

Endbericht

Forschungsprojekt Nr. 1162

**Entwicklung einer Strategie zur Analytik von Steroidhormonen und
nichtsteroidalen Hormonen (Stilbenen) in Futtermitteln sowie
unterschiedlichen biologischen Matrices**

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	5
1.1 Summary	6
2. Projektziele	7
3. Matrices.....	7
3.1 Wässrige Matrices.....	8
3.2 Hühner und Putenfleischprodukte	8
3.3 Käse, reine Fettprodukte (Butter und Margarine) und Milch.....	8
4. Extraktion:.....	9
5. Mahlen der Probe:	9
6. Extraktion mit Acetonitril.....	10
6.1 Ausschütteln mit Hexan oder Pentolbenzin (Entfettung).....	10
6.2 Dichlormethan (Chloroform) -Wasser - Verteilung	10
6.3 Extraktion mit Dichlormethan (Chloroform)	10
7. Festphasenextraktion.....	11
8. Fraktionierung mittels HPLC.....	11
9. Standards	12
10. Systematik der Bestimmung und der Quantifizierung	13
10.1 Analyt in der Probe nicht anzutreffen, im dotierten Probenanteil klar wiedergefunden:.....	13
10.2 Analyt in der Probe nicht anzutreffen, im dotierten Probenanteil sehr deutlich (Signal/Rauschverhältnis besser 20) wiedergefunden:.....	13
10.3 Analyt in der Probe angetroffen, Peak und Massenspur entsprechen jenen im dotierten Probenanteil:.....	13
10.4 Analyt in der Probe angetroffen, Peak und Massenspur entsprechen jenen im dotierten Probenanteil, ungefährender Gehalt kann durch ein Standardzumischungs-verfahren abgeschätzt werden:	13
10.5 Nachweis gestört, Analyt im dotierten Probenanteil nicht klar nachweisbar:	14
10.6 Die Bestimmungsgrenze ($[bg]$) wird entsprechend dem Gehalt im dotierten Probenanteil angegeben.....	14
11. Vermessung der Substanzen Equilenin, Equilin, Estrone, Estradiol, Estriol, Ethinylestradiol, Dienestrol, Diethylstilbestrol, Hexestrol, Zeranol	15
11.1 Ionen	15
12. Vermessung der Standardsubstanzen im On-line Modus, Optimierung der Chromatographie sowie Austestung des geeigneten Trennsystems...16	16
13. Laufmittelzusammensetzung und Volumen:	16
14. Strukturen.....	17
15. Spektren und Chromatogramme	21

16. Vermessung der Substanzen Cyproteron Acetat, Megestrol Acetat, Medroxyprogesteron Acetat, Chlormadinon Acetat, Ethisteron, Norethindron Acetat, Melengestrol Acetat und Ethynodiol Diacetat.	30
17. Chromatographie.....	30
18. Optimierung der Parameter	31
19. Strukturen.....	32
20. Ionen.....	35
21. Spektren und Chromatogramme	36
22. Methodvalidierung.....	53
22.1 Zusammenfassung	53
22.2 Einleitung.....	53
22.2.1 Art der Untersuchung: Validierung der Methoden “Analytik von Steroidhormonen und nichtsteroidalen Hormonen (Stilbenen) in Futtermitteln	53
22.2.2 Sponsor: Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft Umwelt und Wasserwirtschaft 1012 Wien, Stubenring 1	53
22.2.3 Analytisches Labor: Dr. Walter Welz Goreon, Bioanalytisches Laboratorium Durisolstraße 7, 4600 Wels Tel.: Int. + 7242/65810-510 Fax: Extension -512	53
22.2.4 Test-System: Futtermittelmischungen.....	54
22.2.5 Analyten Equilenin, Equilin, Estrone, Estradiol, Estriol, Ethinylestradiol, Dienestrol, Diethylstilbestrol, Hexestrol, Zeranol (neg-ESI) sowie Cyproteron Acetat, Megestrol Acetat, Medroxyprogesteron Acetat, Chlormadinon Acetat, Ethisteron, Norethindron Acetat, Melengestrol Acetat und Ethynodiol Diacetat (pos-ESI).	54
22.2.6 Verantwortlicher Analytiker: Dr. W. Welz	54
22.2.7 Bericht: Dr. W. Welz.....	54
22.3 Guidelines und Empfehlungen	54
23. Methoden	54
23.1 Chromatographisches System.....	54
24. Extraktion	55
24.1 Extraktion mit Acetonitril.....	55
24.2 Ausschütteln mit Hexan oder Petrolbenzin (Entfettung).....	55
24.3 Dichlormethan (Chloroform) -Wasser - Verteilung	55
24.4 Extraktion mit Dichlormethan (Chloroform)	56
25. Festphasenextraktion.....	56
26. Fraktionierung mittels HPLC.....	56
27. Methodvalidierung.....	57
27.1 Eichgeraden	57
27.2 QC Proben.....	57
27.3 Quantifizierungslimit (LOQ).....	57

27.4	Detektionslimit (LOD).....	57
27.5	Stabilität der Analyten	57
27.6	Spezifität	58
27.7	Extraktionsausbeute	58
28.	Kalkulation	58
28.1	Mittelwert.....	58
28.2	Standard Abweichung.....	58
28.3	Präzision.....	58
28.4	Lineare Regressions Analyse.....	59
29.	Ergebnisse und Diskussion.....	59
29.1	Allgemeine Aspekte.....	59
29.2	Eichgeraden	60
29.3	Quantifizierungslimit (LOQ)	60
29.4	Detektionslimit (LOD).....	60
29.5	Stabilität der Analyten	60
29.6	Spezifität	61
29.7	Extraktionsausbeute	61
30.	Tabellen, Graphiken, Diagramme.....	62
31.	Literatur.....	116

1. Zusammenfassung

Steroidale und nichtsteroidale (Stilbene, Resorcylsäurelactone) Hormone sind in Österreich verbotene Masthilfsmittel. Während für Stilbene in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin infolge nachgewiesener Cancerogenität ein generelles Anwendungsverbot besteht, ist Zeranol in den USA als Masthilfsmittel (Implantat) offiziell zugelassen. Estrogene werden illegal den Tieren meist subkutan oder intramuskulär appliziert, können aber, weil die Einstichstellen bei der Kontrolle am Schlachthof auffallen können, auch im Mastfutter vorkommen. Als wirksame Dosis ist kleiner 1 mg/kg Körpergewicht anzunehmen. Im fertig abgemischtem Futtermittel wird dann um 1 mg/kg oder weniger zu erwarten sein.

Es wurden Extraktionsmethoden aus Futtermittel und Analysenmethoden auf Basis HPLC/MS und HPLC/MSⁿ für folgende Substanzen erarbeitet: Equilenin, Equilin, Estrone, Estradiol, Estriol, Ethinylestradiol, Dienestrol, Diethylstilbestrol, Hexestrol, Zeranol sowie Cyproteron Acetat, Megestrol Acetat, Medroxyprogesteron Acetat, Chlormadinon Acetat, Ethisteron, Norethindron Acetat, Melengestrol Acetat und Ethynodiol Diacetat.

