nicht realisiert werden konnten. Als Folge der Vakuum-Schutzschaltung auf Basis der unspezifischen Pyrani-Gauge Anzeige (s. Abb. 15) wird für CF₄ mit hoher spezifischer Dichte und Wärmeleitfähigkeit vorzeitig die Abschaltsschwelle erreicht.

Zusammen mit Wasserstoff werden im üblichen Arbeitsbereich (Quellendruck-Anzeige 0.2 - 0.3 Torr; Optimum bei 0,22 Torr) hohe Ausbeuten an Fluorid Ionen in einem weiten Mischungsbereich erhalten. Zur Druckoptimierung wird ein konstanter Wasserstoffdruck vorgegeben und der CF₄-Anteil bis zum Erreichen des Fluorid-Maximums erhöht. In der Regel bringt eine Variation des Gesamtdruckes weiteren Intensitätsgewinn. Das Cluster besteht im Positiven und im Negativen aus je einem intensiven Peak (s. Tab. 8/6), der Reaktionsweg des Tetrafluormethan ist in Abbildung 23 wiedergegeben.

Tab. 8/6: Tetrafluormethan + H₂

m/z	Ion	Relative Intensität	
		Pos.	Neg.
19	F ⁺ /F ⁻	< 1	100
31	CF ⁺	< 5	
39	HF·F ⁻		< 5
51	CF ₂ ·H ⁺	<5	
69	CF ₃ ⁺	100	
70	CF ₃ ·H ⁺	< 5	

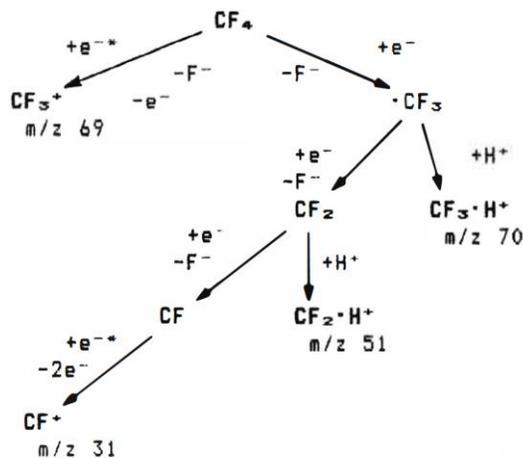
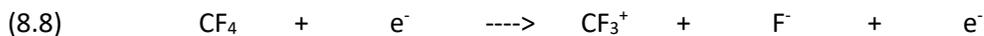
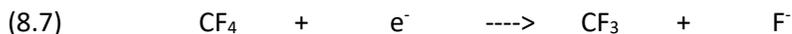


Abb. 23: Reaktionswege Tetrafluormethan/H₂

Neben der Maximierung der Fluorid-Intensitäten durch Einstellung des Quellendruckles wurde für CF₄ bei optimalen Druckverhältnissen eine Optimierung der Elektronen-Energie durchgeführt.

Die höchsten Intensitäten für Fluorid werden bei 80 eV erzielt (s. Abb. 24), höhere Energien führen zu einem raschen Intensitätsabfall. Das Ion CF₃⁺ m/z 69 dagegen erreicht bei 100 eV das Maximum und bleibt bei höheren Energien nahezu konstant. Für die Bildung von Fluorid im Bereich von 80

eV wird daher eine 'dissociative resonance capture'-Entstehung angenommen (8.7), während für höhere Energien Ionenpaar-Bildungen (8.8) überwiegen.



Eine Abhängigkeit der Fluorid-Intensität von der Ionenquellen-Temperatur besteht nicht. Es werden über den Bereich von 120°C bis 300°C nur gering ansteigende Intensitäten erzielt.

8.3.2.4. Essigsäure/Essigsäureanhydrid

CH₃COOH M 60.02 g/mol dH⁰acid (CH₃COOH) = 349 kcal/mol

(CH₃CO)₂O M 102.03 g/mol

Das Acetat-Ion ist die schwächste der hier untersuchten Gasphasen-Basen und liegt mit der Basenstärke von 349 kcal/mol auf dem Niveau der Phenole mit 350 kcal/mol.

Essigsäure wurde pur und im Gemisch mit Wasserstoff eingesetzt. Die Intensität des Acetat-Ions ist beim Einsatz von reiner Essigsäure nur äußerst gering. Eine Zumischung von Wasserstoff führt zu höheren Intensitäten, die absolut gesehen jedoch nicht als ausreichend für die vorgesehene Verwendung zur Ionisierung von Matrixproben eingeschätzt werden. Das Verhältnis von Acetat-Kation zu Anion m/z 43:59 beträgt 250:1 (s. Tab. 8/7). Im sehr intensiven positiven Cluster entstehen eine große Anzahl von Fragmenten und Addukten.

Tab.8/7: Essigsäure + H₂

m/z	Ion	Relative Intensität	
		Pos.	Neg.
15	CH ₃ ⁺	< 5	
19	H ₃ O ⁺	85	
28	CO ⁺	< 5	
29	CO-H ⁺ /C ₂ H ₅ ⁺	10	
30	CH ₂ O ⁺	37	
31	CH ₃ O ⁺	20	
32	O ₂ ⁺ /CH ₃ OH ⁺	95	
33	CH ₃ OH ₂ ⁺	20	
43	CH ₃ CO ⁺	100	
59	CH ₃ COO ⁻		100
60	CH ₃ COOH ⁺	12	
61	CH ₃ COOH ₂ ⁺	83	
75	CH ₃ COOH·CH ₃ ⁺	< 5	

Bei steigenden Wasserstoffgehalten nimmt die Intensität des Acetat-Anions wieder ab, und es werden schließlich Hydroxyl-Ionen im Cluster wieder erkennbar.

Der Einsatz von Essigsäure-Anhydrid lieferte in reiner Form deutlich höhere Acetat-Intensitäten, die eine Verwendung des Anhydrids als Reaktantgas möglich werden lassen. Bei Benutzung der zur Verfügung stehenden Apparatur war es trotz zusätzlicher Heizung des Flüssigkeitsbehälters

nur kurzfristig möglich, stabile Intensitäten des Acetat-Anions zu erhalten. Hier beeinflusst der hohe Siedepunkt des Anhydrids von 140° C das Regelverhalten, wodurch die Aufrechterhaltung eines gleichmäßigen Dampfdruckes in der 'liquid vessel' über längere Meßzeiten erschwert wird.

Obwohl sich das Essigsäure-Anhydrid in einem Vorversuch als gut geeignet zur Ionisierung von DES erwies, kann es nur mit Einschränkung als Reaktantgas eingesetzt werden.

Im negativen Spektrum erscheint neben dem Acetat-Anion das Additionsprodukt mit Wasser als Basepeak, im Positiven sind Fragmente und ebenfalls Assoziationsprodukte vorhanden.

Tab. 8/8: Essigsäure-Anhydrid

m/z	Ion	Relative Intensität	
		Pos.	Neg.
43	CH ₃ CO ⁺	22	
59	CH ₃ COO ⁻		20
71	CH ₃ (CO) ₂ ⁺ / CH ₃ COC ₂ H ₄ ⁺	45	
102	(CH ₃ (CO) ₂ O ⁺ = M ⁺	18	
115	m/z 71 + CO ₂	100	
119	(M-H+H ₂ O) ⁻		100
120	(M+H ₂ O) ⁻		8
145	(M + m/z 43) ⁺	88	

8.3.2.5. Cyanwasserstoff

HCN M 27.01 g/mol dH⁰acid (HCN) = 353 kcal/mol

Die Herstellung von Cyanwasserstoff erfolgte im Flüssigkeitsbehälter selbst durch Umsetzung von NaCN mit verdünnter Phosphorsäure. Das Verfahren hat sich als sehr praktikabel herausgestellt und kann durch sukzessive Zugabe von verdünnter Phosphorsäure leicht gesteuert werden. Eine Nachrocknung des Gases erfolgte nicht, weshalb mit geringen Anteilen von Wasserdampf im Reaktantgas gerechnet werden muß.

Cyanwasserstoff wurde pur und in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit Wasserstoff als Reaktantgas eingesetzt. HCN wurde ebenfalls als Modifier zum OH⁻-Ionen bildenden Gemisch aus N₂O/He/H₂ eingesetzt.

Bei allen Reaktantgas-Mischungen mit Cyanwasserstoff wurden sehr überschaubare Cluster mit wenigen intensiven Ionen erhalten. Bei Anwendung von reinem HCN sind im negativen Spektrum CN^c und CNO⁻-Ionen zu finden. Drucksteigerungen führen im allgemeinen zu keiner Intensitätssteigerung, vielmehr weicht das System durch die Bildung von Dicyan (CN)₂ dem Zwang aus. Die Zumischung von Wasserstoff erhöht die absolute Intensität der negativen Cluster-Ionen und drängt die Entstehung von Dicyan zurück. Es werden dadurch höhere Quellendrücke ermöglicht.

Hohe Wasserstoff-Anteile bieten einfache Cluster-Spektren mit Cyanid als Basepeak. Ein weiteres Ansteigen des Wasserstoff-Anteils führt zum Auftreten von OH⁻-Ionen, die neben einer hohen

Intensität von H_3O^+ -Ionen das Vorhandensein von Wasserdampf widerspiegeln. Die arbeitsfähige HCN/ H_2 -Mischung weist OH^- -Ionen im Cluster nicht auf.

Tab. 8/9: Cyanwasserstoff + unterschiedliche Anteile H_2

m/z	Ion	Relative Intensität					
		HCN		HCN > H_2		HCN < H_2	
		pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
19	H_3O^+	5		< 5		100	
26	CN^-		100		90		100
28	$\text{HCN}\cdot\text{H}^+/\text{N}_2^+$	91		100		25	
29	$\text{N}_2\cdot\text{H}^+/\text{C}_2\text{H}_5^+$	< 5		< 5		65	
30	NO^+	18		< 5			
32	O_2^+	100		5			
42	OCN^-		70		7		
43	$\text{N}_3\cdot\text{H}^+$	8		<5			
46	NO_2^+	<5		5			
53	$(\text{CN})_2\cdot\text{H}^+$			60			
55	$(\text{HCN})_2\cdot\text{H}^+$			38			
66	$(\text{CN})_2\cdot\text{N}^-$				100		

In der Reaktion mit OH^- -Ionen liefert Cyanwasserstoff ebenso gute Intensitäten an CN^- -Ionen. Das Cluster enthält aber neben den typischen Ionen der $\text{N}_2\text{O}/\text{He}/\text{H}_2$ -Mischung auch Hydroxyl-Ionen, die durch Steigerung des HCN-Anteils nicht zu beseitigen sind. Das System reagiert wiederum mit der Bildung von Dicyan.

Tab. 8/10: Cyanwasserstoff + $\text{N}_2\text{O}/\text{He}/\text{H}_2$

m/z	Ion	Relative Intensität	
		pos.	neg.
17	OH^-		21
19	H_3O^+	78	
26	CN^-		100
28	$\text{HCN}\cdot\text{H}^+$	25	
31	NO^+	100	
32	$\text{O}_2^+/\text{O}_2^-$	7	10
44	$\text{CO}_2^+/\text{N}_2\text{O}^+$	10	
45	$\text{N}_2\text{O}\cdot\text{H}^+$	78	
59	$(\text{CN})_2\cdot\text{OH}^-$		50

8.3.2.6. Methanol

$\text{CH}_3\text{-OH}$ M 32.03 g/mol $d\text{H}^0_{\text{acid}}(\text{CH}_3\text{OH}) = 379 \text{ kal/mol}$

Methylat als Reaktantion wurde von D.F. Hunt und Mitarbeitern (74) erstmals als Brønstedt-Base bei PPINICI-Experimenten eingesetzt. Die Darstellung erfolgte über Methylnitrit, das aus dem Reaktionsgemisch von Methanol, Isoamylnitrit und konzentrierter Schwefelsäure destilliert und ausgefroren wurde. Der Einsatz von Methylnitrit erfolgt als Modifier zu Methan (72, 122).

Die Anwendung von reinem Methanol als Reaktantgas liefert lediglich geringe Ausbeuten an Methylat. Gute Ergebnisse werden erzielt durch Zumischung von Methanol zu einem OH⁻-Ionen generierenden Plasma aus Wasserstoff und Distickstoffmonoxid. Es hat sich bei diesem Reaktantgas-System herausgestellt, daß optimale Quellendruck-Bedingungen zur Erzeugung von Methylat nur in einem Fenster von etwa 0.4 Torr herrschen.



Im negativen Spektrum tritt Methylat als einziges Reaktantion hervor. Nach Gleichung (8.9) wird Methanol durch Wasserstoff-Abstraktion mit OH⁻ zu Methylat umgesetzt. Exakte Optimierungen auf eine quantitative Umsetzung von OH⁻ sind nicht über längere Meßzeiträume stabil. Im positiven Spektrum tritt das Protonierungsprodukt auf, das von den charakteristischen Ionen des N₂O/H₂-Gemisches begleitet wird.

Wird reines Methanol eingesetzt, zeigt sich vorherrschend Fragmentierung, auch dimere Assoziationsprodukte werden beobachtet (s.a. 100).

Tab. 8/11: Methanol + N₂O/H₂

m/z	Ion	Relative Intensität	
		pos.	neg.
15	CH ₃ ⁺	< 5	
29	CHO ⁺ /C ₂ H ₅ ⁺	< 5	
31	CH ₂ OH ⁺ /CH ₃ O ⁻	9	100
33	CH ₃ OH ₂ ⁺	100	
46	NO ₂ ⁺	< 5	

8.3.2.7. Ethanol

CH₃-CH₂-OH M 46.04 g/mol $dH^{\circ}\text{acid}(\text{Ethylat}) = 376 \text{ kcal/mol}$

Der Einsatz von Ethanol als Reaktantgas brachte zusätzliche Aufgaben bei der Erzeugung und Einleitung des Dampfes. Um einen nennenswerten Quellendruck zu erzeugen, wurde die Mischkammer auf 80 ° C beheizt und dem Flüssigkeitsbehälter mit einem Heißluft-Fön zusätzliche Wärme zugeführt. Ein offensichtliches Kondensieren von Ethanol in den Zuleitungen oder Ventilen, das sich durch ein Schwanken des Quellendruckes bemerkbar macht, ließ die systematische Untersuchung optimaler Verhältnisse nicht als sinnvoll erscheinen.

In Anbetracht dieser Nachteile und der vergleichbaren Basizität des Ethylat-Anions mit Methylat (Differenz ca. 3 kcal/mol) wurde bei weiteren Experimenten auf Methanol zurückgegriffen.

8.3.2.8. Distickstoffmonoxid im Gemisch mit Helium und Wasserstoff

N₂O M 44.00 g/mol $dH^{\circ}\text{acid}(\text{H}_2\text{O}) = 391 \text{ kcal/mol}$

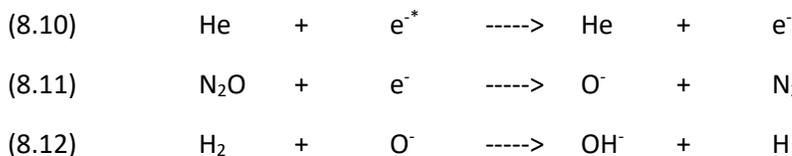
Distickstoffmonoxid liefert sowohl in der Mischung mit Wasserstoff und Helium als auch mit Wasserstoff allein hohe Ausbeuten an Hydroxyl-Ionen.

Neben den H^- - und NH_2^- -Ionen ist OH^- die stärkste Brønstedt-Base, die für die Chemische Ionisation eingesetzt werden kann, OH^- -Ionen reagieren, analog zu CH_5^+ als starke Säure, aufgrund der Basizität mit einem weiten Spektrum organischer Verbindungen durch Wasserstoff-Abstraktion (s. Abb. 22).

Durch das Zumischen von Modifiern bis zum völligen Verschwinden der OH^- -Ionen aus dem Spektrum werden Reaktantgase mit abgeschwächter Basizität gebildet.

Die quantitative Zusammensetzung der Gasmischung ist in weiten Bereichen unkritisch und kann von einer 10%igen bis über 50%igen N_2O -Beimischung mit gutem Erfolg eingesetzt werden. Möglichst niedrige N_2O -Gehalte wurden angestrebt. Eine Zumischung von Helium steigert die Ausbeuten an OH^- -Ionen.

Die Umsetzung zu Hydroxyl-Ionen wurde von A.L.C. Smith und F.H. Field eingehend untersucht (101).



Der bestimmende Schritt für die Bildung von OH^- ist die Wasserstoff-Abstraktion durch O^- nach Gleichung (8.12). Diese Reaktion ist exotherm mit nur 6-7 kcal/mol, woraus Smith und Field (101) eine für den Ablauf notwendige Aktivierungsenergie fordern.

Tab. 8/12: N_2O -Mischungen mit Helium und Wasserstoff

m/z	Ion	Relative Intensität		
		N ₂ O/He	N ₂ O/He/H ₂	
			neg.	pos.
16	O^-	100		
17	OH^-			100
19	H_3O^+		55	
28	N_2^-	< 5		
30	NO^+/NO^-		28	< 5
32	$\text{O}_2^-/\text{O}_2^+$	< 5	< 5	
35	$\text{H}_2\text{O}\cdot\text{OH}^-$	< 5		< 5
45	$\text{N}_2\text{O}\cdot\text{H}^+$		100	
46	NO_2^-	< 5		

Eine maximale Umsetzungsrate wird von Ihnen für Quellentemperaturen von über 200°C beschrieben, sodaß O^- -Ionen im Cluster nicht detektierbar sind.

Zur Einstellung optimaler OH^- -Intensitäten wird ein gleichteiliges Gemisch von Helium und Wasserstoff mit einem gemeinsamen Vordruck von 0.2 Torr vorgelegt, zu dem sukzessive N_2O bis zum Erreichen maximaler OH^- -Ausbeuten zugemischt wird. Das Auftreten der Reaktantgas-Ionen wird analog auf dem Oszilloskop des Gerätes verfolgt. Gute Ergebnisse werden erzielt bei einem Quellendruck (forepressure, FP) von 0.50 Torr. Der abgelesene Druck der Komponenten beträgt für das gleichteilige Gemisch He/H₂ 0.47 Torr und für N_2O 0,36 Torr.

Wird dem Reaktionsgemisch Wasserstoff entzogen, zeigt sich im negativen Spektrum O^- als Basepeak neben Spuren an N_2^- , O_2^- und NO_2^- . Obwohl eine gute Substanzionisierung für DES mit O^- erreicht wird, kann O^- als Reaktant-Ion bei dem zur Verfügung stehenden Gerät nicht für eine routinemäßige Anwendung wegen der Gefährdung des Filamentes verwendet werden.