Die Methoden wurden nach internationalen Richtlinien validiert.

Die Problematik der Extraktion von fettlöslichen Substanzen aus einer fettreichen Matrix konnte mit Hilfe einer mehrstufigen Extraktionsmethode zufriedenstellend gelöst werden. Die Ausbeuten lagen bei 67% bis 91% der eingesetzten Menge. Der chromatographische Prozess mit anschließender Detektion im MS/MS Full-Scan Modus weist eine hohe Empfindlichkeit (10ppb) sowie eindeutige Spezifität auf. Die gewonnenen Erkenntnisse belegen, dass diese Methode nicht nur zur Anwendung auf Realproben erfolgreich ist, sondern dass auch bei einer weiteren Identifikationsstufe (MSⁿ) die notwendigen Empfindlichkeiten zur eindeutigen Strukturbelegung erreicht werden.

Equilenin, Equilin, Estrone, Estradiol, Estriol, Ethinylestradiol, Dienestrol, Diethylstilbestrol, Hexestrol, Zeranol wurden mittels negativer Elektrosprayionisation, Cyproteron Acetat, Megestrol Acetat, Medroxyprogesteron Acetat, Chlormadinon Acetat, Ethisteron, Norethindron Acetat, Melengestrol Acetat und Ethynodiol Diacetat positiv vermessen.

Die von der Kommission der Europäischen Union (SANCO/1805/2000) empfohlene Identifikationsstufe (MS³) mit der höchsten Punktezahl konnte

aufgrund der Zerfallseigenschaften der einzelnen Substanzen nur in wenigen Fällen erreicht werden.

Die in allen Fällen charakteristischen MS² Spektren sind jedoch so signifikant und in Verbindung mit den chromatographischen Eigenschaften daher als eindeutige Identifikation zu betrachten. Hinsichtlich der Anwendbarkeit der Methode auf unterschiedliche Matrices ist ausschließlich deren Fettgehalt von Bedeutung. Bei einem Fettgehalt von über 40% kann diese Methode nicht mehr zuverlässig angewendet werden.

1.1 Summary

Steroidal and non-steroidal hormones are not allowed for breeding animals in Austria. Due to carcinogenic activity, stibenes are generally not allowed, neither in human medicine nor in veterinary medicine. Zeranol, for example, in USA is allowed as an implantant for breeding animals. Estrogenes are illegal used, mostly given as hypodermic or intramuscular injection. Because of attracting attention for punctures at the slaughter house, hormones are given orally, if they are active in this case. The active doses are less than 1mg/kg body weight. So it is estimated, that in feed stuff the concentrations are less than 1mg/kg.

For this, extraction methods for feed stuff and analysis methods for HPLC/MS and HPLC/MS/MS detection were developed for following substances:

Equilenin, Equilin, Estrone, Estradiol, Estriol, Ethinylestradiol, Dienestrol, Diethylstilbestrol, Hexestrol, Zeranol as well as for Cyproteron Acetate, Megestrol Acetate, Medroxyprogesteron Acetate, Chlormadinon Acetate, Ethisteron, Norethindron Acetate, Melengestrol Acetate und Ethynodiol Diacetate.

The methods were validated according to international guidelines.

The difficulty of the extraction of lipid soluble substances in a lipid matrix could be solved by a multi step extraction method. The recovery was between 67 and 91 %. HPLC/MS and MS/MS was very sensitive down to a level of 10ppb and highly selective due to MS/MS and MS/MS/MS measurements.

The methods show that they are not only suitable for the measurement of real samples, they are also a proper tool to confidently confirm the structure of searched compounds with high sensitivity.

Equilenin, Equilin, Estrone, Estradiol, Estriol, Ethinylestradiol, Dienestrol, Diethylstilbestrol, Hexestrol, Zeranol were measured in the negESI mode, Cyproteron Acetate, Megestrol Acetate, Medroxyprogesteron Acetate, Chlormadinon Acetate, Ethisteron, Norethindron Acetate, Melengestrol Acetate und Ethynodiol Diacetate were measured as positive ions.

The demand of the European Community, to confirm the structure of forbidden substances with MS³ as a highest security standard, could not be reached in all cases, because several substances could not be activated for this purpose. But we think, that at least MS² is specific enough for secure confirmation.

To apply this method to different matrices depends exclusively on their content of fat. A content of fat more than 40% leads to a fault of the extraction.

2. Projektziele

Die Ziele des Projektes waren einerseits eine Methode zur analytischen Erfassung von Östrogenen und Gestagenen aus Futtermittel mittels HPLC/MSⁿ nach den Identifikationsrichtlinien der EU zu erarbeiten, andererseits diese Methoden zu validieren und auf die Anwendbarkeit hinsichtlich anderer Matrices zu prüfen.

3. Matrices

Da der Einsatz von Hormonen als Leistungsförderer in der Tiermast im wesentlichen nur bei einer gewissen Längerlebigkeit der Tiere Sinn macht, wurden die Untersuchungen auf Futtermittel für Rinder und Schweine beschränkt. Die Zusammensetzung wurde hinsichtlich des Fettgehaltes zwischen 10% und 30% ermittelt. Dieser Fettgehalt ist in nahezu allen Anwendungsbereichen als Standard anzusehen. Die Extraktionsmethoden als auch die Analytik inklusive der Validierung wurden daher auf diesen Fettgehalt ausgerichtet.

Da Östrogene und Gestagene unterschiedliche Affinität zu lipophilen Inhaltsstoffen aufweisen, wurden anschließend unterschiedliche Matrices mit unterschiedlichen Fettgehalten ausgetestet.

Folgende Matrices (außer Futtermittel) kamen zum Einsatz:

- Wässrige Träger wie Fruchtsäfte, Fruchtsaftkonzentrate und Fertiggetränke (Coca Cola, Energy Drinks und Zuckersirup)
- Hühner und Putenfleischprodukte
- Käse und reine Fettprodukte (Butter und Margarinen) und Milch

3.1 Wässrige Matrices

Die Extraktion aus wässrigen Matrices gestaltet sich sowohl für Östrogene als auch für Gestagene recht einfach. Die Substanzen werden mit Ethylacetat extrahiert, der Extrakt zur Trockene eingengt und in Laufmittel für die HPLC aufgenommen. Eine Entfettung der Extrakte ist nicht notwendig. Die Extraktionsausbeute liegt bei beiden Substanzgruppen zwischen 90% und 100%.

3.2 Hühner und Putenfleischprodukte

Bei einem Fettgehalt von bis zu 35% erfolgt die Extraktion analog zu den Futtermittelproben. Die Ausbeuten liegen auch hier analog zu den Futtermitteln.

3.3 Käse, reine Fettprodukte (Butter und Margarinen) und Milch

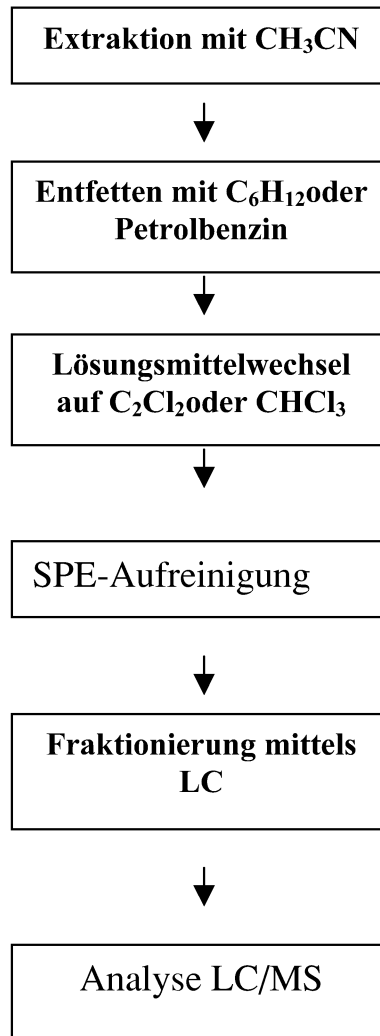
Bei diesen Produkten und bei Produkten mit einem Fettgehalt über 40% versagt die Extraktion. Während Gestagene bis zu einem Fettgehalt von ca. 60% teilweise, aber ohne Reproduzierbarkeit, extrahierbar sind, kann für Östrogene keine Wiederfindung angegeben werden.

Es muss daher festgestellt werden, dass die von uns etablierte Methode nur für Produkte bis zu einem Fettanteil von 35%-40% verwendbar ist.

Dies trifft für nahezu alle Futtermittelmischungen, wofür diese Methode grundsätzlich erarbeitet wurde, zu.

4. Extraktion:

Im Wesentlichen wurden folgende Schritte angewendet:



5. Mahlen der Probe:

Die Probe muss so fein wie möglich gemahlen sein. Oft ist der angestrebte feine Mahlgrad aber nicht erreichbar, weil die Probe schmiert und klumpt. In diesen Fällen muss mit gröber gemahlene Proben gearbeitet werden

6. Extraktion mit Acetonitril

- Einwaage 2 x 5 g Probe in 100 ml Becherglas
- Dotierung mit Standard, durchmischen
- Extraktion mit 3 x 40 ml Acetonitril: 1 min Ultra Turax mit geringster Geschwindigkeit (gelber Bereich) und geradem 2cm Kopf.
- Filtration über Blaubandfilter, mit 3 x 5 ml Acetonitril nachwaschen
- Zwischendurch immer etwas absetzen lassen

6.1 Ausschütteln mit Hexan oder Petrolbenzin (Entfettung)

- Den Acetonitrilextrakt mit 2 x 60 ml n-Hexan oder Petrolbenzin in 250 ml Scheidetrichter ausschütteln

Acetonitril-Phase (unten) in 250 ml Spitzkolben ablassen, Hexanphase (Petrolbenzinphase)verwerfen

6.2 Dichlormethan (Chloroform) -Wasser - Verteilung Lösungsmittelwechsel

- Einengen des Acetonitril am Rotationsverdampfer, Wasserbad ca. 60° C
- 5 ml Wasser zugeben
- Acetonitril vollständig abrotieren, Wasser bleibt zurück
- Letzte Reste von Acetonitril mit Stickstoff abblasen

6.3 Extraktion mit Dichlormethan (Chloroform)

- Wasserphase mit 3 x 30 ml Dichlormethan (Chloroform) in 100 ml Scheidetrichter ausschütteln
- untere Phase (Dichlormethan, Chloroform) in 100 ml Erlenmeyer mit Schliff sammeln, Wasserphase verwerfen
- einen Laborlöffel wasserfreies Na_2SO_4 zugeben, schütteln, über Schwarzbandfilter in 100 ml Spitzkolben filtrieren, mit 2 x 5 ml Dichlormethan nachwaschen
- Dichlormethan-Phase auf ca. 1 ml abrotieren

7. Festphasenextraktion

- Säulchen: NH₂-Phase, Vorkonditionierung mit 5ml n-Hexan und 5 ml Dichlormethan
- Den Dichlormethanextrakt auf die SPE Säulchen überführen, Kolben mit 2 ml Dichlormethan nachwaschen, mit Elution beginnen. Nicht trockenlaufen lassen
- mit 10 ml Dichlormethan: iso-Propanol (2+1) weiter eluieren
- Eluat in 25 ml Spitzkolben sammeln
- Dichlormethan vollständig abrotieren, im Stickstoffstrom trocknen
- Rückstand in 1 ml Acetonitril lösen (Vortex-Schüttler und 1min im Ultraschallbad)
- in 2 ml Vial abfüllen, verschließen und beschriften
- im Kühlschrank lagern (max. 14 Tage)

8. Fraktionierung mittels HPLC

- Säule: Ultrasphere ODS 10µ, 250 x 10 mm mit Vorsäule: C18 ODS, 4 x 3 mm
- UV-Detektion bei 220 nm
- Flussrate: 3 ml/min; 50% auf 60% Acetonitril in 15 min, dann 15 min auf 100%; in 5 min auf 100 %TBME, in 5 min auf 100 % Acetonitril, 5 Min Postrun
- Injektion des Standards zur Prüfung der HPLC-Bedingungen und zum Festlegen des Fensters, in dem fraktioniert wird. Das Chromatogramm wird ausgedruckt und mit Notizen zu Säule, Laufmittel, Analyt und allfälligen Besonderheiten versehen, abgelegt
- Injektion: 2 x 231 µl Probe über manuelles Einlassventil. (das größte Injection Loop hat ein Volumen von 231 µl)
- Fraktionierung 8 bis 16 Minuten in 50 ml Spitzkolben
- Acetonitril/H₂O Phase abrotieren und Extrakt entsprechend der weiteren Vorgangsweise lösen

Da Futtermittelproben sehr unterschiedlich zusammengesetzt sein können, muß das Extraktionsverfahren immer sinnvoll angewendet werden. Bei Mineralstoffmischungen, die keine Lipide enthalten, entfällt der Entfettungsschritt und die Festphasenextraktion sowie die Wasser-Dichlormethan – Verteilung.

Entfettungsschritt und Festphasenextraktion können auch bei fetthaltigen Proben ganz entfallen. Entfettung und Festphase garantieren jedoch reine Proben, welche die Säule schonen. Eine von uns angewandte Alternative war die Verwendung von Vorsäulen. In weiterer Folge wurde daher auch bei fettreichen Proben auf die aufwendige Festphase verzichtet und als einziger Entfettungsschritt die Hexan- bzw. Petrolbenzinentfettung durchgeführt.

9. Standards

Eingewogen werden nur jene Substanzen, auf die zu prüfen ist.

Die Einwaagen werden alle in einen 100 ml Messkolben überführt, in 100 ml reinem Acetonitril gelöst, und auf Volumen gebracht.