8.3.2.9. Distickstoffmonoxid im Gemisch mit Methan

N_2O M 44,00 g/mol $dH^0_{acid}(H_2O) = 391$ kcal/mol

Zur Erzeugung von Hydroxyl-Ionen kann N_2O auch im Gemisch mit Methan und Helium eingesetzt werden (101, 102). Beimischungen von 5-10% sind ausreichend für hohe Ausbeuten an OH^- -Ionen. Helium wirkt wiederum als Kollisionsgas für Primärelektronen und trägt dadurch zur Intensitätssteigerung bei. Als wesentlicher Effekt kann aber eine Abschwächung des typischen Methanuntergrundes im höheren Massenbereich angesehen werden.

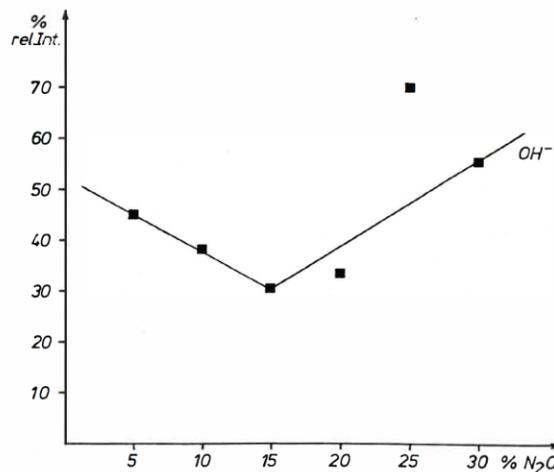


Abb. 24: Einfluß des N_2O -Anteils auf die Intensität von Hydroxyl-Ionen (Methan:Helium 1:1, 100% = TIC)

Steigende Mischungsanteile von N_2O liefern zwar stärkere Intensitäten an OH^- -Ionen (s. Abb. 24), führen aber zu einem verstärkt ansteigenden Auftreten von Rhenium-Oxid Massen m/z 233/235 (ReO_3^-) und m/z 249/251 (ReO_4^-) (s. Abb. 25) (s. a. 71).

Das Ionisierungsverhalten des Plasmas zeigt für DES ein breites Maximum bei 10% N_2O -Beimischung zu Methan. Mit Rücksicht auf die Lebensdauer des Filamentes erscheint dieses Mischungsverhältnis als nicht geeignet für die praktische Anwendung,

Die mittlere Lebensdauer des Filamentes wird von Smith und Field (101) für das Methan/ N_2O Gemisch mit 40-80 h angegeben. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnte eine mittlere Standzeit von bis zu zwei Wochen erreicht werden.

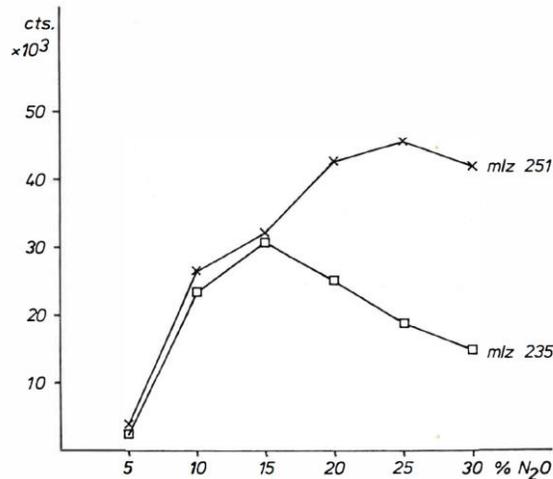
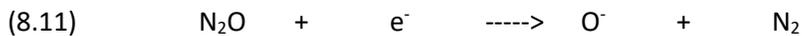
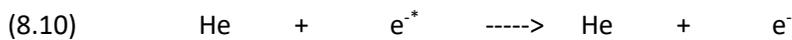


Abb. 25: Intensität von Rheniumoxid-Ionen als Funktion des N₂O-Gehaltes (Methan:Helium 1:1)

Die Umsetzung des Distickstoffmonoxids mit Methan erfolgt über die bereits erwähnte 'dissociative electron capture'- Reaktion des N₂O (s. a. Kap. 8. 3. 2. 7.):



Bei der praktischen Erprobung des Gemisches wird im Spurenbereich das Substanz-Signal von wellenförmigem Grundrauschen, verursacht durch offenbare Polymerbildungen aus Methan überlagert, sodaß eine sinnvolle Anwendung für die Analytik der Anabolika in Fleisch ausgeschlossen ist.

Tab. 8/13: N₂O -Mischungen 10%ig in Methan und Methan/He

m/z	Ion	Relative Intensität	
		N ₂ O/CH ₄	N ₂ O/CH ₄ /He
		neg.	neg.
17	OH ⁻	100	100
26	CN ⁻	10	
32	O ₂ ⁻	20	8
35	H ₂ O·OH ⁻	< 5	
40	NO ⁻	< 5	
42	OCN ⁻	19	25

Weitere Untersuchungen mit Methan als Reaktantgas-Komponente wurden aus den genannten Gründen nicht durchgeführt. Ein analoges Verhalten wird für iso-Butan erwartet.

8.3.2.10. Aceton

CH₃-CO-CH₃ M 58.04 g/mol dH⁰acid (Enolat) = 369 kcal/mol

Aceton wurde über den Flüssigkeitsbehälter des Mischsystems pur und als Modifier zu dem Gemisch N₂O/He/H₂ eingesetzt.

Das Verhalten des Acetons entspricht bei Anwesenheit von OH⁻-Ionen der erwarteten Säure-Base-Reaktion:



Im negativen Clusterspektrum des Reaktantgas-Gemisches sind deutlich das Enolat-Anion und ein Fragment durch Abspaltung einer Methyl-Gruppe zu erkennen. Im positiven Spektrum dominiert das (M+H)⁺-Ion neben dem Fragment durch Methyl-Abspaltung. Die Steigerung der Ausbeute an Enolat-Anionen findet seine Grenze in der Ausbildung eines dimeren Assoziationsproduktes m/z 117 und mit m/z 101 der Anlagerung des gebildeten Fragmentes.

Tab. 8/14: Aceton

m/z	Ion	Relative Intensität			
		Aceton ¹⁾		Aceton + N ₂ O/He/H ₂	
		pos.	neg.	pos.	neg.
19	H ₃ O ⁺			18	
30	NO ⁺			10	
42	(M-H-CH ₃) ⁻		8		19
43	(M-CH ₃) ⁺	12		30	
57	(M-H) ⁻		100		100
59	(M+H) ⁺	39		100	
72	CH ₃ ·(M-H) ⁻		< 5		
73	(M+CH ₃) ⁺	7			
101	M·(M-CH ₃) ⁺	17			
117	(2M+H) ⁺	100			

¹⁾ Elektronen-Energie 80 eV

Wird ausschließlich Aceton als Reaktantgas eingesetzt, ergeben sich nach Optimierung des Quellendruckes identische Resultate. Besonders deutlich tritt dies im Positiven durch die Dimerisierung des Acetons in den Vordergrund.

Für Aceton als Reaktantgas wurde eine Optimierung der Elektronen-Energie zwischen 30 eV und 200 eV durchgeführt. Eine Abhängigkeit der Enolat-Intensität von der Elektronen-Energie konnte nicht nachgewiesen werden. Die Schwankungsbreite liegt über den gesamten Bereich innerhalb von 10% mit den besten Resultaten bei 70-80 eV. Es zeigt sich hier, daß günstige CI-Bedingungen bei Eintreten der Plasma-Reaktion erreicht werden, die nicht durch weiteres Erhöhen der Energie der Elektronen verbessert werden können. Im praktischen Einsatz zur Ionisation von DES haben sich beide Varianten als gut geeignet erwiesen. Nachteilig bei der Verwendung von Aceton ist die lange Verweilzeit nach Absetzen des Gases im Gerät. Aceton kann von vielen Kunststoff-Dichtungen absorbiert werden und langsam wieder in das Vakuumsystem zurückdiffundieren. Noch nach 24 h Evakuierung tritt das Enolat-Anion im negativen Cluster auf.

8.3.2.11. Schwefelhexafluorid

SF₆ M 145.96 g/mol dH⁰acid (HF) = 371 kcal/mol

Als alternatives Reaktantgas zur Erzeugung von Fluorid wurde Schwefelhexafluorid eingesetzt, Neben der Erzeugung von Fluorid-Ionen zielt der Einsatz von SF₆ aufgrund des großen Einfangquerschnittes für thermische Elektronen darauf ab (63, 72), 'electron capture'-Reaktionen des Substanzmoleküls auszuschließen, um reine chemische Ionisation durch Wasserstoff-Abstraktion zu erreichen.

Im negativen Spektrum werden mit hoher Intensität der Molpeak und Fragmente nach sukzessivem Abspalten von Fluor gefunden. Fluorid selbst entsteht lediglich in geringen Mengen. Die Ionisierung von DES konnte mit dem SF₆-Plasma nicht erreicht werden. Im positiven Spektrum dominieren Fragmente nach Fluorid-Abspaltung.

Tab. 8/15: Schwefelhexafluorid

m/z	Ion	Relative Intensität	
		pos.	neg.
19	F ⁻		6
51	SF ⁺	3	
70	SF ₂ ⁺	8	
89	SF ₃ ⁺	41	
108	SF ₄ ⁺ /SF ₄ ⁻	3	4
127	SF ₅ ⁺ /SF ₅ ⁻	100	49
146	SF ₆ ⁻		100

Nach diesen Versuchen zeigte sich Schwefelhexafluorid verantwortlich für einen permanenten negativen Untergrund mit den Massen m/z 127 und m/z 146, der erst durch intensive Reinigung des gesamten Vakuumsystems und einem Ölwechsel für Diffusions- und Vorvakuum-Pumpen reduziert werden konnte.

Wegen des hohen Memory Effektes, der weitere Arbeiten auf Grundlage der Chemischen Ionisation beeinträchtigen könnte, wurde die Möglichkeit des Abfangens von thermischen Elektronen nicht weiterverfolgt. Durch das wenig intensive Auftreten des Fluorid wird eine geringe Aktivität bei Protonenabstraktions-Reaktionen (z.B. mit DES) beobachtet; der Einsatz als Reaktantgas für die vorliegende Untersuchung kommt deshalb nicht in Frage. Der Zumischung des SF₆ zu Reaktantgasen zum Zweck des Abfangens von thermischen Elektronen wird weiterhin große Bedeutung beigemessen.

8.3.2.12. Ammoniak

NH₃ M 17.03 g/mol dH⁰acid (NH₃) = 404 kcal/mol

Das Amid-Ion wird als äußerst reaktives Reaktant-Ion beschrieben (100, 103, 104). Die Basizität übersteigt die des Hydroxyl-Ions um 13 kcal/mol.

Das Spektrum ionisierbarer Substanzen ist daher für das Amid-Ion um die Gruppen der primären und sekundären Amine erweitert, die nach der Gasphasenaziditäts-Skala mit OH⁻ nicht mehr

umgesetzt werden. Es wird ebenso die Protonenabstraktion aus Propylen, isoButylen, 1-Penten und 1-Hexen beschrieben (107). Bei guter Handhabung kann Ammoniak prinzipiell in gleicher Weise wie das N₂O/He/H₂-Gemisch als Basis zur Umsetzung mit Modifiern herangezogen werden (105, 106).

Ammoniak wurde dem Dampfraum einer konzentrierten Lösung aus dem Flüssigkeitsbehälter entnommen und pur und im Gemisch mit Helium als Reaktantgas eingesetzt.

Tab. 8/16: Ammoniak

m/z	Ion	Relative Intensität	
		pos.	neg.
16	NH ₂ ⁺ /-	< 5	50
17	H ₃ O ⁺ /QH-	20 ¹⁾	100 ¹⁾
18	NH ₄ ⁺	100	

¹⁾ aus H₂O

Als das weitaus intensivste Ion wird Ammonium im Reaktantgas-Cluster gebildet; die Intensität des Amid-Ions ist um mehr als den Faktor 50 geringer. Drucksteigerungen führen zu Adduktionen im positiven und negativen Spektrum, für die die Ausbildung von Assoziationsprodukten mit Substanzmolekülen nicht ausgeschlossen werden kann. Die Intensität des Amid-Ions wird durch die Zumischung von Helium nicht gesteigert.

Da für die gezielte Umsetzung mit dem Amid-Ion keine ausreichenden Intensitäten erhalten werden und zusätzlich Nebenreaktionen durch Bildung von Addukten mit der Analysesubstanz und insbesondere mit der biologischen Matrix zu erwarten sind (108), wird Ammoniak nicht zur Erzeugung von Reaktantgas-Gemischen modifizierter Basizitäten verwendet.

8.3.3. Bewertung und Auswahl der Reaktantgase

Bei Vorversuchen hat sich ein Basisgemisch aus N₂O/He/H₂ als besonders vorteilhaft für die Spurenanalyse gegenüber dem Gemisch aus N₂O/(He)/CH₄ erwiesen.

Beide Reaktantgas-Mischungen liefern als intensivstes Clusterion die starke Gasphasenbase OH-. Bei Verwendung des methanhaltigen Gemisches wurde bis in den Massenbereich von m/z 200-300 ein wellenförmiger Untergrund mit einer mittleren Frequenz von 14 Masseneinheiten festgestellt (s. Abb. 26). Als Ursache für dieses permanente Rauschen wird die Bildung von Polymerprodukten aus dem Methan angenommen. Die Intensität des Untergrundes steigt an, besonders im Verlaufe einer Analyse, und stellt durch die drastische Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses eine ungünstige Voraussetzung für die Spurenanalyse dar.

Wird der Wasserstoff-Träger des Gemisches zur Bildung von Hydroxyl-Ionen durch Wasserstoff selbst ersetzt, können die beschriebenen Effekte ausgeschlossen werden. Die Intensität der OH-Ionen bleibt erhalten und kann sogar gegenüber den übrigen Ionen des Clusters deutlich gesteigert werden.

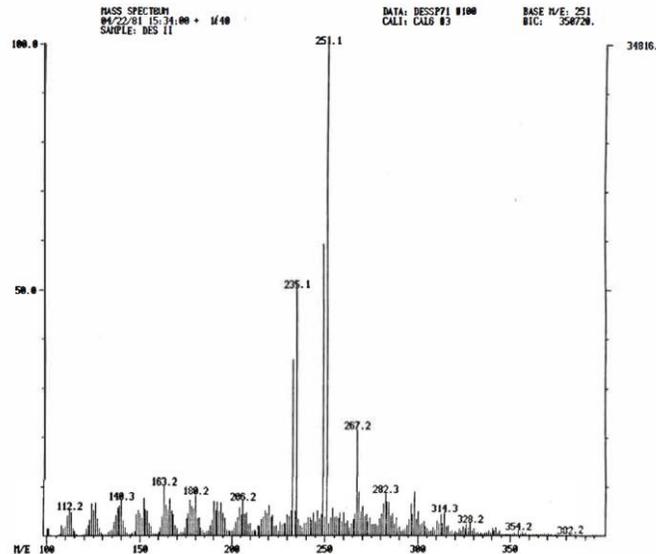


Abb. 26: Methan-Untergrund im mittleren Massenbereich

Aufgrund der starken Basizität der Hydroxyl-Ionen können diese direkt als selektives Agens eingesetzt werden. Mit Hilfe des OH^- -Ionen generierenden Reaktantgas-Gemisches kann weiterhin eine stufenweise Minderung der Gasphasen-Basizität durch Zusatz von Modifiern erreicht werden.

Dies läßt insbesondere die einfache Anwendung von Methylat als Reaktantion durch Zumischung von Methanol zu. Wird Aceton als Modifier eingesetzt, wird als dominierendes Reaktantion Enolat erhalten. Eine vielfache Adduktbildung, wie dies bei dem Einsatz von reinem Aceton zu beobachten ist und ebenfalls zu Addukten mit dem Substanzmolekül führt, kann ausgeschlossen werden.

Wird HCN dem Basisgemisch aus $\text{N}_2\text{O}/\text{He}/\text{H}_2$ zugemischt, erfolgt unter den gewählten Versuchsbedingungen keine völlige Umsetzung der Hydroxyl-Ionen mit Cyanwasserstoff. Trotz hoher Ausbeuten an Cyanid-Ionen bleibt ein Anteil an OH^- -Ionen im Cluster vorhanden. Es wird angenommen, daß durch das Herstellungsverfahren für Cyanwasserstoff mit der Verwendung wässriger Phosphorsäure-Lösung auch Wasserdampf in die Ionenquelle gelangt.

Im Gegensatz dazu wird durch eine Verwendung von reinem HCN oder im Gemisch mit Wasserstoff als einziges intensives Reaktantion des negativen Clusters Cyanid gebildet. Die Zusammensetzung des Clusters kann leicht durch den Wasserstoffanteil variiert werden.

Bei sehr hohen Wasserstoffanteilen ($\text{HCN} \ll \text{H}_2$) kann wiederum das Auftreten von Hydroxyl-Ionen beobachtet werden.

Hervorgehoben sei hier die Funktion von Helium und Wasserstoff in den verwendeten Mischungen. Helium wird in vielen Gemischen als neutrales Kollisionsgas zugefügt, um einerseits durch Abbremsen der Primärelektronen eine hohe Ausbeute an thermischen Elektronen zu gewährleisten und andererseits zur Aufrechterhaltung des für die Chemische Ionisation notwendigen Quellendruckes zu dienen, was das Zumischen von Minorkomponenten wesentlich vereinfacht.

Wasserstoff kann ebenfalls als Kollisionsgas fungieren. Es wirkt als neutrales Mischgas zur Herabsetzung von Adduktbildungen innerhalb des Reaktantgas-Clusters und zeigt im Vergleich zu früheren Erfahrungen einen erheblichen Einfluß auf die Verlängerung der Filament-Lebensdauer. Als wesentlich hierfür wird Wirkung als Reduktionsmittel im Plasma selbst angenommen. Hierdurch wird meßbar die Bildung von Rheniumoxiden aus dem Filamentdraht herab gesetzt (s. Abb. 25 und 26). Der Effekt wird bei unterschiedlichen Filamenten verschieden stark ausgeprägt beobachtet.

ReO_3^-	m/z 233/235	ion ratio 63 : 37
ReO_4^-	m/z 249/251	ion ratio 63 : 37

Im Verlaufe der Untersuchungen wurde deshalb für eine Reihe von Reaktantgas-Gemischen die Beimengung von Helium gegen einen gleichen Anteil Wasserstoff ersetzt.

Die Bewertung der einzelnen Reaktantgase erfolgt im Hinblick auf ihre mögliche praktische Eignung für die Rückstandsanalyse. Neben der einfachen und kontinuierlichen Verfügbarkeit der Ausgangskomponenten wurden als Kriterien besonders herangezogen:

I. Reproduzierbarkeit der Mischung:

Es umfasst die Handhabung der Gase bzw. Flüssigkeiten, die Erzeugung des erforderlichen Vordruckes und die Feineinstellung an den entsprechenden Nadelventilen zur Erzeugung eines gewünschten Vordruckes und Reaktantgasclusters.