Der Standard ist immer neu zu erstellen.

Verbindung	Einwaage	entspricht einem Gehalt im Futtermittel
17 α -Ethinylestradiol	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Zeranol	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
E, E-Dienestrol	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
meso-Hexestrol	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
E-Diethylstilbestrol*)	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
17 α -Estradiol	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
17 β -Estradiol	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Equilenin	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Equilin	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Estron	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Estriol	1 mg/100 ml	100 μ g/kg

Verbindung	Einwaage	entspricht einem Gehalt im Futtermittel
Cyproteron Acetat	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Megestrol Acetat	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Medroxyprogesteron Acetat	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Chlormadinon Acetat	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Ethisteron	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Norethindron Acetat	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Melengestrol Acetat	1 mg/100 ml	100 μ g/kg
Ethinodiol Diacetat	1 mg/100 ml	100 μ g/kg

10. Systematik der Bestimmung und der Quantifizierung

10.1 Analyt in der Probe nicht anzutreffen, im dotierten Probenanteil klar wiedergefunden:

- „Im Totalionenstromchromatogramm tritt der Peak für [Angabe des gesuchten Analyten] zur korrekten Retentionszeit mit den Massenspuren [Angabe der ausgewerteten Massenspuren], wie er in den entsprechenden Chromatogrammen der dotierten Probenanteile auftritt, bei der Probe nicht auf“
- „[Analyt].....**nicht nachweisbar** (< [bg] µg/kg)“

10.2 Analyt in der Probe nicht anzutreffen, im dotierten Probenanteil sehr deutlich (Signal/Rauschverhältnis besser 20) wiedergefunden:

- „Im Totalionenstromchromatogramm tritt der Peak für [Angabe des gesuchten Analyten] zur korrekten Retentionszeit mit den Massenspuren [Angabe der ausgewerteten Massenspuren], wie er in den entsprechenden Chromatogrammen der dotierten Probenanteile auftritt, bei der Probe nicht auf“
- „[Analyt].....**nicht nachweisbar** (<< [bg] µg/kg)“

10.3 Analyt in der Probe angetroffen, Peak und Massenspur entsprechen jenen im dotierten Probenanteil:

- „Im Totalionenstromchromatogramm ist bei der Probe ein Peak für [Angabe des gefundenen Analyten] zur korrekten Retentionszeit [Angabe der Retentionszeit] mit den korrekten Massenspuren [Angabe der ausgewerteten Massenspuren] sichtbar, wie er auch in den entsprechenden Chromatogrammen der dotierten Probenanteile auftritt.“
- „[Analyt].....**nachweisbar (signifikante Mengen)**“

10.4 Analyt in der Probe angetroffen, Peak und Massenspur entsprechen jenen im dotierten Probenanteil, ungefähre Gehalt kann durch ein Standardzumischungsverfahren abgeschätzt werden:

- „Im Totalionenstromchromatogramm ist bei der Probe ein Peak für [Angabe des gefundenen Analyten] zur korrekten Retentionszeit [Angabe der Retentionszeit] mit den korrekten Massenspuren [Angabe der ausgewerteten Massenspuren] sichtbar, wie er auch in den entsprechenden Chromatogrammen der dotierten Probenanteile auftritt.“
- „Die Menge des Analyten konnte durch Standardzumischung und Messung mittels HPLC/UV [Angabe der Wellenlänge] bzw. GC/MS [Angabe der Ionenspuren] grob abgeschätzt werden.“
- „[Analyt]..... **nachweisbar (ungefähr mg/kg)**“

10.5 Nachweis gestört, Analyt im dotierten Probenanteil nicht klar nachweisbar:

- „[Analyt]..... .. Nachweis gestört“

10.6 Die Bestimmungsgrenze ($[bg]$) wird entsprechend dem Gehalt im dotierten Probenanteil angegeben.

11. Vermessung der Substanzen Equilenin, Equilin, Estrone, Estradiol, Estriol, Ethinylestradiol, Dienestrol, Diethylstilbestrol, Hexestrol, Zeranol

Das Generieren von negativen Ionen im ESI-Modus setzt im Falle der bis jetzt untersuchten Analyten eine hohe Basizität des Eluenten voraus. Da die chromatographischen Parameter der im Moment verwendeten Methode keine Deprotonierung der phenolischen Hydroxygruppen zuläßt, muß nach der chromatographischen Säule diese Basizität erreicht werden. Zu diesem Zweck stehen aufgrund der ESI-Technologie nur sehr wenige, von den Geräteherstellern empfohlene Lösungsmittel zur Verfügung. Im Wesentlichen waren Triethylamin und Ammoniak im Einsatz. Das in vielen Publikationen als vorzüglich geeignete Triethylamin kam bei den ersten Experimenten zum Einsatz. Dabei stellte sich heraus, dass der Prozess des Zudosierens nach der Chromatographie ein sehr kritischer Parameter ist. Sowohl die Konzentration als auch die gleichbleibende Flußrate sind kritische Parameter, welche die Empfindlichkeit und somit die Stabilität des Systems wesentlich beeinflussen. Des weiteren mußte ein Kompromiss zwischen verträglichen Untergrundsignalen und der Deprotonierungsausbeute gefunden werden. Da Substanzen mit einer phenolischen Hydroxylgruppe gegenüber Substanzen mit 2 solchen Gruppierungen nahezu nur halb so gute Ausbeuten ergaben, waren sehr drastische Bedingungen hinsichtlich der Basizität erforderlich. Im Sinne der optimalen Empfindlichkeit für jede Substanz wurden daher individuelle Tune-Parameter erhoben- sowohl im MS als auch im MS/MS und MS/MS/MS-Modus. Die Möglichkeit des Einsatzes individueller Tunefiles innerhalb eines Analysenlaufes durch Setzen von Segmenten macht diese Technik möglich, die erforderliche Trennleistung des chromatographischen Systems vorausgesetzt. Im ersten Ansatz konnten die Substanzen wie folgt vermessen werden:

11.1 Ionen

Substanz	Mutterion (M-H)	Tochterionen
Equilenin	265.1	250, 237, 222, 211, 193, 171
Equilin	267.1	265, 251, 237, 223, 211, 193
Estrone	269.2	253, 225, 183, 159, 145, 123
Estradiol	271.2	253, 239, 225, 213, 197, 183, 171, 159, 145
Estriol	281.2	269, 257, 225, 211, 187, 171, 159, 145
Ethinylestradiol	295.2	277, 267, 247, 225, 185, 171, 159, 145, 133
Dienestrol	265.1	249, 235, 221, 209, 193, 171, 157, 147, 131, 117, 93

Diethylstilbestrol	267.1	251, 237, 222, 209, 195
Hexestrol	269.2	253, 211, 149, 133, 135, 119
Zeranol	321.3	303, 277, 259

Als Alternative zur Vermessung der Substanzen mit je einem eigenen optimierten Tunefile, die die Segmentierung des Analysenlaufes und somit die klare chromatographische Trennung voraussetzt, wurde ein auf alle Substanzen passender Tunefile ausgewählt. Es hat sich als zweckmäßig herausgestellt, auf die Substanz mit dem geringsten Response im neg.ESI - Modus zu tunen. Diese auf den ersten Blick durchaus logische Annahme konnte bei vielen anderen Substanzgruppen nicht immer bestätigt werden (z.B. bei Opiaten und Alkaloiden), so dass diese Möglichkeit im Experiment bewiesen werden musste. Im Falle der bisher vermessenen Hormone wurde daher auf Diethylstilbestrol optimiert. Mit den so erhobenen Parametern konnte für alle Substanzen bei einem Materialeinsatz von 10 g eine Konzentration von 10 ppb nachgewiesen werden.

12. Vermessung der Standardsubstanzen im On-line Modus, Optimierung der Chromatographie sowie Austestung des geeigneten Trennsystems

Wie aus der Literatur zu entnehmen ist, sind die optimalen HPLC-Trennungen der Hormone beim Einsatz von RP-Phasen zu erzielen. Da die Hersteller von Säulenmaterialien zwar das Endcapping der freien Silanolgruppen ausloben, das Verfahren dazu aber in der Regel als „Technologiegeheimnis“ nicht preisgeben, konnten auch keine Schlüsse daraus auf das Retentionsverhalten der Substanzen geschlossen werden. Freie oder verhüllte Silanolgruppen beeinflussen jedoch das Trennverhalten einer Säule ganz erheblich. Es war daher notwendig, innerhalb der Trennmaterialien mit denselben Kettenlängen (C18) zu entscheiden. Das Zumischen von Ammoniak nach der Säule (wegen der pH-Instabilität der Materialien im hohen Bereich unvermeidbar) stellte sich als besonders kritischer Parameter heraus. Der Wechsel von RP 18 auf RP 8 bzw. auf RP 30 führte zu keiner Verbesserung der Trennung.

13. Laufmittelzusammensetzung und Volumen:

Um ein möglichst sauberes Untergrundverhalten des chromatographischen Prozesses im ESI-Modus zu erreichen, wurde als organisches Lösungsmittel Acetonitril gewählt. Im Gegensatz zu Methanol, das auch in den reinsten Qualitäten immer wieder Störionen zwischen m/z 150 und m/z 220 liefert, konnte dabei das Rauschen nahezu völlig ausgeschaltet werden. Das Volumen wurde auf 0.3ml/min festgelegt. Bei dieser Flussrate war ein Splitten vor der Ionenquelle nicht notwendig. Bei einer Säulendimension von 2.1mm ist dabei eine ausgezeichnete Peakperformance zu erzielen. Bei isokratischen

Bedingungen mit Pumpenmischung wurden zwar gute Trennergebnisse erzielt, die langen Retentionszeiten und die daraus resultierenden Peakverbreiterungen machten jedoch dieses Verfahren nicht praktikabel. Die Entscheidung viel daher auf ein Gradientensystem Wasser/Acetonitril. Folgende Parameter werden vorerst angewendet:

Säule: Spherisorb ODS2, 5 μ , 2.1mm x 200mm

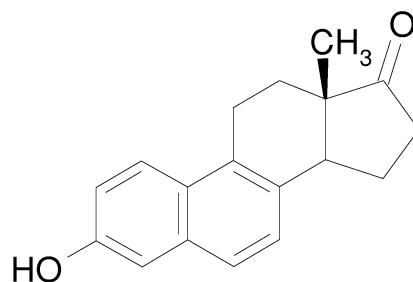
Laufmittel: A: Wasser

B: Acetonitril

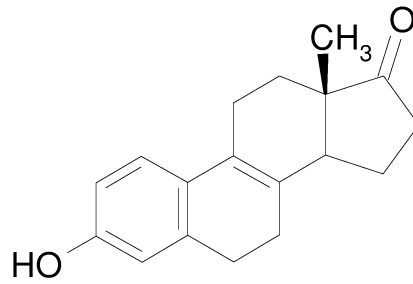
Gradient: 25%-35% Acetonitril in 30 min, Flussrate 0.3ml/min

Wie bereits erwähnt, ist das Zumischen der Base nach der Trennung ein äußerst kritischer Prozess. Einerseits sollte eine hohe Basizität erreicht werden, andererseits ist die Konduktivität des Laufmittels und somit die Höhe der Ionenuntergrundes ein limitierender Faktor. Beim Iontrap-Gerät kann mit bis zu 10fach höheren Ammoniakkonzentrationen als beim Sektorfeldgerät gearbeitet werden. Das führt zu einer wesentlich höheren Empfindlichkeit aufgrund einer höheren Deprotonierungsausbeute innerhalb der Ionenquelle. Die Konstanz der Zudosierung ist ein noch zu lösendes technisches Problem. Der hohe Rückdruck der Spraykapillare führt zum Limit beim Einsatz von Spritzenpumpen, HPLC-Pumpen leiden unter der Aggressivität des Ammoniaks.