II. Memory Effekt:

Es geht hier die Verweilzeit von Ionen aus dem verwendeten Reaktantgas im System nach Absetzen der Mischung ein. Lange Verweilzeiten werden im Wesentlichen verursacht durch Aufnahme und langsames Freisetzen von einzelnen Komponenten in Kunststoff-Dichtungen und -Schlauchleitungen des Vakuumsystems. Ebenso kann ein gutes Lösungsverhalten im Pumpenöl zum Memory Effekt beitragen.

III. Qualität des Reaktantgas-Clusters:

Für die angestrebte selektive Ionisierung des Substrats soll sichergestellt sein, daß das ausgewählte Reaktantgas-Ion die stärkste Gasphasen-Basizität besitzt. Die Reaktantgas-Mischung soll möglichst ein dominierendes Cluster-Ion mit hohen Intensitäten generieren. Weitere Ionen sollen im Cluster nach Möglichkeit nicht oder mit geringer Intensität auftreten. Adduktbildungen sollen ausgeschlossen sein.

IV. Langzeit-Stabilität des Reaktantgas-Clusters:

Nach einer einmal vorgenommenen mechanischen Einstellung des Gemisches, z.B. am Beginn des Meßtages, wird ein stabiles Cluster bezüglich Zusammensetzung und Intensität über den Tag erwartet.

Zusätzlich werden Einschränkungen gemacht, die eine Gefährdung des Filamentes oder der Vakuumpumpen ausschließen, wie dies z. B für stark oxidierende Medien gelten würde. Aus diesem Grund wird das Gemisch aus $\text{N}_2\text{O}/\text{He}$ von der Verwendung ausgeschlossen, da das entstehende O^- innerhalb kurzer Zeit zum Durchbrennen des Filamentes führt.

In Tabelle 8/17 werden die Beurteilungen der untersuchten Reaktantgase und Mischungen entsprechend der genannten Kriterien I. bis IV. zusammengefasst. Für jede Kategorie wurden die Angaben nach rein praktischen Gesichtspunkten aus der Skala sehr gut (++) , gut (+) , problematisch (-) und ungeeignet (--) gemacht, ohne daß an dieser Stelle auf die Ursachen für das betreffende Verhalten verwiesen wird (s. hierzu Kap. 8.3.2.). Ein Gesamturteil faßt die Bewertungskriterien zusammen.

Tab. 8/17: Beurteilung der untersuchten Reaktantgase

Nr.	Mischung	I	II	III	IV	Gesamturteil
1	Acetonitril	+	+	-	++	wenig geeignet
2	Acetonitril/H ₂	-	+	--	++	ungeeignet
3	Chloroform/N ₂ O/He/H ₂	++	+	--	++	ungeeignet
4	Tetrafluormethan	+	++	+	++	sehr gut geeignet
5	Tetrafluormethan/H ₂	+	++	++	++	sehr gut geeignet
6	Essigsäure	+	+	-	-	wenig geeignet
7	Essigsäure/H ₂	+	+	+	-	wenig geeignet
8	Essigsäure-Anhydrid	-	+	+	+	geeignet
9	Cyanwasserstoff	+	++	-	-	wenig geeignet
10	Cyanwasserstoff/H ₂ viel	+	++	++	+	sehr gut geeignet
11	Cyanwasserstoff/H ₂ wenig	+	++	+	+	gut geeignet
12	Cyanwasserstoff/N ₂ O/He/H ₂	+	++	-	+	ungeeignet
13	Methanol/N ₂ O/H ₂	++	+	++	++	sehr gut geeignet
14	N ₂ O/He	++	++	+	++	nicht geeignet ¹⁾
15	N ₂ O/He/H ₂	++	++	++	++	sehr gut geeignet
16	N ₂ O/H ₂	++	++	+	++	sehr gut geeignet
17	N ₂ O/Methan	++	++	+	++	nicht geeignet ²⁾
18	N ₂ O/Methan/He	++	++	++	++	nicht geeignet ²⁾
19	Aceton	+	--	-	++	ungeeignet
20	Aceton/N ₂ O/He/H ₂	+	--	++	++	ungeeignet
21	Schwefelhexafluorid	+	--	-	++	ungeeignet
22	Ammoniak	+	+	--	+	ungeeignet

¹⁾ Gefährdung des Filamentes durch O⁻

²⁾ Erhöhung des chemischen Untergrundes, s. Text

Auf diese Weise ergeben sich vier Reaktantgas-Mischungen, die aussichtsreich für die Analyse von Testsubstanzen eingesetzt werden können, sodaß Reaktantgase unterschiedlicher Basizität zur Verfügung stehen.

Tab. 8/18: Reaktantgase für die Analyse der Testsubstanzen

Nr.	Reaktantgas-Mischung	Reaktant-Ion
1	Cyanwasserstoff/H ₂ (hoher Anteil)	CN ⁻
2	Methanol/N ₂ O/H ₂	CH ₃ O ⁻
3	N ₂ O/He/H ₂	OH ⁻
4	Tetrafluormethan/H ₂	F ⁻

Das Gemisch N₂O/He/H₂ wurde ausgewählt, weil es sehr intensiv Hydroxylionen liefert, durch den Wasserstoff-Anteil eine hohe Lebensdauer des Filamentes garantiert und sehr übersichtliche Spektren liefert.

Vergleicht man die Methylat- und Ethylat-Erzeugung, so verdient Methanol als Reaktantgas den Vorzug, weil es aufgrund des niedrigeren Siedepunktes leichter handhabbar ist. Die Ionisierung der Substratmoleküle erfolgt in gleicher Weise.

Die Erzeugung von Fluorid gelingt problemlos mit Tetrafluormethan und Wasserstoff.

Von den untersuchten Gemischen zur Cyanid-Erzeugung ist die Verwendung von Cyanwasserstoff mit hohem Wasserstoff-Anteil am besten geeignet, weil es die höchste Ausbeute an Cyanid liefert und leicht einzustellen ist.

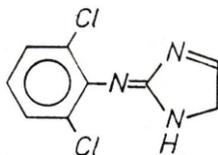
8.3.4. Ionisierung der Testsubstanzen

Nach der Festlegung von vier geeigneten Reaktantgasen unterschiedlicher Selektivität, wurden diese zur praktischen Erprobung zur Ionisierung von Testsubstanzen eingesetzt. Hierzu wurden die interessierenden Anabolika und einige exemplarische Vertreter mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen zusammengestellt. Diese repräsentieren die Gasphasenaziditäts-Skala vom stark basischen bis stark sauren Bereich (s. Abb. 22).

Die eingesetzte Menge wurde für alle Testsubstanzen konstant gehalten. Sie betrug jeweils 1 µg auf dem Goldstab der 'extended probe'-modifizierten Schubstange. Es wird dabei angenommen, daß die eingesetzte Menge jeder Substanz über der mit dieser Methode erreichbaren Nachweisgrenze liegt. Sättigungseffekte innerhalb der Ionenquelle finden bei der qualitativen Untersuchung der Ionisierungs-Möglichkeiten keine Berücksichtigung. Die Ionisierungskapazität eines Reaktantgasplasmas wird bei einer stabilen Intensität des Reaktant-Ions innerhalb der Meßserie als konstant betrachtet. Die erhaltenen Intensitäten für (Pseudo-) Molmassen und Fragmente spiegeln somit den Einfluß der unterschiedlichen Molekülstruktur auf die Wechselwirkung mit dem Reaktantgas wieder. Zur besseren Einschätzung der Vorgänge in der Ionenquelle wurden jeweils die positiven und negativen Massenspektren aufgenommen (PPINICI-Mode).

Im Folgenden werden die Resultate und einige theoretische Überlegungen in Bezug auf das Gasphasenverhalten diskutiert. Die gefundenen Ionenintensitäten werden in Kapitel 8.3.5. in zwei Tabellen zusammengefaßt.

8.3.4.1. Clonidin



CLO

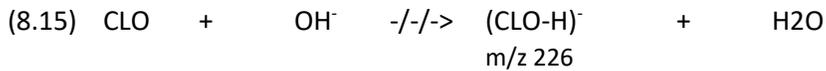
M 227,00 g/mol

C₉H₇Cl₂N₃

dH⁰acid = 396 kcal/mol

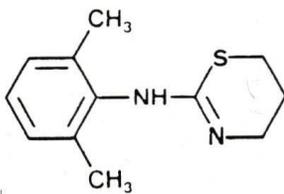
Clonidin ist in der Reihe der Testsubstanzen die schwächste Brønstedt-Säure. Die Substanz wird als β-Blocker zur Ruhigstellung von Schlachttieren eingesetzt.

Die angegebene Reaktionsenthalpie bezieht sich auf den schwach sauren Wasserstoff der Imidgruppe. Die Basizität von Clonidin ist höher als die der ausgewählten Reaktantgase. Selbst Hydroxyl-Ionen (391 kcal/mol) können auf der Grundlage des theoretischen Ansatzes nicht mit Clonidin unter Wasserstoff-Abstraktion nach (8.15) reagieren.



Die erhaltenen Resultate entsprechen den theoretischen Überlegungen. Bei keinem der untersuchten Reaktantgas-Mischungen können aus dem Clonidin entstehende Ionen im Bereich der Molmasse erhalten werden. Fragmentierungen treten nicht auf.

8.3.4.2. Xylazin



XYL

M 220.10 g/mol

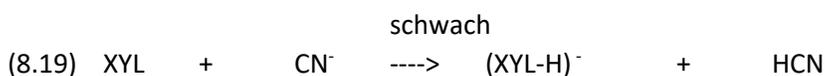
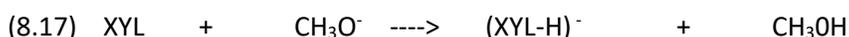
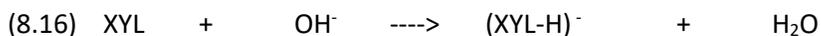
C₁₂H₁₆N₂S

dH⁰acid < 396 kcal/mol

Xylazin ist ein 1,3-Thiazinderivat und wird als Neuroleptikum in der Tiermast eingesetzt (43). Es wird wegen seiner stark analgetischen und sedativen Wirkung insbesondere bei Verladung und Transport zur Beruhigung der Tiere verwendet.

Das Molekül weist ähnlich wie Clonidin eine zentrale Imidgruppe auf, für deren schwach aziden Wasserstoff sich eine vergleichbare Reaktionsenthalpie (396 kcal/mol) aus der Aziditäts-Skala ergibt. Bei Berücksichtigung der Stellung der Imidgruppe innerhalb des Moleküls als Bindeglied zweier elektronenreicher Strukturelemente kann sich durch Ausbildung mesomerer Grenzformen eine niedrigere als die angegebene Basizität ergeben. Einen zusätzlichen induktiven Einfluß üben die am Aromaten in alpha-Stellung zur Imidsubstitution stehenden Methylgruppen aus. Eine quantitative Abschätzung dieser Struktureinflüsse auf die Basizität des Xylazins ist an dieser Stelle auf Basis von theoretischen Erwägungen nicht möglich.

Das Ionisierungsverhalten des Xylazins belegt den starken Mesomerieeinfluß auf die Gasphasen-Basizität des Moleküls. Die Reaktant-Ionen OH⁻, CH₃O⁻ und F⁻ erzeugen hohe Intensitäten des (M-H)⁻-Ions. Cyanid dagegen reagiert durch Wasserstoff-Abstraktion vergleichsweise schwach.



Fragmentierungen treten im NCI im Gegensatz zur Ionisierung mit Methan (43) nur gering auf, was die Mesomeriestabilisierung des Moleküls bestätigt. Dominierende Abspaltungsreaktion im PCI ist der Verlust von Methyl zum Fragment m/z 205.

Bei Kenntnis der Ionisierungsverhalten der übrigen Testsubstanzen kann Xylazin unter Zuhilfenahme der Pseudomolpeak-Intensitäten in die Rangfolge der Basizitäten in den Bereich zwischen DES (350 kcal/mol) und Chlorbenzoesäure (336 kcal/mol) eingeordnet werden (s. Tab. 8/19 u. 8/20). Mit der hier empirisch ermittelten Basizität von unter 350 kcal/mol führt die Einbindung der Imidgruppe in das mesomeriestabilisierte System des Xylazins somit zu einer Steigerung der Azidität um über 45 kcal/mol. Dies erklärt die schwache Reaktion des Cyanid, dessen Basizität mit 353 kcal/mol ebenfalls in diesen Bereich fällt.

8.3.4.3. Tetradecanol

$C_{14}H_{29}OH$

TET

M 214.23 g/mol

$C_{14}H_{30}O$

$dH^0_{acid} = 214$ kcal/mol

Tetradecanol wurde in die Gruppe der Testsubstanzen als Vertreter der langkettigen Alkohole aufgenommen, wie diese in der Form von z. B. Sphingolipiden als wichtige Membrankomponenten in pflanzlichen und tierischen Zellen zu finden sind. Ein Beitrag dieser Substanzen und deren Abbauprodukte zur biologischen Matrix des Extraktes kann nicht ausgeschlossen werden.

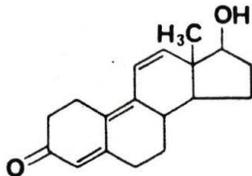
Die Reaktant-Ionen OH^- und CH_3O^- liefern $(M-H)^-$ durch Abstraktion des alkoholischen Wasserstoffs. Im positiven Spektrum dominiert bei beiden Reaktantgasen als Basepeak $(M-H)^+$ neben $(M-OH)^+$ mit ebenfalls hoher Intensität.

Fluorid bildet mit Tetradecanol das Anlagerungsprodukt $(M+F)^-$ als Basepeak neben einem intensiven durch Wasserstoff-Abspaltung entstandenen Fragment $(M-3H)^-$. Es wird durch das Massenfragmentogramm eindeutig Tetradecanol zugeordnet.

Das positive Spektrum zeigt M^+ als Basepeak. Fragmentierungen des Kohlenstoff-Gerüsts werden bei Fluorid und ebenso bei OH^- und CH_3O^- nicht beobachtet.

Cyanid ionisiert den Alkohol nicht. Im Spektrum der negativen Ionen ist eine unspezifische Fragmentierung des Moleküls durch sukzessiven Abbau von CH_2 -Bruchstücken zu erkennen. Das Ausbleiben der Wasserstoff-Abstraktion steht in Übereinstimmung mit den ermittelten Aziditäten. Im Positiven wird $(M-OH)^+$ als Basepeak erhalten. Das Pseudomolekular-Ion $(M-H)^-$ ist mit geringer Intensität vorhanden.

8.3.4.4. Trenbolon



TRE

M 270,16 g/mol

$C_{18}H_{22}O$

(a) $dH^{\circ}_{acid} = 367$ kcal/mol

(b) $dH^{\circ}_{acid} = 369$ kcal/mol

Das synthetische Androgen wird als Anabolikum in der Rindermast eingesetzt. Ein gemeinsames massenspektrometrisches Verfahren für Trenbolon mit den übrigen als Anabolika eingesetzten Substanzen ist zur Zeit nicht verfügbar (2, 50).

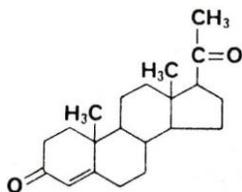
Die Anwendung der NCI eröffnet bei Betrachtung der Basizitäten die Möglichkeit, mit OH^- und CH_3O^- eine schonende Ionisierung des Trenbolons zu erhalten, während CN^- zur Transparenz führen sollte. Fluorid weist eine dem Trenbolon vergleichbare Basizität auf, sodaß eine Prognose unsicher wird. Zur Wasserstoffabstraktion stehen sowohl eine enolische Gruppierung (a) als auch eine sekundäre alkoholische OH-Gruppe (b) zur Verfügung, die sich in der Basizität jedoch nur gering unterscheiden.

Bei der Analyse zeigt Trenbolon ein außerordentlich ungünstiges Abdampfverhalten vom Golddraht. Bei einer Latenzzeit von 2-4 min folgt ein schwaches über 6-8 min langgezogenes Signal, Trenbolon wird stark auf der 'extended probe' zurückgehalten. Für OH^- und F^- wird ein M^- erhalten, lediglich CH_3O^- führt zu $(M-H)^-$. Im Cyanidplasma ist die Substanz entsprechend der Basizitäten-Kalkulation transparent.

Im positiven Spektrum wird mit allen vier Reaktantgas-Mischungen kein Signal für Trenbolon erhalten.

Es zeigt sich, daß zwar die prinzipielle Realisierbarkeit der NCI für Trenbolon gegeben ist, jedoch ein verwertbares Signal aufgrund des unzureichenden Signal/Rausch-Verhältnisses mit der eingesetzten Versuchsanordnung nicht zu erhalten ist. Ein direkt heizbarer Metall-Faden als DCI-Träger, der für diese Untersuchungen leider nicht zur Verfügung stand, kann durch drastische Verkürzung der Verdampfungszeit zum Erfolg führen (110, 111).

8.3.4.5. Progesteron



PRO

M 314.22 g/mol

$C_{19}H_{30}O_2$

(a) $dH^{\circ}_{acid} = 367$ kcal/mol

(b) $dH^{\circ}_{acid} = 371$ kcal/mol

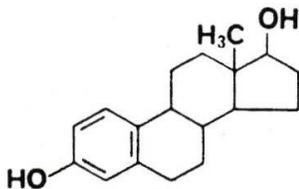
Progesteron steht als natürlich vorkommendes Hormon innerhalb der Testreihe als Vertreter der Keto-Steroide. Ein verstärktes Vorkommen des Gestagens in Fleischextrakten wird nicht erwartet. Zur Protonenabstraktion stehen im Molekül zwei Enol-Gruppierungen mit nahezu gleicher Basizität zur Verfügung (Ring A (a), Seitenkette (b)).

Im OH⁻-Plasma werden mit Progesteron hohe Intensitäten für (M-H)⁻ und (M+H)⁺ erzielt. Im positiven Spektrum tritt deutlich Fragmentierung auf. Mit Methylat wird zwar ein intensives (M+H)⁺ gebildet, eine Reaktion zu (M-H)⁻ tritt dagegen nur gering in Erscheinung. Im Positiven wird wiederum deutlich Fragmentierung beobachtet, insbesondere tritt Methyl-Abspaltung auf.

Fluorid reagiert mit Progesteron unter Wasserstoff-Abstraktion zu (M-H)⁻. Im positiven Spektrum bleibt die Ionisierung der Substanz aus.

Das Cyanid-Plasma verhält sich entgegengesetzt. Es werden relativ hohe (M+H)⁺-Intensitäten erzielt. Dagegen werden im Negativen Fragmentierungen nur mit geringer Intensität und der Molpeak gar nicht beobachtet. Die ausbleibende Wasserstoff-Abstraktion steht in Einklang mit den ermittelten Basizitäten.