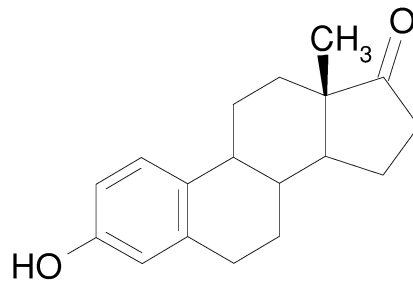
14. Strukturen



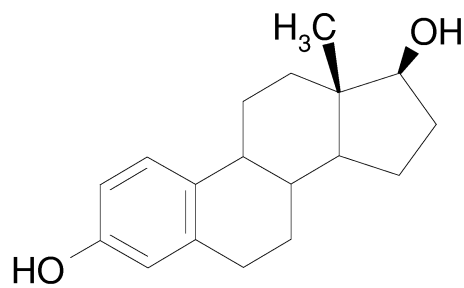
Equilenin



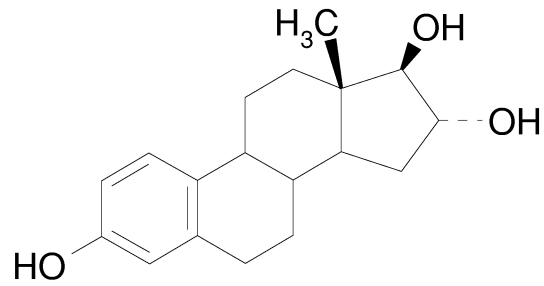
Equilin



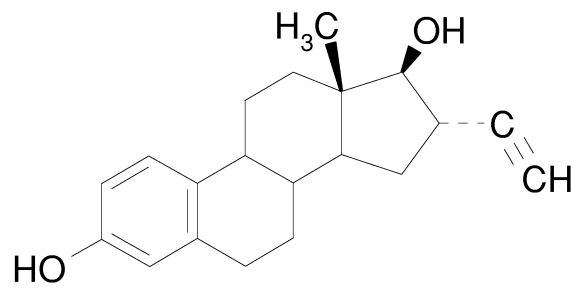
Estrone



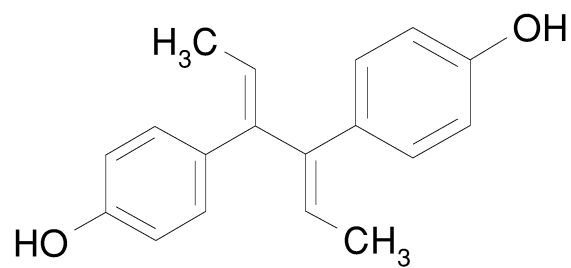
17β-Estradiol



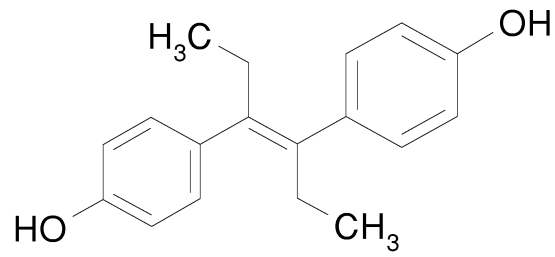
Estriol



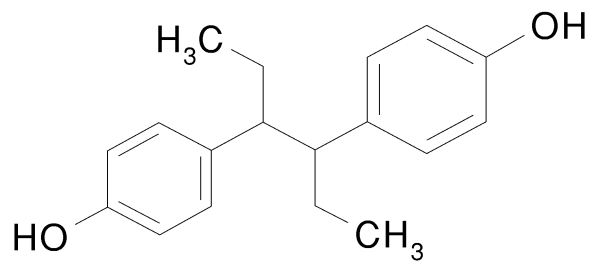
Ethinylestradiol



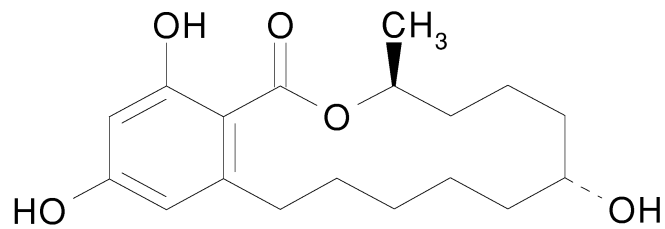
Dienestrol



Diethylstilbestrol

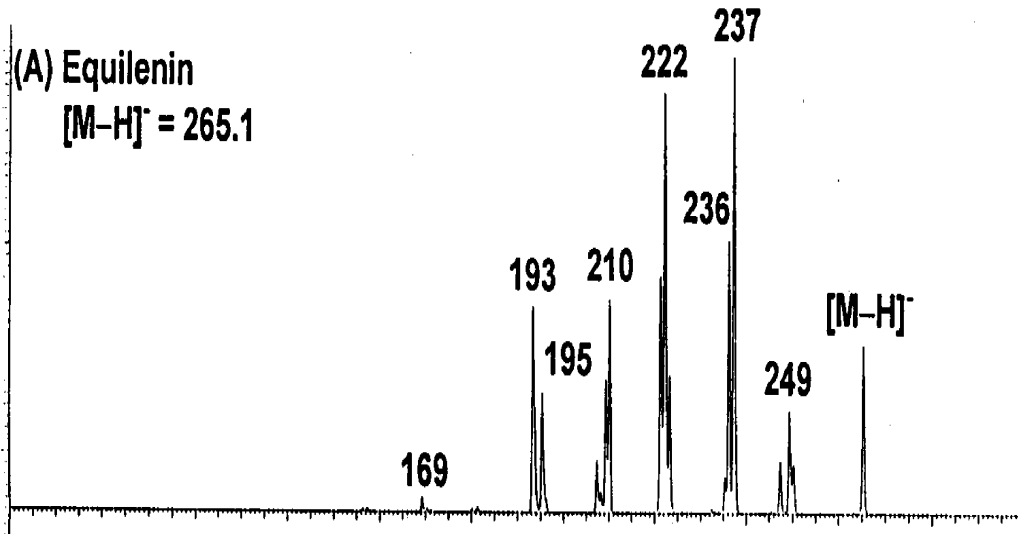