8.3.4.6. 17β-Östradiol



OST

M 272.17 g/mol

C₁₈H₂₄O₂

(a) dH⁰acid = 350 kcal/mol

(b) dH⁰acid = 369 kcal/mol

17β-Östradiol ist als natürlich vorkommendes Hormon im Muskelfleisch zu finden und wird bei der Anabolika-Aufarbeitung ebenfalls extrahiert. Die beiden OH-Gruppen des Östradiols unterscheiden sich stark in ihrer Basizität. Ein gutes NCI-Signal ist durch Abstraktion des phenolischen H (a) zu erwarten.

Hydroxyl-Ionen reagieren mit Östradiol erwartungsgemäß unter Bildung des (M-H)⁻ als Basepeak mit hoher Intensität. Fragmentierungen treten nicht auf, das Spektrum enthält nur wenige Ionen. Im Positiven wird (M+H)⁺ als Basepeak, insgesamt aber als schwaches Signal registriert. Mit gleicher Intensität tritt eine Hydroxyl-Abspaltung auf.

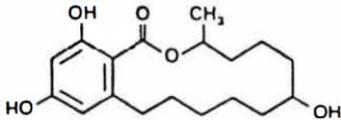
Methylat dagegen liefert kein (M-H)⁻ des Östradiols. Es tritt mit hoher Intensität eine unspezifische Fragmentierung auf. Im Positiven wird (M+H)⁺ gebildet, das von einer OH-Abspaltung als Basepeak begleitet wird; dazu werden Fragmentierungs-Reaktionen gefunden.

Sehr gute Resultate werden bei der Ionisierung im Fluorid-Plasma erzielt. Das (M-H)⁻ -Ion ist als Basepeak mit hoher Intensität in einem an Fragmenten armen Spektrum enthalten. Das positive Spektrum zeigt kein Signal des Östradiols.

Die Ionisierung des Östradiols findet durch Fluorid ausschließlich durch Abstraktion des phenolischen Wasserstoffs statt. Das Meßsignal teilt sich nicht in Fragmente oder zusätzliche positive Ionen auf, sodaß die gesamte Östradiolmenge zur Intensität des $(M-H)^-$ beiträgt.

Im Cyanidplasma wird Östradiol mit hohen Intensitäten ionisiert. Im Positiven wird wiederum $(M+H)^+$ und ein Fragment durch OH-Abspaltung gebildet. Das negative Spektrum zeigt kein Molekül-Ion. Es tritt starke Fragmentierung auf.

8.3.4.7. Zeranol



ZER

M 322,18 g/mol

$C_{18}H_{26}O_5$

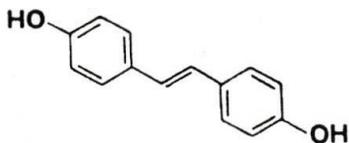
(a) $dH^{\text{acid}} = 350$ kcal/mol

(b) $dH^{\text{acid}} = 369$ kcal/mol

Zeranol ist als Anabolikum mykotoxinischen Ursprungs in der Reihe der Testsubstanzen vorhanden. Das Molekül wird durch drei OH-Gruppen charakterisiert, von denen eine phenolische Gruppe eine Wasserstoff-Brücke zur benachbarten Carbonylgruppe bildet. Die freie phenolische OH-Gruppe (a) steht gegenüber der alkoholischen OH-Gruppe (b) leichter für eine Wasserstoff-Abstraktion in NCI zur Verfügung.

Das $(M-H)^-$ -Ion wird von OH^- , CH_3O^- und CN^- in unterschiedlichen Intensitäten gebildet. Während das Ion im OH^- -Plasma als Basepeak erscheint, wobei keine Fragmentierung auftritt, wird das Molekülion bei Methylat und Cyanid neben deutlicher Fragmentierung nur zu geringen Anteilen gebildet. Entsprechend der sukzessiven Abspaltung der cyclischen Ester-Seitenkette, beginnend mit einer Wasser-Abspaltung, erhält man linienreiche Spektren.

8.3.4.8. Stilböstrol



STI

M 212,08 g/mol

$C_{14}H_{22}O_2$

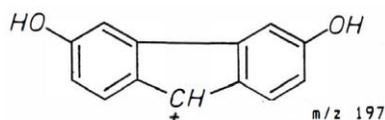
$dH^{\text{acid}} = 350$ kcal/mol

Stilböstrol zeigt in der Struktur den Grundkörper der synthetischen Anabolika DES, HEX und DIEN. Die anabole Wirkung selbst ist dabei gering (18).

Das Molekül bildet als Dihydroxy-Stilbenderivat ein konjugiertes System aus, das in der Lage ist, eine durch Reaktion mit einer Brønstedt-Base gebildete negative Ladung durch Mesomerie ideal zu stabilisieren. Analoge Verhältnisse sind bei den übrigen Stilbenderivaten anzutreffen.

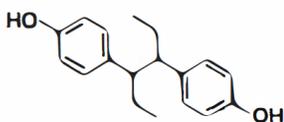
Diesen Überlegungen entsprechend wird Stilböstrol von OH^- , F^- und CN^- durch Wasserstoff-Abstraktion ionisiert. Das $(\text{M}-\text{H})^-$ -Ion wird mit hohen Intensitäten als Basepeak gebildet. Lediglich im Cyanid-Plasma ist im NCI stärkere, das Molekülion an Intensität übertreffende Fragmentierung zu beobachten.

Fluorid liefert kein positives Spektrum des Stilböstrols. OH^- und CN^- dagegen ergeben $(\text{M}+\text{H})^+$ als Basepeak.



Zur Bildung des in NCI auftretenden Ions m/z 197 wird eine Umlagerung vorgeschlagen, die zur Abspaltung von Methyl aus dem Ethenyl-Kern führt (13). Sobald weitere Substituenten im Molekül vorhanden sind, werden zusätzliche Fragmentierungswege eröffnet. Die Umlagerung tritt als Folge gering oder gar nicht in Erscheinung (112). Bei HEX, DIEN und DES wird die Reaktion nicht beobachtet.

8.3.4.9. Hexöstrol



HEX

M 270,16 g/mol

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_2$

$\text{dH}^{\text{acid}} = 350 \text{ kcal/mol}$

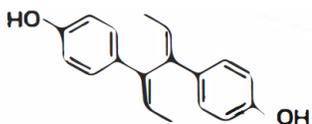
Aus der Gruppe der synthetischen östrogen wirkenden Stilbenderivate kann das Anabolikum Hexöstrol eine negative Ladung wegen fehlender konjugierender Doppelbindung nur innerhalb eines Phenolkörpers durch Mesomerie stabilisieren. Als Folge werden vergleichsweise geringe Intensitäten der Molmassen bei stärkerem Auftreten von Fragmenten erwartet.

Bei der Ionisierung mit OH^- und F^- wird als Basepeak $(\text{M}-\text{H})^-$ gebildet. Fragmentierungen treten im negativen Spektrum des OH^- -Plasmas nicht hervor. Durch Fluorid dagegen findet die Abspaltung von Hydroxyl $(\text{M}-\text{OH})^-$ und eines Phenolsubstituenten $(\text{M}-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})^-$ (m/z 177) neben weiteren Fragmentierungen statt. Mit geringer Intensität werden Addukte des F^- beobachtet $(\text{M}+\text{F})^-$ (m/z 289). Im Positiven überwiegen bei beiden Reaktantgas-Mischungen Fragmentierungsreaktionen; (Quasi-)Molekülionen werden nicht gebildet. Als häufigste Reaktion tritt die Abspaltung eines Phenylsubstituenten auf $(\text{M}-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})^-$ (m/z 177) bzw. (m/z 175) bei Fluorid mit einhergehender H_2 -Eliminierung.

Das Methylat-Plasma bildet zwar mit Hexöstrol ein $(\text{M}-\text{H})^-$, es überwiegt aber deutlich die Abspaltung eines Phenolsubstituenten mit einhergehender H_2 -Eliminierung. Im Positiven wird kein Molekülion $(\text{M}+\text{H})^+$ gebildet, es tritt intensive Fragmentierung auf. Als Basepeak wird die Abspaltung eines Phenolsubstituenten erhalten.

Cyanid liefert in NCI und PCI das Molekülion mit nur geringer Ausbeute. Fragmentierungsreaktionen überwiegen deutlich. Im Negativen wird die Adduktbildung zu $(M+CN)^-$ (m/z 296) beobachtet.

8.3.4.10. Dienöstrol



DIEN

M 266,13 g/mol

$C_{18}H_{18}O_2$

$dH^{\circ}_{acid} = 350$ kcal/mol

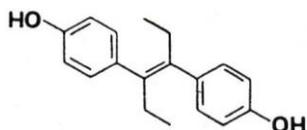
Dienöstrol als weiterer Vertreter der synthetischen Stilbenderivate enthält trotz der beiden Doppelbindungen an der C2-Brücke kein durchkonjugiertes System. In gleicher Weise wie Hexöstrol können Ladungen nicht über das gesamte Molekül stabilisiert werden; es entstehen linienreiche Spektren.

Hydroxyl-Ionen liefern das $(M-H)^-$ Ion, das aber an Intensität von dem Fragment m/z 175, entstanden durch Phenyl-Abspaltung, übertroffen wird. Im Positiven tritt die Abspaltung ebenfalls (m/z 173) ein; als Basepeak wird ein Bruchstück nach zusätzlicher Methyl-Abspaltung (m/z 157) gebildet. Das Molekülion $(M+H)^+$ ist mit geringer Intensität vorhanden. Es tritt starke Fragmentierung auf.

Methylat liefert dem OH^- -Plasma vergleichbare Spektren bei geringerer Fragmentierung. Auffällig ist die höhere Intensität im negativen Spektrum.

Fluorid reagiert mit Dienöstrol unter Bildung des $(M-H)^-$ -Ions als Basepeak. Fragmentierungen treten ebenso wie Adduktbildungen zu $(M+F)^-$ (m/z 285) nur gering auf. Das positive Spektrum wird von der Abspaltung eines Phenolsubstituenten geprägt (m/z 175). Ein $(M+H)^+$ tritt nicht auf, dagegen ist ein M^+ zu beobachten. Im negativen Cyanid-Plasma tritt starke Fragmentierung auf. Das Molekülion $(M-H)^-$ ist nur mit geringer Intensität vorhanden. Basepeak ist ein Fragment m/z 159, entstanden durch Methyl- und Phenyl-Abspaltung. Im positiven Spektrum wird $(M+H)^+$ mit hoher Intensität gebildet. Die Fragmentierung durch Eliminierung eines Phenolsubstituenten ist gering.

8.3.4.11. Diethylstilböstrol



DES

M 268,37 g/mol

$C_{18}H_{20}O_2$

$dH^{\circ}_{acid} < 350$ kcal/mol

Diethylstilböstrol ist ein synthetisches Stilbenderivat mit starker anaboler Wirkung. Die beiden Phenolkörper des Moleküls sind über eine zentrale Doppelbindung konjugiert. Eine Vielzahl von Mesomeren kann das durch Abstraktion eines phenolischen Wasserstoffs entstehende Anion stabilisieren.

Alle vier untersuchten Reaktantgase ergeben mit DES (M-H)⁻ in hoher Intensität. Das Molekül-Anion ist Basepeak. Einzig im Cyanidplasma wird das Addukt (M+CN)⁻ (m/z 294) mit höherer Intensität gefunden. Man erhält allgemein übersichtliche Spektren mit geringem Untergrund. Fragmentierungen entstehen in unterschiedlichen Intensitäten, wobei wiederum für alle vier Reaktantgase gleich als bevorzugte Abspaltungsreaktion die Eliminierung eines Phenolsubstituenten (M-C₆H₄OH)⁻ (m/z 175) stattfindet. Am stärksten ausgeprägt ist diese Spaltung bei CH₃O⁻ zu 80% zu beobachten, gefolgt von OH⁻ mit 60% des Basepeaks. Cyanid und Fluorid bilden das Fragment nur gering (5%).

Die positiven Spektren ergeben für OH⁻, CH₃O⁻ und CN⁻ das Pseudo-Molekülion (M+H)⁺ als Basepeak. Fluorid liefert das Molekülion M⁺ als Basepeak neben der Abspaltung einer OH-Gruppe (M-17)⁺. Als Fragmentierung tritt auch hier bevorzugt die Abspaltung der Phenyl-Gruppierung auf. Die Spektren zeigen bei OH⁻ und CH₃O⁻ Fragmentierungen mit hohem Untergrund; Fluorid und Cyanid dagegen liefern linienarme untergrundfreie Spektren.

Zusätzlich zu den für die Testreihe ausgewählten Reaktantgas-Mischungen wurde bei DES eine acetat-generierende Mischung aus Essigsäure-Anhydrid und Wasserstoff eingesetzt. Nach den ermittelten Werten aus der Gasphasenaziditäts-Skala liegen DES (350 kcal/mol) und Essigsäure (349 kcal/mol) eng benachbart. Bei einer Aziditätssteigerung des DES durch Einflüsse der konjugierten Molekülstruktur (im Gegensatz zu HEX und DIEN), wäre eine Wasserstoff-Abstraktion durch Acetat denkbar.

Die Spektren zeigen im Negativen schwache Anteile (< 5%) des Molekülansions (M-H)⁻, die durch eine Reihe von intensiven Addukten überdeckt werden. Basepeak ist (M+Acetat)⁻ (m/z 327), Fragmente treten nicht auf.

Es kann somit hier auf eine Abstraktionsreaktion durch Acetat geschlossen werden, die jedoch durch einen starken Trend zur Adduktbildung überdeckt wird und zu analytischen Zwecken an dieser Stelle nicht ausgenutzt werden kann.

Im Positiven wird eine Protonierung des DES nicht beobachtet. Im oberen Massenbereich sind Addukte mit Reaktantgas-Ionen vorhanden. Als Basepeak findet sich das Fragment nach Phenyl-Abspaltung.

8.3.4.12. Heptadecansäure und Stearinsäure



M 270,47 g/mol



M 284,27 g/mol

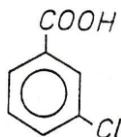
dH⁰acid = 373 kcal/mol

Heptadecensäure und Stearinsäure stehen als Vertreter langkettiger organischer Säuren in der Reihe der Testsubstanzen. Eine Extraktion von organischen Säuren im Anabolika-Aufarbeitungsgang kann als Bestandteil der Matrix nicht völlig ausgeschlossen werden. Die untersuchten Reaktant-Ionen OH^- , CH_3O^- , F^- und CN^- liefern gleichermaßen für beide Säuren $(\text{M}-\text{H})^-$ als Basepeak in den NCI-Spektren. Mit Ausnahme bei Cyanid wird als wichtigste Fragmentierung $(\text{M}-\text{OH})^-$ gebildet. Fluorid liefert sehr untergrundarme Spektren.

Im Positiven werden bei OH^- , CH_3O^- und CN^- durch Protonierung $(\text{M}+\text{H})^+$ als Basepeak erhalten. Starke Fragmentierungen treten auf bei OH^- und CH_3O^- . Das wichtigste Abspaltungsprodukt ist hier ebenfalls $(\text{M}-\text{OH})^+$.

Fluorid liefert kein Protonierungsprodukt. $(\text{M}-\text{H})^+$ wird mit mittlerer Intensität gebildet. Basepeak ist jeweils ein Alkylfragment der Masse m/z 155. Weitere intensive Fragmente entstehen durch Wasserabspaltung (m/z 251 und 265) aus $(\text{M}-\text{H})^+$ und Hydroxylabspaltung (m/z 253 und 267).

8.3.4.13. 3-Chlor-Benzoessäure



CBS

M 156,0 g/mol

$\text{C}_7\text{H}_5\text{ClO}_2$

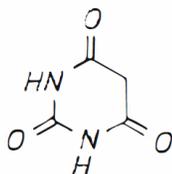
$d\text{H}^0_{\text{acid}} = 336 \text{ kcal/mol}$

Gemeinsam Barbitursäure steht die chloresubstituierte Benzoessäure als starke Brønstedt Säure mit in der Reihe der Testsubstanzen.

In entsprechender Weise sind die NCI-Spektren der untersuchten Reaktantgase geprägt von $(\text{M}-\text{H})^-$ als Basepeak mit hohen Intensitäten. Es werden überwiegend fragmentarme Spektren beobachtet.

Im Positiven wird bei OH^- und CN^- durch Protonierung $(\text{M}+\text{H})^+$ gebildet. Fragmentierungsreaktionen sind von geringer Bedeutung. Bei Fluorid und Methylat dagegen wird $(\text{M}+\text{H})^+$ nicht bzw. nur schwach erzeugt und es tritt starke Fragmentierung auf.

8.3.4.14. Barbitursäure



CBS

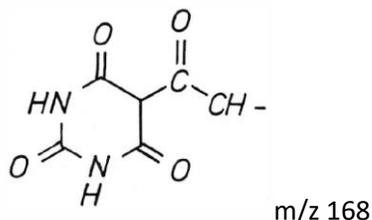
M 128,11 g/mol

$\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3$

$d\text{H}^0_{\text{acid}} = 335 \text{ kcal/mol}$

Barbitursäure steht als stark saure Substanz in der Testreihe. Azide Wasserstoffe ergeben sich durch zwei Keto-Gruppen, die in alpha-Stellung zu einer Methylengruppe stehen.

Gemeinsam für alle untersuchten Reaktantgasmischungen ist das Auftreten eines Anions der Masse m/z 168 als Basepeak, das eindeutig der Barbitursäure zuzuordnen ist und als Fragment des Dimerisierungsproduktes von Barbitursäure durch Carbonylreaktion aufgefasst werden kann. Es wird für das Fragment die folgende Struktur vorgeschlagen:



Durch mesomere Grenzformen kann das gebildete Anion stabilisiert werden. Im OH^- Plasma wird neben dem Fragment-Anion m/z 168 keine weitere Spaltungsreaktion beobachtet. Molekülanionen sind nicht vorhanden.

Methylat reagiert in analoger Weise. Als Basepeak entsteht das Dimerfragment-Anion. Mit geringer Intensität wird $(\text{M-H})^-$ gebildet. $(\text{M+H})^+$ erscheint dagegen im Positiven besonders stark. Fluorid und Cyanid liefern im Negativen $(\text{M-H})^-$ mit mittleren Ausbeuten neben dem Dimerfragment als Basepeak. Im Positiven wird bei Fluorid starke Fragmentierung beobachtet. Cyanid liefert linienarme Spektren.

8.3.5. Bewertung der Reaktantgas-Mischungen

Aus den Ergebnissen der Versuchsserien werden die intensivsten Ionen der positiven und negativen Massenspektren tabellarisch zusammengefasst (s. Tab. 8/19). Bis auf wenige Ausnahmen werden in den negativen Spektren die Molekül-Anionen der Testsubstanzen gefunden. In den positiven Spektren dominieren $(\text{M+H})^+$ Ionen. Die Intensität der $(\text{M-H})^-$ -Ionen spiegelt keine gleichförmige Zunahme zu CBS hin wieder. Die Ergebnisse dieser orientierenden Versuche stehen im Einklang mit der Erwartung, daß die Intensität der gebildeten Ionen nur von ihrer Struktur, nicht aber von der Differenz der Reaktionsenthalpie zwischen funktioneller Gruppe der Testsubstanz und des ionisierenden Agens, abhängt.

Zur quantitativen Bestimmung der Substanzen wird der zeitliche Intensitätsverlauf für die Pseudo-Molmassen $(\text{M+H})^+$ und $(\text{M-H})^-$ erfaßt. Die Auswertung erfolgt durch Integration, die Peakflächen für 1 μg Testsubstanz sind in Tabelle 8/20 zusammengestellt. Sie wurden als Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen durchgeführten Messungen errechnet.

Die vier ausgewählten Reaktantgas-Mischungen zeigen die durch Minderung der Basizität erwartete Selektivität, wobei Cyanid als einziges nur mit den phenolischen und carbonsauren Verbindungen Anionen erzeugt.

Das stark basische Clonidin wird von keinem der vier Reaktantgase ionisiert. Dieses Verhalten entspricht den eingangs angestellten Abschätzungen auf Basis der Gasphasenaziditäts-Skala.

Xylazin verhält sich anders als ein einfaches sekundäres Amin (s. hierzu auch Kap. 8.3.4.2.). Aus den Intensitäten der Molmassen ist auf eine starke Stabilisierung des Moleküls durch Mesomerie und eine höhere Azidität des Imidwasserstoffs zu schließen.

Das zentral interessierende Anabolikum DES wird von allen vier Reaktantgasen mit etwa gleich guter Empfindlichkeit ionisiert, weil es ein gut resonanzstabilisiertes Anion ausbildet. Die Ionisierung der übrigen synthetischen Stilbenderivate STI, HEX und DIEN schwankt im Vergleich der einzelnen Reaktantgase. In diesen Fällen werden durch Fragmentierungsreaktionen die Intensitäten der Molmassen geschwächt. Vergleichbare Intensitäten werden lediglich bei STI beobachtet.

Die in die Reihe der Testsubstanzen aufgenommenen Fettsäuren Heptadecansäure und Stearinsäure, sowie der Fettalkohol Tetradeanol werden ebenfalls mit guter Empfindlichkeit ionisiert. Bei der Anwendung von Methylat tritt für diese Substanzen eine im Hinblick auf das DES deutlich geringere Ionisierung ein. Können die Lipidsubstanzen im Extraktionsschritt nicht völlig abgetrennt werden, ist hieraus ein Beitrag für den massenspektrometrischen Untergrund zu erwarten.

Die bisher kaum verwendeten Reaktant-Ionen Fluorid und Cyanid zeigen Eigenschaften, die sie für eine Anwendung in der Spurenanalyse attraktiv erscheinen lassen. So werden mit Fluorid durchweg keine Molmassen in den positiven Spektren erzeugt. Fragmentierungen sind in der Intensität begrenzt. Es ergibt sich damit bei der Ionisierung des DES und auch der übrigen Stilbenderivate eine Steigerung des NCI-Signals um ca. 30%.

Tab. 8/19: Basepeaks im positiven und negativen Massenspektrum (in Klammern Peakmaxima-Intensitäten 1/1000)

Substanz	M	OH ⁻		CH ₃ O ⁻		F ⁻		CN ⁻	
		pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
Clonidin	227	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylazin	220	220 (1.0)	219 (2.0)	205 (1.0)	219 (0.6)	220 (0.6)	219 (1.0)	221 (0.4)	219 (1.0)
Tetradecanol	214	213 (5.0)	213 (7.0)	197 (12)	213 (9.0)	213 (0.2)	233 (6.2)	197 (130)	-
Trenbolon	270	205 (0.2)	270 (0.8)	205 (9.2)	269 (0.2)	-	270 (0.1)	253 (1.0)	270 (10)
Progesteron	314	315 (3.2)	313 (0.9)	315 (2.0)	175 (0.5)	-	313 (2.2)	315 (2.0)	-
17β-Östradiol	272	255 (0.9)	271 (0.6)	255 (0.3)	175 (0.4)	-	271 (0.4)	273 (0.7)	202 (6.0)
Zeranol	322	-	321 (9.0)	305 (0.1)	321 (2.7)	n. b.	n. b.	305 (0.8)	202 (10)
Stilböstrol	212	213 (0.6)	211 (0.5)	n. b.	n. b.	-	211 (0.6)	213 (1.0)	-
Hexöstrol	270	177 (0.5)	269 (0.2)	177 (1.5)	175 (0.7)	175 (0.3)	269 (0.7)	177 (5.8)	-
Dienöstrol	266	267 (0.3)	175 (0.4)	173 (0.2)	175 (0.3)	-	265 (0.7)	267 (0.9)	265 (0.2)
Diethylstilböstrol	268	269 (0.8)	267 (2.1)	269 (2.2)	267 (1.3)	268 (0.3)	267 (2.2)	269 (12)	294 (1.8)
Heptadecansäure	270	271 (12)	269 (4.1)	271 (3.4)	269 (1.8)	251 (0.1)	269 (3.4)	271 (19)	269 (4.8)
Stearinsäure	284	285 (7.4)	283 (3.3)	285 (2.3)	283 (0.2)	265 (0.1)	283 (2.2)	285 (4.3)	283 (1.1)
3-Chlorbenzoesäure	156	-	155 (18)	141 (5.0)	155 (4.1)	113 (0.7)	155 (1.8)	157 (57)	155 (104)
Barbitursäure	128	169 (2.0)	168 (50)	99 (0.6)	167 (13)	112 (6.5)	168 (186)	169 (158)	168 (369)

- keine Ionisierung der Substanz

n.b. nicht bestimmt

Tab. 8/20: Intensitäten der Pseudo-Molmassen / Auswertung der Peakflächen (Flächeneinheiten 1/1000)

Substanz	M	dH ⁰ acid	OH ⁻ (391) ¹⁾		CH ₃ O ⁻ (379)		F ⁻ (371)		CN ⁻ (353)	
			pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
Clonidin	227	396	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylazin	220	395	20	72	13	18	-	54	7.1	7
Tetradecanol	214	373	11	16	13.6	5.7	0.1	1	2.5	-
Trenbolon	270	367/369	-	-	-	13.1	-	1	-	-
Progesteron	314	367/371	31	9	20	0.3	-	26	57	-
17 β -Östradiol	272	350/369	20	10	7.9	-	-	30	95	30
Zeranol	322	350/369	-	9	-	2.7	n. b.	n. b.	7.2	92
Stilböstrol	212	350/350	19	17	n. b.	n. b.	-	27	34	26
Hexöstrol	270	350/350	-	-	-	6.2	-	11	2.2	0.4
Dienöstrol	266	350/350	5.1	4.6	3.6	-	-	15	19	2.4
Diethylstilböstrol	268	350/350	17	18	11.4	19	-	27	220	17.8
Heptadecansäure	270	346	34	15	13.6	-	-	15	41	10.3
Stearinsäure	284	346	23	17	23	1.5	-	16	48	21
3-Chlorbenzoesäure	156	336	3.7	70	5.7	56	-	47	149	90
Barbitursäure	128	335	3.6	81	6.1	9.5	2	73	120	50

¹⁾ dH⁰acid -Werte der Reaktant-Ionen in Klammern

- keine Ionisierung der Substanz

n. b. nicht bestimmt

8.3.6. Bestimmung von DES

Die Bestimmung der Nachweisgrenze für DES bei Verwendung des Reaktantgasgemisches $N_2O/He/H_2$ wurde mit Reinsubstanz-Proben durchgeführt. Die massenspektrometrische Erfassung erfolgte durch Mehrfachmassen-Registrierung (MID).

Es wurde für DES das Molekül-Anion $(M-H)^-$ m/z 267 und das Fragment-Ion m/z 175 detektiert (s. Abb. 27). Zur Berücksichtigung des Rauschpegels wurden in den MID-Descriptor zusätzlich je eine Masse oberhalb und unterhalb der Molmasse aufgenommen. Hierzu wurden die Massen m/z 272 und m/z 260 ausgewählt, die nicht durch Adduktbildung oder Abspaltung aus DES entstehen können.

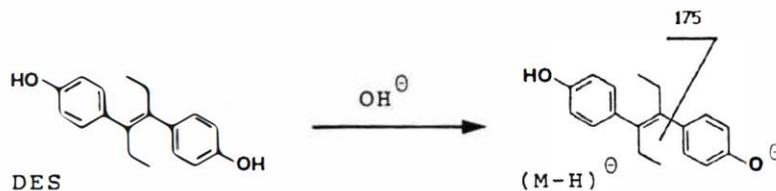


Abb. 27: Ionisierung von DES durch Protonenabstraktion

Bei der Durchführung der Versuche zeigte sich schnell, daß die Qualität der Analytik im unteren Spurenbereich wesentlich von kontaminationsfreiem Gerät und sonstigen Hilfsmitteln abhängig ist. Nach Beendigung der Vorversuche im ng-Bereich war eine komplette Reinigung der 'solid probe'-Schleuse des Massenspektrometers erforderlich, um trotz Abflammen der Schubstange korrekte Leerwerte zu erhalten. Als erhebliche Kontaminationsquelle hat sich auch der Laborstaub herausgestellt. Die verwendeten markierten Glasgeräte wurden sämtlich in Chromschwefel-Säure gereinigt und nach dem Waschen gründlich mit Methanol ausgespült (92). In entsprechender Weise wurde der Arbeitsbereich am Massenspektrometer frei von Verschleppungen gehalten.

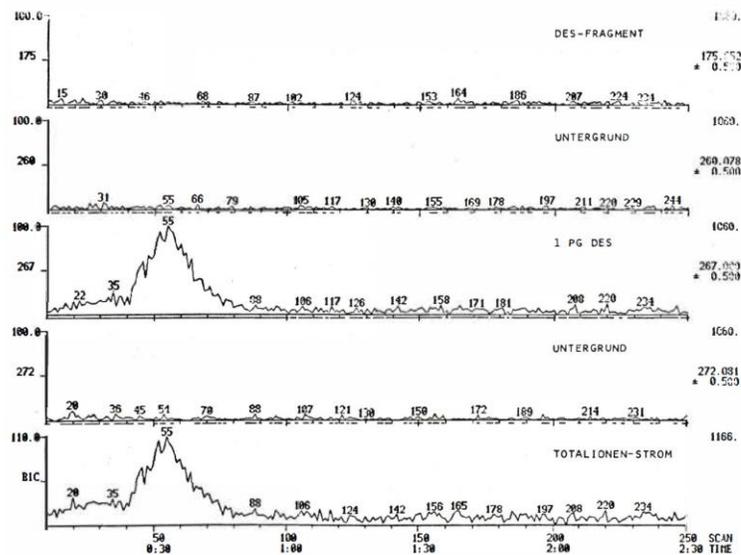


Abb. 28: Bestimmungsgrenze 1 pg DES

Bei Berücksichtigung der in einem Routinelabor mit wechselnden Aufgabenstellungen nicht völlig auszuschließenden Interferenzen, kann ein Substanz-Nachweis sicher nur im Zusammenhang mit einer vorhergehenden (evtl, auch nachfolgenden) Blindprobe bewertet werden.

Zur Identifizierung des DES-Signals wird neben der Molmasse (M-H)⁻ das einzige im OH⁻ Plasma auftretende Fragment detektiert. Es zeigt sich bei wiederholten Versuchen, daß ein Auftreten des Fragmentes bei einem nur schwach abgekühlten 'solid probe'-Stab stärker zu beobachten ist. Insbesondere tritt das Fragment bei Verwendung der Schubstangenheizung auf, sodaß vorwiegend thermische Einflüsse für die Entstehung des Bruchstückes angenommen werden. Ein Ausbleiben der Fragmentierung bei ausreichend abgekühltem Stab stellt deshalb die Identität von DES nicht in Frage.

Eine substanzspezifische, der chromatographischen Retentionszeit entsprechende mittlere Verweilzeit des DES auf der 'extended probe'-Spitze wird als Qualitätskriterium eingesetzt. Das Auftreten der Maximalintensität wird für DES zwischen 30 s und 40 s nach dem Einführen der 'extended probe' in die Ionenquelle erwartet. Deutlich unterschiedliches Zeitverhalten wird z. B. für Stearinsäure (Intensitäts-Max. < 10 s) und Östradiol (Intensitäts-Max. nach 2 min) beobachtet.

Als Bestimmungsgrenze für DES im OH⁻ Ionen generierenden Gemisch aus N₂O/He/H₂ wird ein Wert von 1 pg DES erzielt (s. Abb. 28). Das Fragment m/z 175 wird nicht gebildet. Die Leerwerte vor und nach der DES-Analyse zeigen keine Verschleppung. Auch kann nach mehrmaliger Wiederholung kein steigender Trend beobachtet werden. Die Peakbreite des 1 pg-DES Signals beträgt 25 s. Höhere Intensitäten neigen zu Tailing. Eine quantitative Erfassung wird deshalb durch Integration des Signals auf der Masse m/z 267 bei Einbeziehung eines mittleren Untergrundes durchgeführt. Die erhaltenen Maßzahlen entsprechen Flächeneinheiten. Die Schwankungsbreite der Resultate ist charakteristisch für Bestimmungen nahe der Nachweisgrenze (s. Tab. 8/21).

Tab.8/21: Peakflächen m/z 267 im Bereich der Nachweisgrenze

1 pg DES	10 pg DES
3.1	15.5
1.8	10.9
4.4	
1.1	
5.7	
3.8	

Bei der Durchführung von Analysen mit biologischem Analysenmaterial wird ein intensiver Untergrund mit Maximalintensitäten direkt nach Einführen des Goldstabes in die Ionenquelle detektiert. Dieser Background ist durchschnittlich auf sämtliche Massen im fraglichen Massenbereich gleichverteilt. Der DES-Peak erscheint im Tailing des Untergrundes, sodaß zur Darstellung des bereinigten DES-Intensitätsverlaufes eine Subtraktion des durch die biologische Matrix verursachten Untergrundes erfolgen muß. Hierzu werden die auf den Massen m/z 272 und m/z 260 gemessenen Background-Intensitäten gemittelt und von dem DES-Signal der Masse m/z 267 subtrahiert:

$$(8.20) \quad I(\text{DES}) = I(m/z 267) - I(\text{Background})$$

$$(8.21) \quad \text{mit } I(\text{Background}) = 1/2 (I(m/z 272) + I(m/z 260))$$

Die Berechnung kann für jeden Scan einzeln erfolgen oder nach Integration eines Scanbereiches, wobei auf eine ausreichende Auflösung des Peaks in minimal 10 Intervalle zu achten ist. Die Analyse eines DES-haltigen Fleischextraktes nach HPLC-Aufarbeitung wird in Abbildung 29 dargestellt. Die Fleischprobe entstammt einem kontrollierten Applikationsversuch. Abbildung 30 zeigt die Meßdaten für das DES-Signal m/z 267 und die beiden Background-Spuren. Nach Abzug des Untergrundes erhält man das in Abbildung 31 wiedergegebene bereinigte Diagramm. Es zeigt deutlich den DES-Peak mit dem Maximum nach der erwarteten Verweilzeit auf dem 'extended probe'-Stab. In Verbindung mit einem gleichbearbeiteten Blindwert kann hier zweifelsfrei auf das Vorhandensein von DES geschlossen werden.

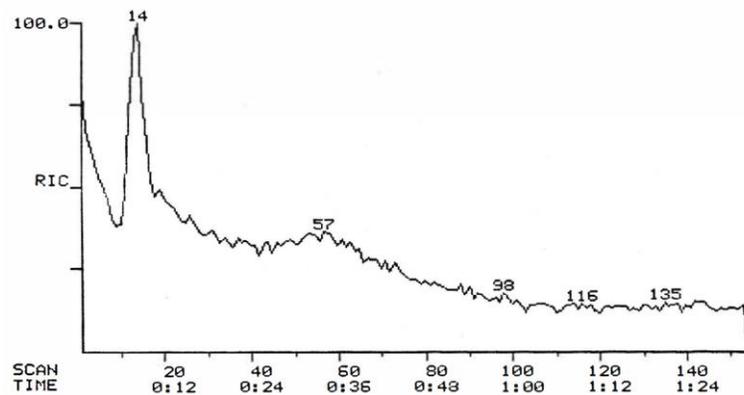


Abb. 29: NCI (OH⁻) Analyse eines Fleischextraktes

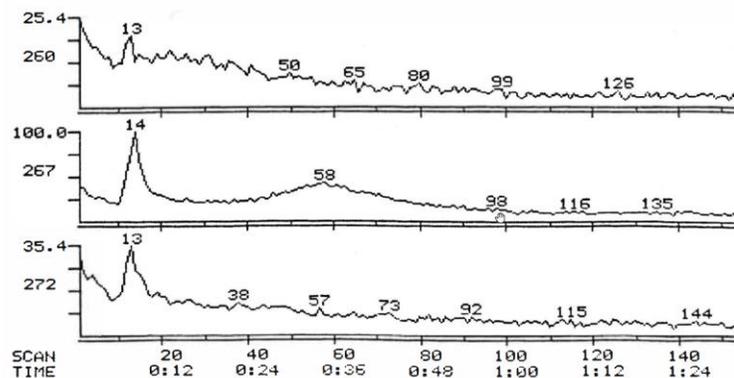


Abb. 30: Meßdaten Fleischextrakt nach HPLC-Trennung DES-Signal / Background

Der Einsatz von Aufarbeitungsextrakten ohne vorherige HPLC-Trennung (s. Analysenschema Abb. 34) erfolgt gleichermaßen. Abbildung 32 zeigt den Intensitätsverlauf der Masse m/z 267 des DES-Anions und die beiden Untergrund-Spuren. Eine sichere qualitative Aussage ist in diesem Stadium nicht möglich.

Die Bereinigung des Signals vom Untergrund in der beschriebenen Weise stellt deutlich das Vorhandensein der Substanz im Extrakt dar (s. Abb. 33). Die Analyse ist ebenfalls im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollprobe zu sehen.