Hexestrol

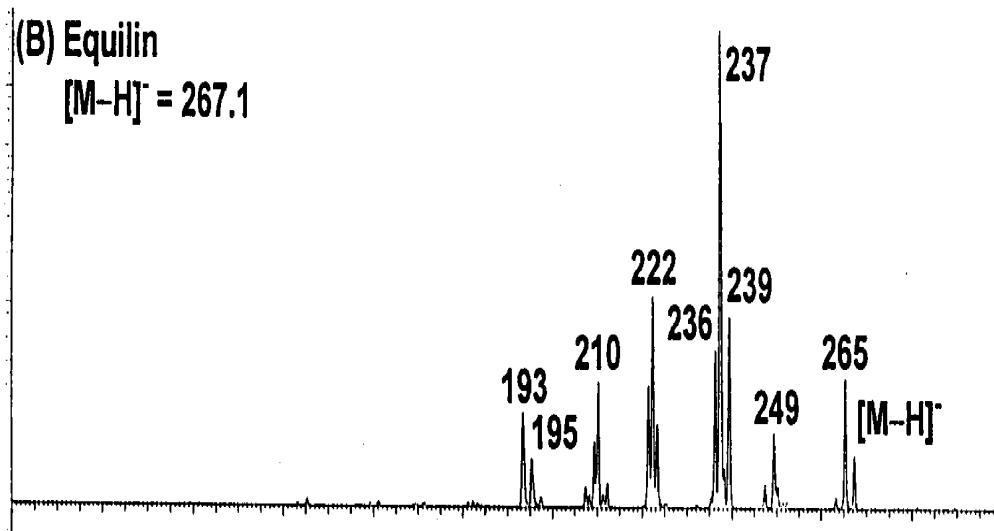


Zeranol

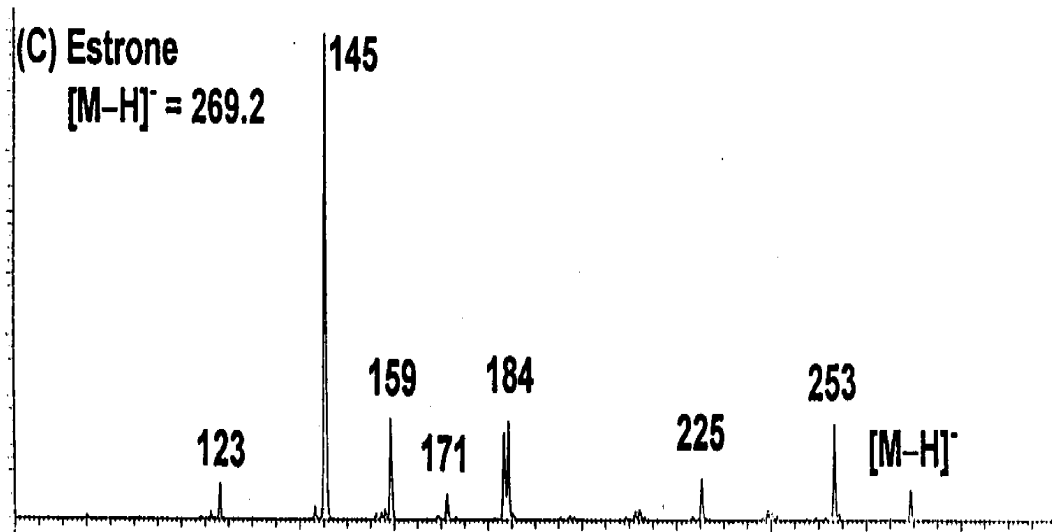
15. Spektren und Chromatogramme



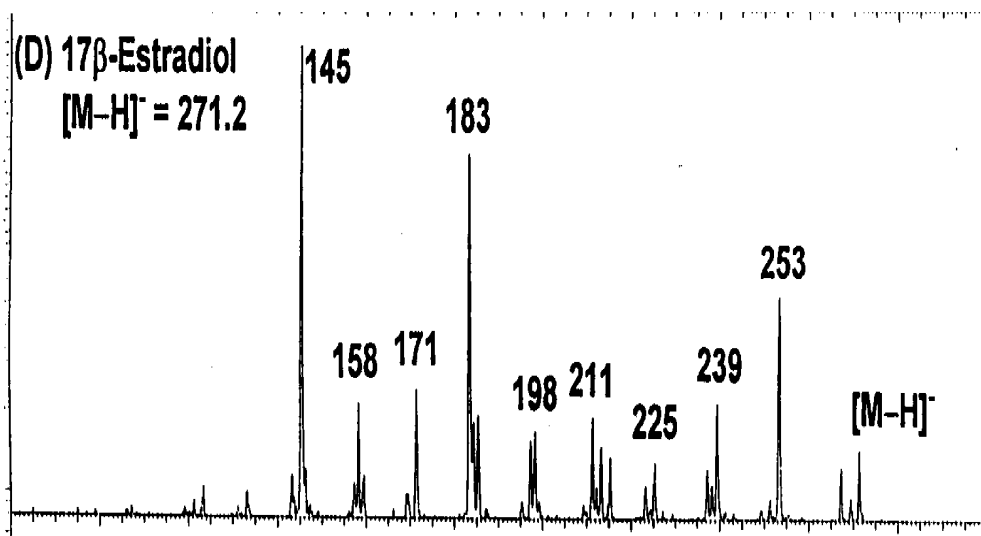
Negativ Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M-H]^-$ Spektrums



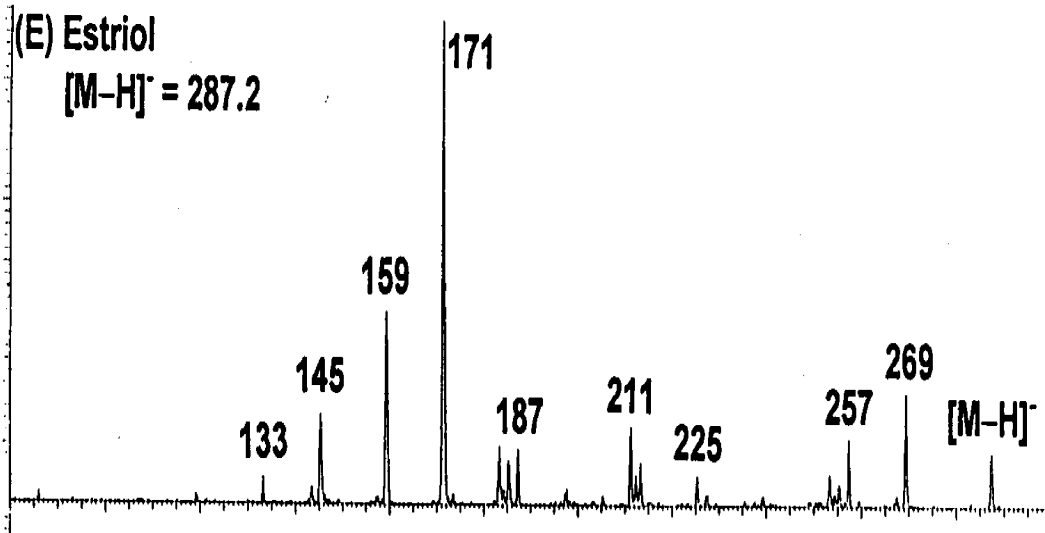
Negativ Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M-H]^-$ Spektrums



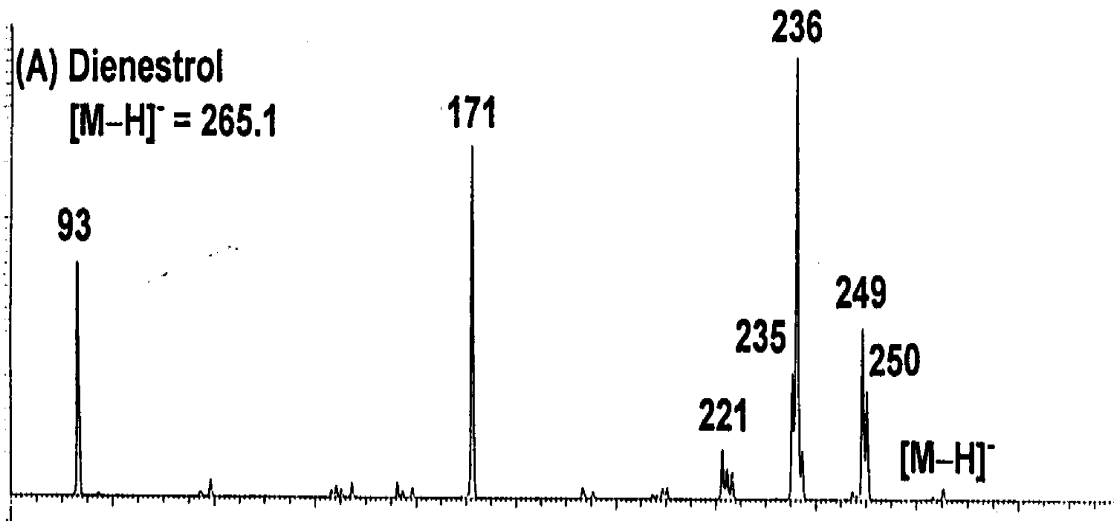
Negativ Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M-H]^-$ Spektrums