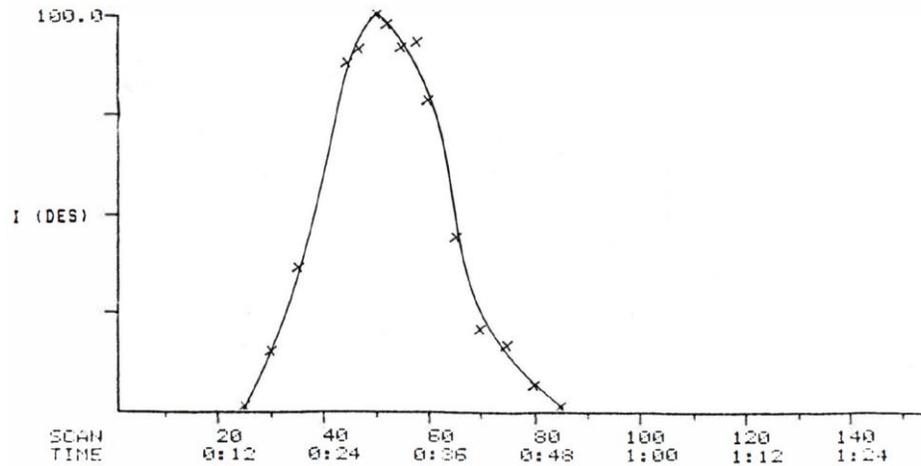


Abb. 31: Untergrund-bereinigtes DES-Signal

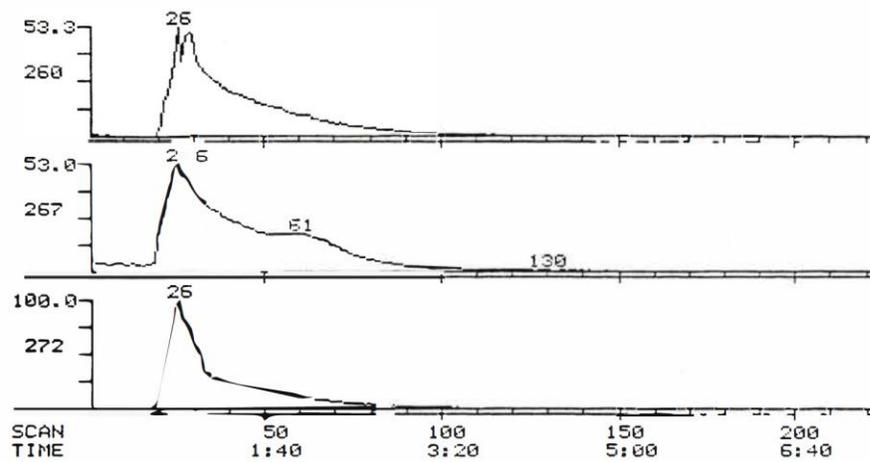


Abb. 32: Analyse eines Fleischextraktes ohne vorgehende HPLC-Trennung

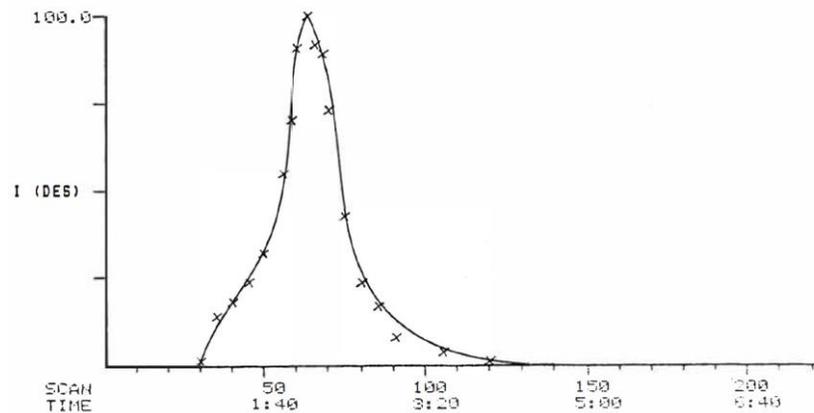


Abb. 33: DES-Signal aus Abb. 32 nach Untergrundbereinigung

Als Ergebnis der Untersuchung von 20 'ragout fin'-Handelsproben, die im Rahmen des DES-Skandals als kontaminiert beanstandet wurden, konnten für 12 Proben die Befunde des RIA auf Basis der vorliegenden NCI-MS Methode bestätigt werden. Als Kriterium wurde hierfür ein der

sicher und zuverlässig nachweisbaren Dotierung eines Fleischextraktes mit 50 pg DES entsprechendes MS-Signal, sowie ein positives Resultat aus RIA bzw. ÖRT gefordert. Zum Auftragen auf den 'extended probe'-Stab wurden 500 µl der HPLC-Fraktion (1 ml) entnommen und auf 50 µl eingeeengt; 2 µl des Konzentrates wurden auf die Stabspitze aufgetragen. Bei Berücksichtigung des Einsatzes eines Äquivalentes von 2 g Fleisch zur HPLC-Trennung (s. Kap. 8.1.3.) errechnet sich als Entscheidungskriterium ein Gehalt von 0,5 ng DES/g Fleisch (= 0,5 ppb).

Nach manueller Reinigung wurde der Quellenblock in einem 'electropolishing'-Bad behandelt (113, 114, 115). Langanhaltende Einwirkungszeiten bei Linsenteilen müssen dabei vermieden werden, um partielle Abtragungen auszuschließen. Der Grad der Neuverschmutzung konnte durch die Behandlung reduziert und somit die Standzeit der Ionenquelle verlängert werden. Die Reinigung verschmutzter Quellenteile wurde deutlich erleichtert.

9. Resumée

Anabolika bewirken in der Tiermast eine erhebliche Steigerung der Fleischausbeute bezogen auf die eingesetzte Futtermenge. Es besteht daher ein starker Anreiz, diese Pharmaka illegal einzusetzen. Der angeführte Östrogen-Skandal hat gezeigt, daß die mit dem Radioimmunassay ermittelten Rückstandskonzentrationen in Muskelfleisch und Fleischprodukten durch ein unabhängiges Verfahren abgesichert werden müssen. Diethylstilböstrol ist in diesem Zusammenhang häufig als hochwirksames Anabolikum eingesetzt worden. Es dient im Rahmen dieser Arbeit als Leitsubstanz zur Bewertung der massenspektrometrischen Bestimmung durch negative Chemische Ionisation.

Die mit dem Radioimmunassay und dem Östrogenrezeptortest durchgeführten Bestimmungen können beim Auftreten positiver Befunde trotz Einhaltung von Absicherungsmaßnahmen, wie dem Mitführen einer Eichreihe und dem Vergleich zu Kontrollproben, nicht in allen Fällen ausreichend zuverlässig interpretiert werden. Es besteht die Gefahr von falsch positiven Aussagen.

Das Problem kann durch das Einfügen zusätzlicher Aufarbeitungsschritte wie der Gelchromatographie oder der HPLC nicht grundlegend bereinigt werden. Dies bestätigen die erstellten Konzentrationsprofile einer HPLC-Trennung mit dem ÖRT und dem RIA. Selbst die Analyse von nachweislich nicht kontaminiertem Kontrollgut kann bei der Analyse auf Dienöstrol nicht ohne Unsicherheiten als rückstandsfrei beurteilt werden. Positive Befunde von Proteinbindungsmethoden im Hinblick auf die vermutliche illegale Anwendung von pharmakologisch wirksamen Stoffen bei der Erzeugung von tierischen Lebensmitteln bedürfen daher der Bestätigung durch eine unabhängige Methode.

Aufgrund vergleichbar hoher Spezifität und Empfindlichkeit wird die Massenspektrometrie zu diesem Zweck als die zur Zeit aussichtsreichste Methode erachtet. Ein Vergleich der beiden Methoden zur Steroid-Bestimmung zeigt eine Variationsbreite der Resultate von 30% bei RIA und lediglich 5% für die Massenfragmentographie (109).

Die Untersuchung hat gezeigt, daß der Einsatz der negativen Chemischen Ionisation in Verbindung mit dem Festproben-Einlaßsystem mit 'extended probe'-Modifikation den empfindlichen Nachweis von DES in stark matrixhaltigen Fleischextrakten ermöglicht. Es sind damit die

Grundlagen geschaffen worden, die eine schnelle massenspektrometrische Bestätigung von Befunden der Proteinbindungsmethoden ermöglichen.

Die Anwendung der negativen Chemischen Ionisation zeigt, daß durch die gezielte Ausnutzung der Protonenabstraktionsreaktion eine Anpassung der vielfältigen Ionisierungsreaktionen innerhalb der NCI an das Analysenproblem erreicht werden kann. Die Selektivität eines Reaktant-Ions mit dem Ziel der Erzeugung hoher Intensitäten auf der Masse des Wirkstoffmolekül-Anions kann für Einzelsubstanzen ausgenutzt werden. Bei vielen der untersuchten Testsubstanzen treten zusätzlich nicht beabsichtigte Nebenreaktionen, wie Fragmentierungen oder Adduktbildungen, ein und verhindern damit die notwendige Konzentrierung der Gesamtintensität auf die Molmasse.

Cyanid weist von den untersuchten Reaktant-Ionen die am weitesten ausgeprägte Selektivität auf, kann jedoch wegen der Neigung zur Adduktbildung nicht eingesetzt werden, Die hohe Giftigkeit des Cyanwasserstoff zwingt zusätzlich zu Sicherheitsmaßnahmen, die eine dauernde Verwendung erheblich einschränken.

Fluorid- und Hydroxyl-Ionen können, trotz geringerer Basizität des Fluorid, als gleichwertig für die Ionisierung der Testsubstanzen betrachtet werden. Die Ionisierung des Fettalkohols Tetradecanol erfolgt mit deutlich geringerer Intensität durch Fluorid. Besonders auffällig ist das nahezu generelle Ausbleiben der Molmassen in PCI, was sich in einer Signalsteigerung in NCI bei Fluorid niederschlägt. Nicht auszuschließen bei der Verwendung von Fluorid ist die Reaktion als Nucleophil, die zu Substitutionsprodukten führt und die Ausbildung von Anlagerungsprodukten mit der Analysensubstanz (72, 82).

Der Einsatz von Methylat bringt für die Analyse der Molekülanionen keinen spezifischen Vorteil. Die Spektren werden häufig von starken Fragmentierungen sowohl in PCI als auch in NCI begleitet. Die praktische Verwendung des Gemisches wird durch ein eng begrenztes Druckintervall optimaler Bedingungen erschwert.

Für den Spuren-Nachweis von DES in Fleischproben wurde das Hydroxyl-Ionen generierende Gemisch aus N₂O, He und H₂ ausgewählt. Die praktische Handhabung des Gemisches ist unkritisch; Helium kann bei gleichem Aufkommens an OH- Ionen durch Wasserstoff ersetzt werden. Eine Steigerung der Gasphasen-Selektivität kann leicht durch Zumischen von Modifiern erreicht werden.

Die durch Hydroxyl-Ionen erzielbare Empfindlichkeit ist mit 1 pg DES gut geeignet zur Kontrolle von radioimmunologischen Resultaten. Von den übrigen als Anabolika eingesetzten und untersuchten Wirkstoffen wird für Stilböstrol eine vergleichbare Nachweisempfindlichkeit erwartet. Trenbolon und Hexöstrol können auf der Molmasse nicht detektiert werden.

Zur Nachweissicherheit wird die Erfassung der Molmasse in NCI als gut geeignet angesehen. Einerseits kann bei konstanten Rahmenbedingungen ein stabiler charakteristischer Zeit/Intensitäts-Verlauf beobachtet werden, andererseits wird bei der Erfassung der Anionen die Anzahl möglicher Interferenzen mit identischer Masse und Desorptionsverhalten erheblich gegenüber den möglichen positiven Fragmenten bei Elektronenstoß-Ionisation eingeschränkt (116). Sowohl die Molmasse, als auch das Zeitverhalten sind substanzspezifische Parameter, die eine positive Identifizierung ermöglichen und damit der indirekten Erfassung der Proteinbindungsmethoden komplementär gegenüberstehen.

Der Einsatz der 'extended probe'-Technik hat sich für die Analyse von minimal aufgereinigten Fleischextrakten bewährt. Ein großer Vorteil liegt gegenüber chromatographischen Methoden im geringen Zeitbedarf, der sich nicht nur in der schnellen Durchführbarkeit der massenspektrometrischen Identifizierung widerspiegelt, sondern auch in der Flexibilität der verwendbaren Probenlösungen. Vergleichbare Resultate und eine Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten auf hochsiedende Komponenten (z.B. TRE, OST) wird durch die Verwendung eines reguliert heizbaren DCI-Filamentes erwartet (110, 111).

Zur Analyse von DES-Rückständen und anderer anabol wirksamer Stoffe in Fleisch und Fleischprodukten wird das in Abbildung 34 dargestellte Analysenschema vorgeschlagen.

Nach Aufarbeitung des Probengutes erfolgt die Lipidabtrennung durch Gelchromatographie. Für Screening-Zwecke auf östrogen wirksame Präparate kann ohne weitere Auftrennung der ÖRT eingesetzt werden. Nach der Substanzauftrennung durch HPLC kann die Einzelbestimmung der Wirkstoffe durch RIA oder ÖRT erfolgen.

Eine Bestätigung positiver Meßergebnisse für DES kann durch NCI-MS nach der Extraktgewinnung aus jeder Stufe des Schemas heraus erfolgen. Speziell zur Bestimmung von DES steht somit ein leistungsfähiger Methodenverbund zur Verfügung.

Zur quantitativen Bestimmung bietet sich das Verfahren an für das Arbeiten mit internem Standard (117), der vor Aufarbeitung der Probe zugesetzt werden kann. Insbesondere werden hierdurch Varianzen bei der Aufbringung der Probenlösung minimiert (118-120).

Eine weitaus höhere Nachweissicherheit kann im Spurenbereich bei Durchführung eines MS/MS-Experimentes erhalten werden. Nach Selektierung der Molmasse des in Frage kommenden Wirkstoffes wird eine ebenfalls positive Identifizierung über das Kollisionsaktivierungs-Spektrum ermöglicht (121).

Durch wiederholten Ausfall des Massenspektrometer-Systems konnten die Analysen nicht bis zum Ende des Forschungsprojektes durchgeführt werden. Aus diesem Grunde sind die hier vorgelegten Ergebnisse wie folgt zu bewerten:

1. Die phenolischen Anabolika, insbesondere DES sind mit der hier untersuchten Methode der NCI mit selektiven Reaktantgas-Gemischen empfindlich nachzuweisen, wie dies mit Reinsubstanzen belegt wurde.
2. Die beschriebene Methode ist anwendbar für den Nachweis der Anabolika in Fleisch, wobei eine Aufreinigung über Gelchromatographie und HPLC nicht unbedingt erforderlich ist, sondern neben dem Reinigungseffekt über die Retentionszeit einen wichtigen analytischen Parameter liefert.
3. Nach dem entwickelten Aufarbeitungsschema (s. Abb. 34) eignet sich die NCI-MS optimal für die Absicherung von ÖRT- und RIA-Befunden, weil sie ohne weitere Aufarbeitung sofort aus den für die Proteinbindungsmethoden eingesetzten 'clean-up' Stufen heraus eingesetzt werden kann.

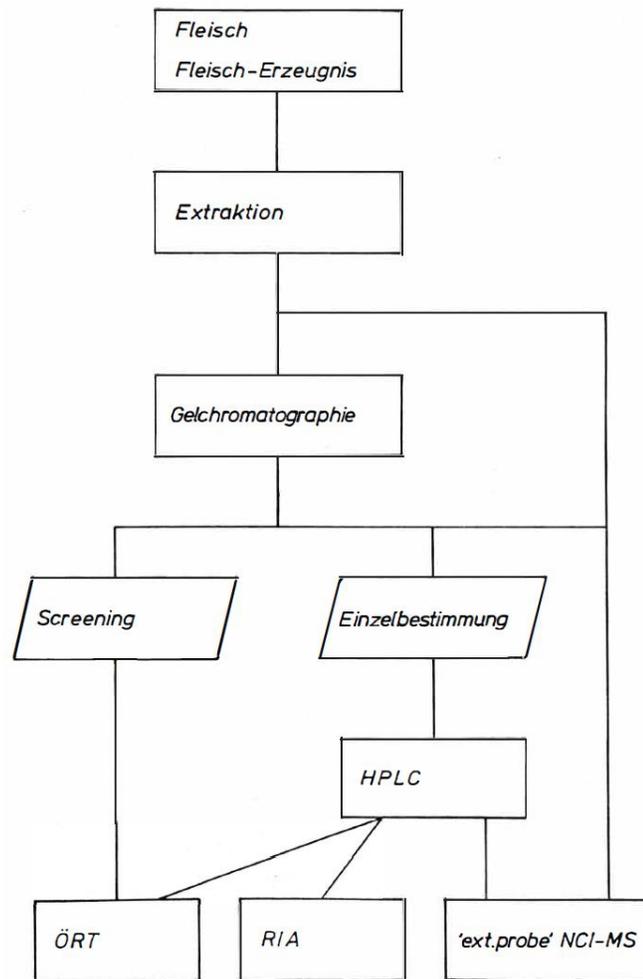
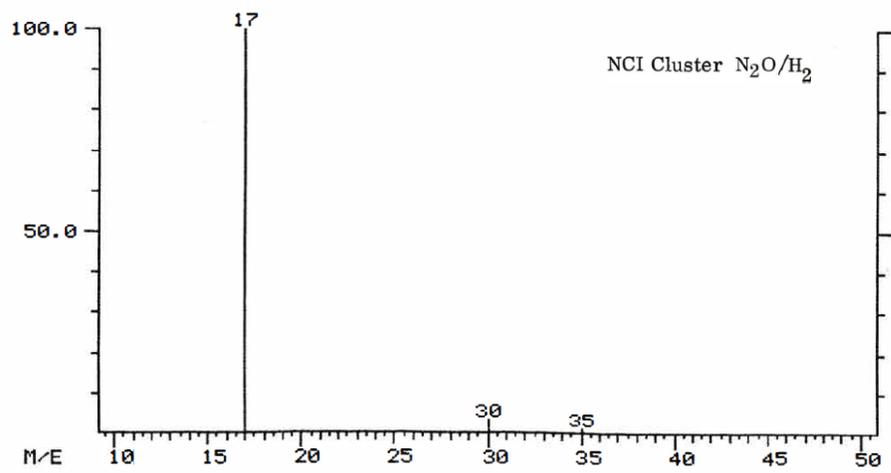
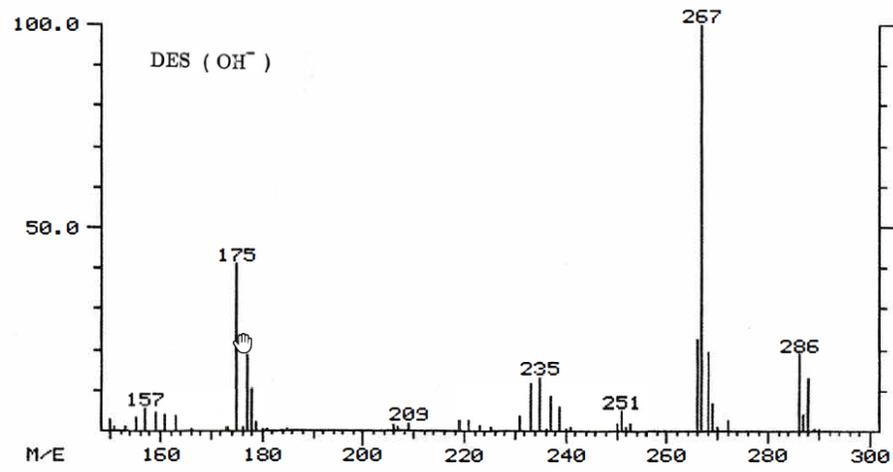


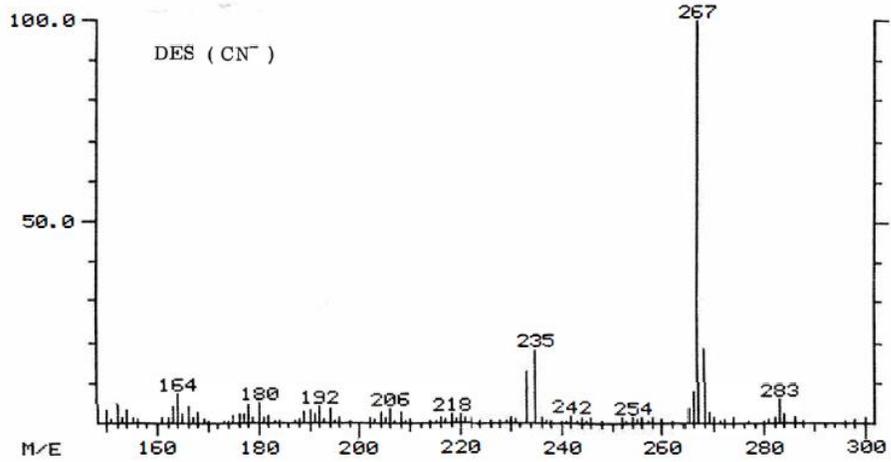
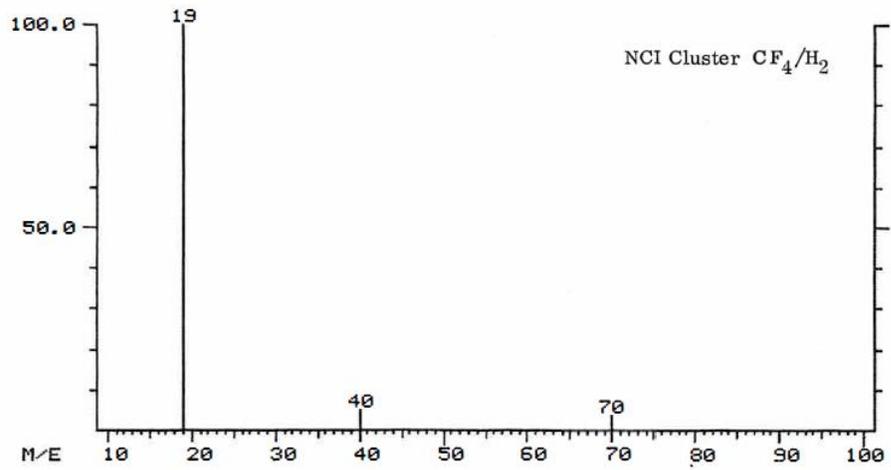
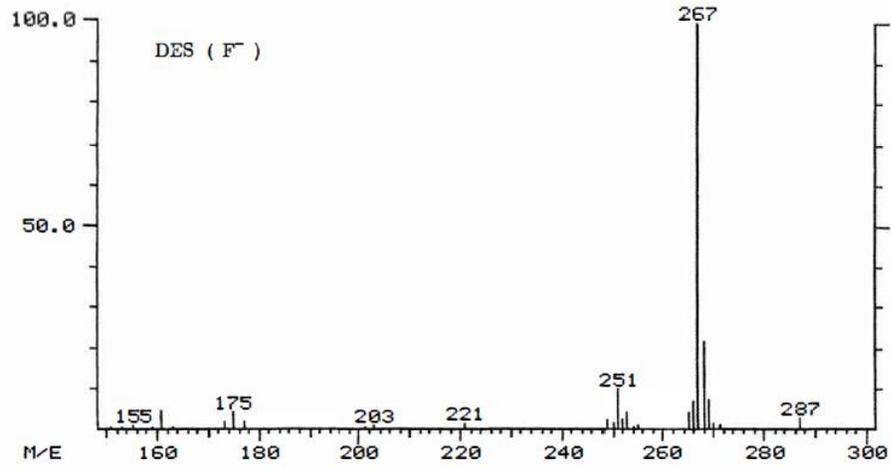
Abb. 34: Analysenschema zur Bestimmung von Anabolika

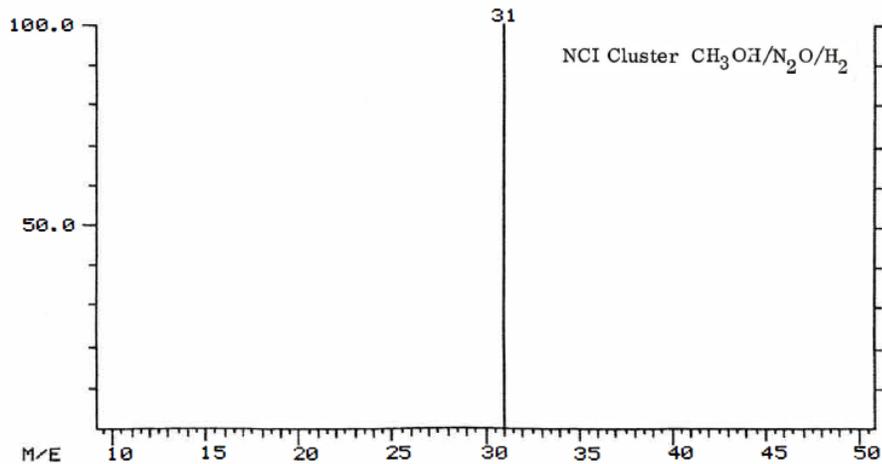
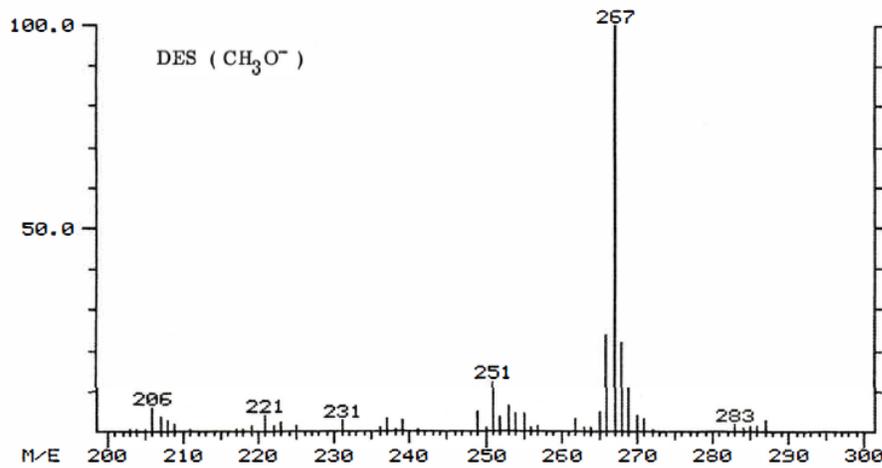
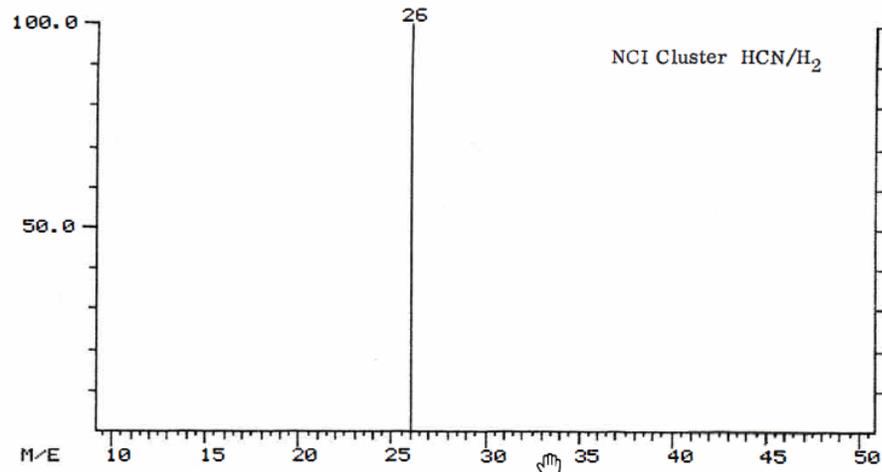
Die Arbeit hat sich auf DES als umstrittenstes der in der Tiermast eingesetzten Anabolika und den eindeutigen Nachweis der Substanz bei niedrigsten Konzentrationen in biologischer Matrix konzentriert. Eine Quantifizierung ist zur Zeit nicht erforderlich, da der positive Nachweis von DES ausreichend ist, um ein Lebensmittel als nicht verkehrsfähig zu beurteilen. Die vorgestellte Methode verhindert, daß falsch positive Ergebnisse der zu Screeningzwecken eingesetzten Proteinbindungsmethoden zu Beanstandungen führen.

10. Anhang

10.1. Spektren







10.2. Schaltungsbeschreibung GPC-Steuerung

Die hier vorgestellte Steuereinheit wurde für eine GPC-Anlage entwickelt und schneidet entsprechend einer vorhergehenden Eichung durch Schaltung eines 3-Wege-Ventils die Probenfraktion. Nach Abschluß der Analyse wird die Pumpe abgestellt. Darüberhinaus sind

vielfältige Laboranwendungen vorgesehen, wie zum Beispiel die Überwachung einer Destillationsanlage.

Netzteil:

Im separaten Netzteil werden die Versorgungsspannungen für den Analogteil ($U_b = +12\text{ V}$) und Digitalteil ($U_{VCC} = +5\text{ V}$) erzeugt. Abhängig von der Dimensionierung des Netztransformators steht eine unregelte Gleichspannung ($U_0 = \text{max.}40\text{ VDC}$) zur Versorgung von Magnetventilen durch die Steuereinheit zur Verfügung.

Steuereinheit:

Die Steuereinheit ist zweikanalig ausgelegt. Für beide Kanäle wird der jeweilige Schaltzustand über die Leuchtdioden D4 bis D7 angezeigt. Die eingehenden Sensorsignale werden gleich verarbeitet (IC3, IC4).

Im ersten Kanal wird das Signal direkt zur Schaltung eines Relais ausgenutzt, das wahlweise einen akustischen Signalgeber einschaltet und ein durch die Verdrahtung in J1/J2 selektierbares Signal an externe Geräte sendet. Hierdurch kann eine LC-Pumpe gesteuert werden.

Im zweiten Kanal wird das Sensorsignal durch eine Digitalschaltung abgefangen (IC6) und der Schaltzustand bis zu einer manuellen Rückstellung beibehalten. Der Kanal ist zur Steuerung eines elektromagnetischen Dreiwegventils vorgesehen. Durch IC8 wird eine Erregerspannung aus U_0 von 24 V zur Verfügung gestellt, die nach ca. 3 s auf eine Haltespannung von 12 V abgesenkt wird (IC7, T9). Hierdurch wird eine Erhitzung des Ventils und damit die Verdampfung leicht flüchtiger Elutionsmittel verhindert.

Sensoren:

An die Steuereinheit können je zwei unterschiedliche Sensoren über einen 5-poligen DIN-Stecker bei unterschiedlicher Pin-Belegung angeschlossen werden. Die Überwachung von Füllhöhen geschieht mit einem NTC-Widerstand, der bei Eintauchen durch Abkühlung den Widerstandswert ändert. Die Detektion von Luftblasen kann in einer Gabellichtschranke erfolgen, wobei hier die Brechungsänderung ausgenutzt wird. Bei einem geeigneten Bypass kann die Lichtschranke ebenfalls zur Füllhöhenkontrolle eingesetzt werden.

Stückliste Netzteil:

Kondensatoren ¹⁾ :	C1 = 1000 μ /40 V C2, C4 = 22 μ /35 V Tantal C3, C5 = 0,1 μ /35 V Tantal
Halbleiter:	B1 = B40C 1500/1000 IC1 = 78S12/2 A IC2 = 7805/1 A
außerdem:	S1 = Netzschalter 2 pol, EIN/AUS F1 = Sicherung 0,2 A F2 = Sicherung 2,5 A Tr1 = Trafo prim. 220 V, sec, 14-35 V/1 A

Stückliste Steuergerät:

Widerstände ²⁾ :	R1, R2 = 800 R3, R4, R15, R16 = 3k9 R5, R6 = 180 R7, R8, R9, R10 = 20k R11, R12 = 220/1 W R13, R14 = 12 R17, R18, R25, R26, R34 = 10k R19, R20 = 100k R21, R22, R30, R31 = 1k2 R23, R24 = 300k R27 = 100 R28 = 270 R29 = 39k R32, R33 = 560 P1, P2, P3 = 10k Trimpoti P3 = 22k
Kondensatoren ¹⁾ :	C6 1 C7 = 0,1 u/35 V Tantal C8, C9 = max. 4.7 u/35 V Tantal C10, C11 = 0.33 u C12, C13 = 1 u/35 V Tantal C14 = 1000 u/16 V
Halbleiter:	D1 = LD20 LED gelb D2, D3, D8, D9, D10, D11 = 1 N 4148 D4, D7 = SE7011 LED grün D5, D6 = SE7021 LED rot Z1, Z2, Z5, Z6 = ZY 3,9/500 mW Z3, Z4 = ZD 9,1/1 W T1, T2 = BC 237 T3, T4, T5, T6 = BCY 59C T7, T8 = BD 645 T9 = BC 378 IC3, IC4 = TAA 861A IC5 = 7404 IC6 = 7474 IC7 = 74121 ICB = L200
Außerdem:	Re1, Re2 = Kleinrelais 12 V/190 Ohm, 2x Wechsel, Schaltspannung 250 V/2000 VA S2 = Kippschalter 2 pol. EIN/AUS

S3 = Kippschalter 1 pol. EIN/AUS
 S4 = Miniatur-Drucktaster
 L = Summer/Piezo-Signalgeber 5-25 mA/1,5-24 V

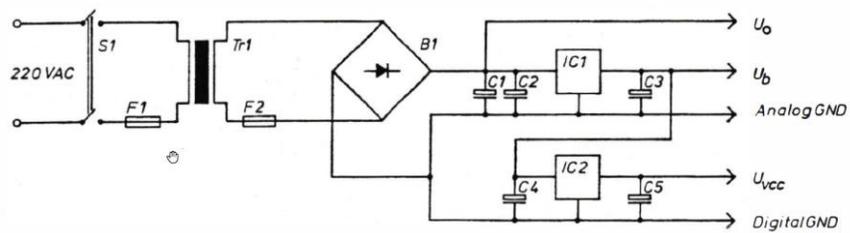
Stückliste Sensoren:

Widerstände²⁾: R35, R36 = 4k
 R37, R38 = 4k7
 R39, R40 = 2k5 NTC in Glaskörper,
 Siemens Typ K 17/10% (Q63017-K252-K)
 R41, R42 = 10k

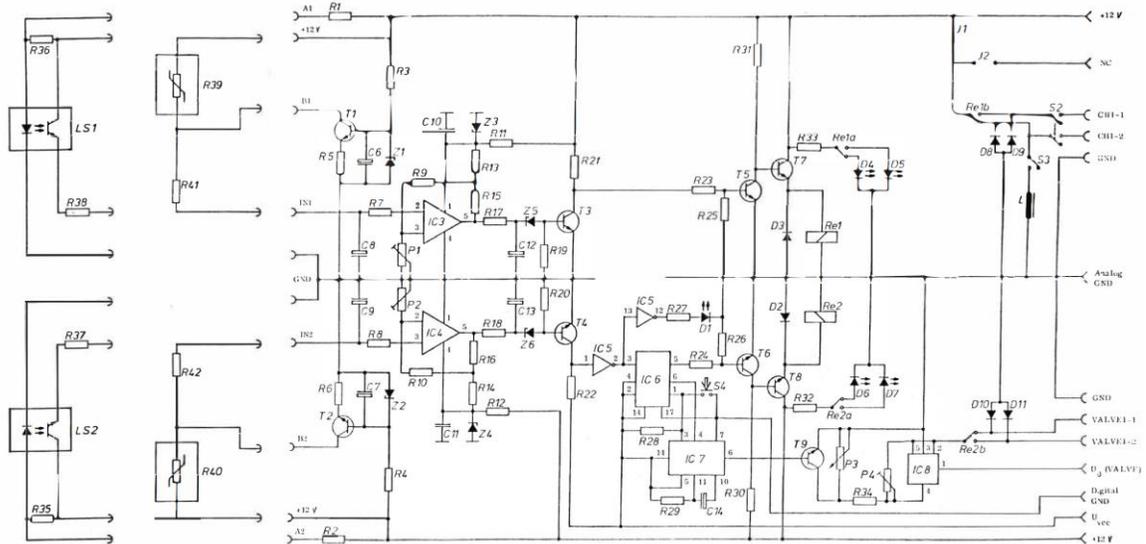
Halbleiter: LS1, LS2 = CNY 37 Gabellichtschranke

¹⁾ Alle Angaben in F.

²⁾ Alle Angaben in Ohm; Belastbarkeiten 0,25 W falls nicht anders angegeben.



Netzteil



Sensoren

Stuereinheit

10.3. Literaturverzeichnis

- (1) K. Schulze, AID-Verbraucherdienst 4 (1982) 158.
- (2) B. Bergner-Lang, M. Kächle, Dtsch. Lebensm. Rdsch., 9 (1981) 305.
- (3) Deutsche Forschungsgemeinschaft: Rückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft, Verlag Chemie, Weinheim 1983.
- (4) G. Röhle, H. Breuer, Fresenius Z. Anal. Chem., 290 (1978) 191.
- (5) G. R. Conley, G. R. Sanat, A. Ucci, H. D. Mitcheson, JAMA 13 (1983) 914.
- (6) Food and Drug Administration: Diethylstilbestrol in edible tissues of cattle and sheep; revocations, Federal Register 44 (06 July 1979) 39387.
- (7) Food and Drug Administration: Diethylstilbestrol; withdrawal of approval of new drug applications. Federal Register 44 (21 Sep 1979) 54852.
- (8) Food and Drug Administration: Diethylstilbestrol; food use of cattle illegally implanted with DES, Federal Register 45 (22 Apr 1980) 27014.
- (9) H. Schlatterer, Vortragscyclus am Institut für Lebensmittelchemie, TU Berlin 1983.
- (10) E. C. Dodds, L. Goldberg, W. Lawson, R. Robinson, Nature 142 (1938) 34.
- 111) E.C. Dodds, L. Goldberg, W. Lawson, R. Robinson, Nature 142 (1938) 212.
- (12) E. C. Dodds, L. Goldberg, E. I. Grünfeld et al., Proc. Roy. Soc. 1329 (1944) 83.
- (13) R. A. W. Johnstone, B. J. Millard, Z. Naturforsch. 21a (1966) 604. nach (112).
- (14) Bundesgesundheitsamt, DES-Gutachten. Berlin 8.10.1980.
- (15) R. J. Heitzman, D. J. Harwood, I. P. Reynolds, ARC Research Review 5 (1979) 63.
- (16) R. J. Heitzman, Curr. Top. Vet. Med. 2 (1978) 353.
- (17) R. J. Heitzman, I. A. Donaldson, I. C. Hart, Br. Vet. J. 136 (1980) 168.
- (18) W. L. Duax, C. M. Weeks, "Molecular Basis of Estrogenicity: X-Ray Crystallographic Studies". In: McLachlan (Ed.): Estrogens in the Environment. Elsevier, Amsterdam-London-New York 1980.
- (19) M. Metzler, J. A. McLachlan, Biochem. Biophys. Res. Comm. 85 (1978) 874.
- (20) M. Metzler, CRC Crit. Rev. Biochem. 10 (1981) 171.
- (21) G. Ingerowski, Dissertation, Technische Universität, Berlin 1974.
- (22) E. J. Umberger, G. H. Gass, J. M. Curtis, Endocrinology 63 (1958) 806; zit. n. (21).
- (23) H. Karg, Z. Anal. Chem. 243 (1968) 630.
- (24) H. Karg, H. Schaarschmidt, M. Waldschmidt, Arch. Lebensm. Hyg. 1(1970) 1.

- (25) G. Beck, T. Mantel, B. Schaudinn, Fortschr. Tierphys. 6 (1976) 76.
- (26) H. Brunn, Arch. Lebensmittelhyg. 32 (1981) 141.
- (27) H. J. Kyrein, Dtsch. Apoth. Ztg. 11 (1976) 359.
- (28) E. D. Ryan, W. H. C. Walker, J. Immunoassay 1 (1980) 1.
- (29) G. Ingerowski, H.-J. Stan, Dtsch. Lebensm. Rdsch. 74 (1978) 1.
- (30) H. J. Kyrein, B. Hoffmann, Fortschr. Tierphys. 6 (1976) 91.
- (31) B. Hoffmann, Fresenius Z. Anal. Chem. 311 (1982) 332.
- (32) D. M. Weir: Handbook of Experimental Immunology, 2nd Ed., Scientific Blackwell Publications, Oxford 1973.
- (33) E. Nieschlag, H. K. Kley, K.-H. Usadel: "Production of Steroid Antisera in Rabbits", In: E. H. Cameron, S. G. Hillier, K. Griffiths (Eds.): Steroid Immunoassay. Alpha Omega Publishing Ltd., Cardiff 1975.
- (34) R. J. Scaramuzzi, C. S. Corker, G. Young, D. T. Baird: "Production of Antisera to Steroid Hormones in Sheep". In: E. H. Cameron, S. G. Hillier, K. Graffiths (Eds.): Steroid Immunoassay. Alpha Omega Publishing Ltd, Cardiff 1975.
- (35) K. Lübke, B. Nieuweboer: Immunologische Teste für niedermolekulare Wirkstoffe, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1978.
- (36) S. Sell: Immunologie, Immunpathologie und Immunität. Verlag Chemie, Weinheim-New York 1977.
- (37) A. Maelicke, Nachr. Chem. Tech. Lab. 32 (1984) 967.
- (38) G. Köhler, C. Milstein, Nature 256 (1975) 495, zit. n. (37).
- (39) D. Kupfer, W. H. Bulger: "Estrogenic Properties of DDT and its Analogs". In: J. A. McLachlan (Ed.): Estrogens in the Environment. Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York-Amsterdam-Oxford 1979.
- (40) R. S. Yalow, S. A. Berson: "General Aspects of Radioimmunoassay Procedures". In: International Atomic Energy Agency in Co-Operation with the World Health Organization (Eds.): In Vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine. International Atomic Energy Agency, Vienna 1970.
- (41) G. Röhle, H. Breuer, Fresenius Z. Anal. Chem. 290 (1978) 191.
- (42) R. S. Yalow, S. A. Berson, Nature 184 (1959) 1648.
- (43) H. Grohmann, Dissertation, Technische Universität, Berlin 1983.
- (44) B. Hoffmann, W. Laschütza, Arch. Lebensm. Hyg. 31 (1980) 105.
- (45) H.-J. Stan, B. Abraham, J. Chromatogr. 195 (1980) 231.
- (46) H. -J. Stan, Fresenius Z. Anal. Chem. 311 (1982) 333.
- (47) P. H. Binnemann, U. Sandmeyer, K. Krypke, M. Eichner, R. Malisch, Fresenius Z. Anal. Chem. 311 (1982) 333.
- (48) D. Courtot, Proc. Int. Symp. Equine Med. Control, 3rd 1979 (Pub. 1980) 253.
- 149) R. Verbeke, J. Chromatogr. 177 (1979) 69.

- (50) B. Abraham, Dissertation, Technische Universität, Berlin 1980.
- (51) H.-J. Stan, B. Abraham, Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie 34 (1980) 73.
- 152) CAMAG, CAMAG Applikationen - Instrumentelle DC, Firmenschrift A 03.2.- April/81.
- (53) B. Wortberg, R. Woller, J. Chromatogr. 156 (1978) 205.
- (54) V. Smets, M. Vandewalle, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 175 (1982) 29.
- (55) W. G. de Ruig, T. D. B. van der Stuijs, H. Hooyerink, Fresenius Z. Anal. Chem. 311 (1982) 405.
- 156) C. G. B. Frischkorn, M. R. Smyth, H. E. Frischkorn, J. Golimanowski, Fresenius Z. Anal. Chem. 300 (1980) 407.
- (57) M. R. Smyth, C. G. B. Frischkorn, Fresenius Z. Anal. Chem. 301 (1980) 200.
- (58) W. D. Lehmann, H. R. Schulten, Chem. Unserer Zeit 5 (1976) 147.
- (59) H.-J. Stan: "Contribution of Mass Spectrometry to Food Safety". In: A. Frigerio, H. Milon (Eds.): Chromatography and Mass Spectrometry in Nutrition Science and Food Safety, Elsevier, Amsterdam 1984.
- (60) H. Budzikiewicz, Angew. Chem. 93 (1981) 635.
- (61) I. Howe, D. Williams, R. Bowen: Mass Spectrometry, 2nd Ed., McGraw Hill, New York 1981.
- (62) A. Frigerio: Essential Aspects of Mass Spectrometry. Halsted Press, New York-Toronto-London-Sydney 1974.
- (63) E. Illenberger, LABO 6 (1982) 649.
- (64) M. S. B. Munson, F. H. Field, J. Am. Chem. Soc. 88 (1966) 4337.
- (65) D. I. Carroll, J. G. Nowlin, R. N. Stillwell, E. C. Horning, Anal. Chem. 53 (1981) 2007.
- (66) J. Henion, G. A. Maylin, Biomed. Mass Spectrom. 7 (1980) 115.
- (67) K. H. Schäfer, K. Levsen, J. Chromatogr. 206 (1981) 245.
- (68) R. C. Dougherty: "Detection and Identification of Toxic Substances in the Environment". In: C. Merritt, C. McEwen (Eds.): Mass Spectrometry Part B. Marcel Dekker, New York-Basel 1980, 306.
- (69) D. F. Hunt, W. C. Brumely, G. C. Stafford, F. K. Botz: "Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Pulsed Positive Negative Ion Chemical Ionisation Mass Spectrometry with Oxygen as Reagent Gas". In: C. Merritt, C. McEwen (Eds.): Mass Spectrometry Part B. Marcel Dekker, New York-Basel 1980, 327.
- (70) P. Burke, K. R. Jennings, R. P. Morgan, C. A. Gilchrist, Anal. Chem. 52 (1982) 1304.
- (71) F. W. Crow, A. Bjorseth, K. T. Knapp, R. Bennett, Anal. Chem. 53 (1981) 619.
- (72) A. G. Harrison: Chemical Ionization Mass Spectrometry. CRC Press, Boca Raton 1983.
- (73) S. J. Stout, W. A. Steller, Biomed. Mass Spectrom. 11 (1984) 207.
- (74) D. F. Hunt, G. F. Stafford, F.W. Crow, J. W. Russell, Anal. Chem. 48 (1976) 2098.
- (75) H.-J. Stan, G. Kellner: "Analysis of Organophosphoric Pestizide Residues in Food by GC/MS Using Positive and Negative Chemical Ionization". In: W. Baltes, P. B. Czodik-Eysenberg, W. Pfannhauser (Eds.): Recent Developments in Food Analysis. Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach-Basel 1981.

- (76) D. F. Hunt, P. J. Gale, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1111.
- (77) M. T. Bowers (Ed.): *Gas Phase Ion Chemistry Vol. 2*, Academic Press New York 1979.
- (78) J. Bartmess, R. Mciver jr. : "The Gas Phase Acidity Scale". In: (77).
- (79) C. Kajdas, R. Tümmeler, *Org. Mass Spectrom.* 2 (1969) 1049.
- (80) M. v. Ardenne, K. Steinfeldler, R. Tümmeler, *Z. Phys. Chem. (Leipzig)* 220 (1962) 105.
- (81) K. R. Jennings in: C. Merritt, C. McEwen (Eds.), *Mass Spectrometry Part B*, Marcel Dekker, New York-Basel 1980.
- (82) T. O. Tiernan, C. Chang, C. C. Cheng, *Environ. Health Persp.* 36 (1980) 47.
- (83) I. K. Gregor, M. Guilhaus, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 56 (1984) 167.
- (84) M. v. Ardenne, K. Steinfeldler, R. Tümmeler: "Elektronenanlagerungsmassenspektrometrie organischer Substanzen". Springer Verlag, Berlin 1971.
- (85) K. Levsen, *Adv. Mass Spectrom.* 8A (1980) 897.
- (86) R. C. Dougherty, *Anal. Chem.* 53 (1981) 625A.
- (87) E. C. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell: "Negative Ion Atmospheric Pressure Ionisation Mass Spectrometry and the Electron Capture Detector". In: A. Zlatkis, C. F. Poole: *Electron Capture, J. Chromatogr. Library Vol. 20*. Elsevier, Amsterdam 1981.
- (88) D. F. Hunt, F. W. Crow, *Anal. Chem.* 50 (1978) 1781.
- (89) W. E. Wentworth, E. C. M. Chen, "Theory of Electron Capture". In: A. Zlatkis, C. F. Poole: *Electron Capture, J. Chromatogr. Library Vol. 20*. Elsevier, Amsterdam 1981.
- (90) M. D. Friesen, J. R. Hass, D. J. Harvan, C.E. Parker: "Determination of Chlorinated Dibenzo-p-Dioxins". In: C. Merritt, C. McEwen (Eds.): *Mass Spectrometry Part B*, Marcel Dekker, New York-Basel 1980, 324.
- (91) J. R. Hass, M. D. Friesen, M. K. Hoffman: "Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins (PCDD)". In: C. Merritt, C. McEwen (Eds.): *Mass Spectrometry Part B*, Marcel Dekker, New York Basel 1980, 316.
- (92) B. J. Millard: "Sources of error and criteria for the selection of internal standards for quantitative mass spectrometry". In: A. P. de Leenheer, R. R. Roncucci, C. van Peteghem (Eds.): *Quantitative Mass Spectrometry in life Sciences II*, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York 1978.
- (93) D. I. Carroll, I. Dzidic, M. G. Horning, et. al., *Anal. Chem.* 51 (1979) 1858.
- (94) G. Hansen, B. Munson, *Anal. Chem.* 50 (1978) 1130.
- (95) W. Specht, M. Tillkes, *Z. Anal. Chem.* 301 (1980) 300.
- (96) W. Specht, M. Tillkes, *Z. Anal. Chem.* 307 (1981) 257.
- (97) Agthe, Hebel, Hoffmann, Vogt: "Methoden zum Nachweis von Diäthylstilböstrol in Kot und Gewebeproben von Mastkälbern mit Hilfe des Radioimmotestes", Bundesgesundheitsamt, Berlin 7.11.80.
- (98) W. Blum, W. J. Richter, *J. Chrom.* 132 (1977) 249.
- (99) S. V. Olesik, J. W. Taylor, *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc.* 57 (1984) 299.

- (100) S. V. Olesik, J. W. Taylor, *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc.* 57 (1984) 315.
- (101) A. I. C. Smith, F. H. Field, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 6471.
- (102) T. A. Roy, F. H. Field, Y. Y. Lin, I. I. Smith, *Anal. Chem.* 51 (1979) 272.
- (103) C. H. DePuy, J. J. Grabowski, V. M. Bierbaum, *Science* 218 (1982) 955.
- (104) G. B. Anderson, R. G. Gillis, R. B. Johns, et al., *Org. Mass Spectrom.* 19 (1984) 199.
- (105) C. H. DePuy, V. M. Bierbaum, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 5129.
- (106) J. G. Dillard, J. L. Franklin, *J. Chem. Phys.* 48 (1968) 2353.
- (107) V. Bierbaum, C. H. DePuy, R. H. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 5800.
- (108) W. C. M. M. Luijten, W. Onkenhout, J. van Thuijl, *Org. Mass Spectrom.* 15 (1980) 329.
- (109) M. Edery, J. Goussard, L. Dehennin, R. Schöller, J. Reiffsteck, M. A. Drosdowsky, *Europ. J. Cancer* 17 (1980) 115.
- (110) C. Beaugrand, G. Devant, *Adv. Mass Spectrom.* 88 (1980) 1806.
- (111) V. N. Reinhold, S. A. Carr, *Anal. Chem.* 54 (1982) 499.
- (112) W. Benz: *Massenspektrometrie organischer Verbindungen*, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1969.
- (113) G. L. Peele, D. A. Brent, *Anal. Chem.* 49 (1977) 674.
- (114) F. Rosebury: *Handbook of Electron Tube and Vacuum Techniques*, Addison-Wesley Publishing, Reading, Mass., 1965.
- (115) B. Siegel: Charakteristische Merkmale elektropolierter Metalloberflächen im Vergleich zu mechanisch bearbeiteten Oberflächen. In: *Jahrbuch Oberflächentechnik 1976*, Metall Verlag 1976, 96.
- (116) J. A. Sphon, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61 (1978) 1247.
- (117) J. J. DeRidder: "Accuracy and Precision in GC-MS Quantitation". In: *Blood, Drugs and Other Analytical Challenges. Methodological Surveys in Biochemistry Vol. 7*, Chichester 1978, 153.
- (118) F. Heresch, E. R. Schmid, A. Weiszbart, *Biomed. Mass Spectrom.* 6 (1979) 566.
- (119) F. Heresch, E. R. Schmid, I. Fogy, J. F. K. Huber, *Adv. Mass Spectrom.* 8B (1980) 1880.
- (120) F. Heresch, E. R. Schmid, J. F. K. Huber: "Sample-Independent Internal Standards for Mass Spectrometric Quantitation Using the Direct Probe Inlet". In: A. Frigerio, M. McCamish (Eds.): *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine Vol. 6*, Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam 1980, 101.
- (121) H.-J. Stan, unveröffentlichte Ergebnisse.
- (122) W. D. Reents, Jr., R. C. Burnier, R. B. Cody, B. S. Freiser, *Anal. Chem.* 54 (1982) 1245.
- (123) G. B. Blackburn, M. H. Thompson, H. W. S. King, *Biochem. J.* 158 (1976) 643.

10.4. Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Einfluß anaboler Wirkstoffe auf die Gewichtszunahme von Bullenkälbern. Der Effekt wird besonders bei den vergleichenden Daten mit verminderten Proteinanteilen im Futter deutlich (RP=Rohprotein) (9); Applikation in 11.Lebenswoche	11
Abb. 2: Gasphasenaziditäts-Skala nach J. Bartmess u. R. McIver (78)	23
Abb. 3: Signalverlauf in Bezug auf die Anzahl der Aufarbeitungsschritte (die unterbrochene Linie spiegelt die für die Analysenmethode erforderliche Leistungsfähigkeit wieder).	30
Abb. 4: Prinzipschaltbild der Gelchromatographie (Schaltung der Steuereinheit s. Anhang)	34
Abb. 5: Säulenschaltung zur HPLC-Trennung.....	35
Abb. 6: Eichung der HPLC über UV-Detektion und Tritium-markierte Analoge	36
Abb. 7: Pipettierschema ÖRT	37
Abb. 8: Pipettierschema RIA	42
Abb. 9: Reaktantgas-Mischsystem.....	43
Abb. 10: Flüssigkeitsgefäß des Reaktantgas-Mischsystems ('liquid vessel').....	44
Abb. 11: Schema der Ionenquelle mit 'solid probe'.....	45
Abb. 12: Schema der Ionenquelle mit 'extended probe' modifizierter Schubstange.....	46
Abb. 13: Einstellung der Länge des Golddrahtes	46
Abb. 14: Schubstange für die 'extended probe' Technik	47
Abb. 15: Druckablesung einer Pyrani-Meßröhre in Abhängigkeit von der Gasart (Herstellerangabe).....	49
Abb. 16: Trennung von Lipiden und ³ H-DES auf der GPC-Säule.....	51
Abb. 17: Konzentrationsprofil für ³ H-DES (500 µl Laufmittel + 3900 cpm ³ H-DES).....	52
Abb. 18: Konzentrationsprofil für ³ H-DES als Dotierung zu einer Fleischprobe (500 µl Extrakt + 3900 cpm ³ H-DES).....	52
Abb. 19: Fleischprobe nach Gelpermeation UV-Detektion und Aktivitätsprofil von ³ H-DES.....	53
Abb. 20: Auswertung von HPLC-RIA Analysen von DIEN-haltigen Fleischproben und Kontrollprobe/polyvalentes Antiserum	55
Abb. 21: Auswertung von HPLC-ÖRT Analysen von DIEN-haltigen Fleischproben mit Kontrollprobe.....	56
Abb. 22: Einordnung der Reaktantgase und Testsubstanzen in die Gasphasenaziditäts-Skala	58
Abb. 23: Reaktionswege Tetrafluormethan/H ₂	61
Abb. 24: Einfluß des N ₂ O-Anteils auf die Intensität von Hydroxyl-Ionen (Methan:Helium 1:1, 100% = TIC)	67
Abb. 25: Intensität von Rheniumoxid-Ionen als Funktion des N ₂ O-Gehaltes (Methan:Helium 1:1)	68
Abb. 26: Methan-Untergrund im mittleren Massenbereich.....	72
Abb. 27: Ionisierung von DES durch Protonenabstraktion	89
Abb. 28: Bestimmungsgrenze 1 pg DES	89
Abb. 29: NCI (OH ⁻) Analyse eines Fleischextraktes	91
Abb. 30: Meßdaten Fleischextrakt nach HPLC-Trennung DES-Signal / Background.....	91
Abb. 31: Untergrund-bereinigtes DES-Signal.....	92
Abb. 32: Analyse eines Fleischextraktes ohne vorgehende HPLC-Trennung.....	92
Abb. 33: DES-Signal aus Abb. 32 nach Untergrundbereinigung.....	92
Abb. 34: Analysenschema zur Bestimmung von Anabolika	96