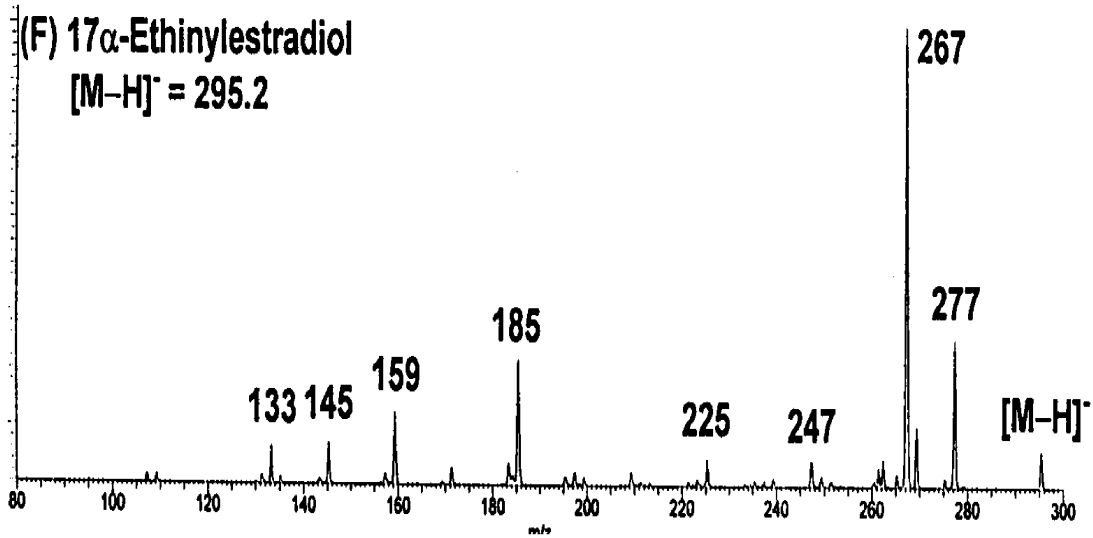
Negativ Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M-H]^-$ Spektrums



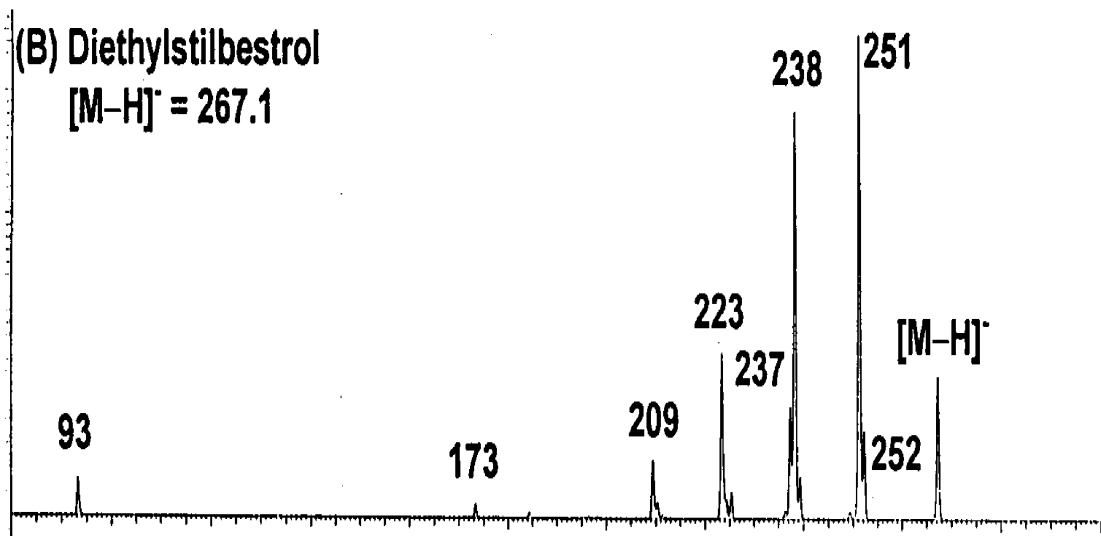
Negativ Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M-H]^-$ Spektrums



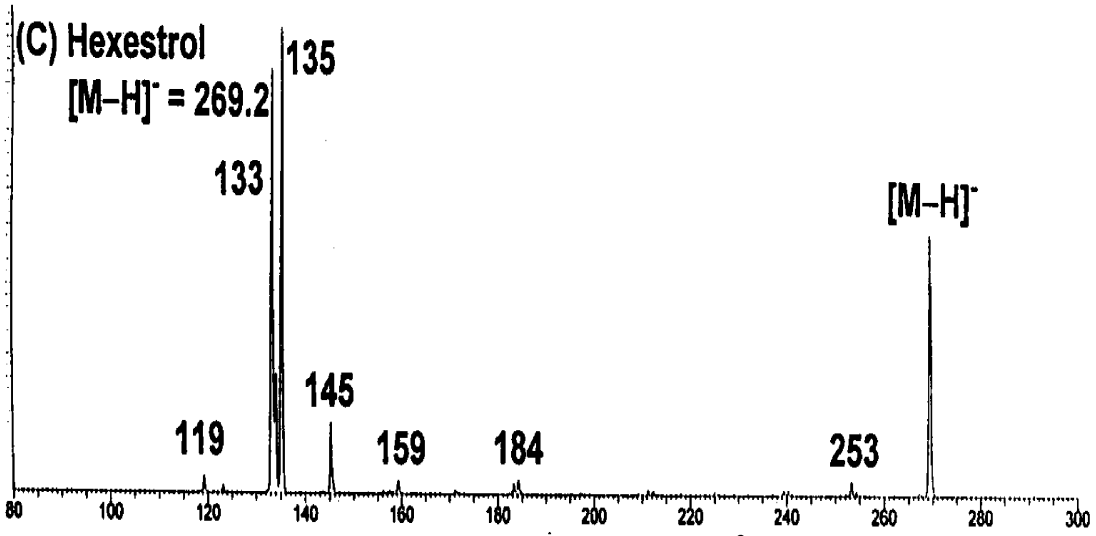
Negativ Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M-H]^-$ Spektrums



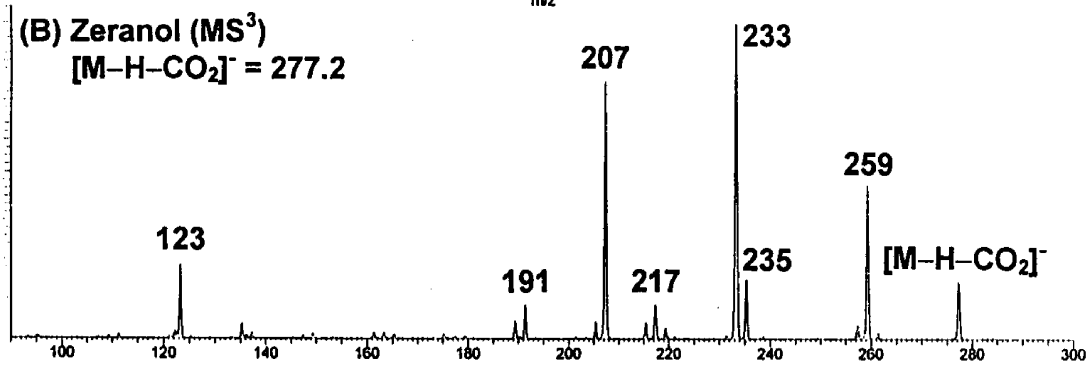
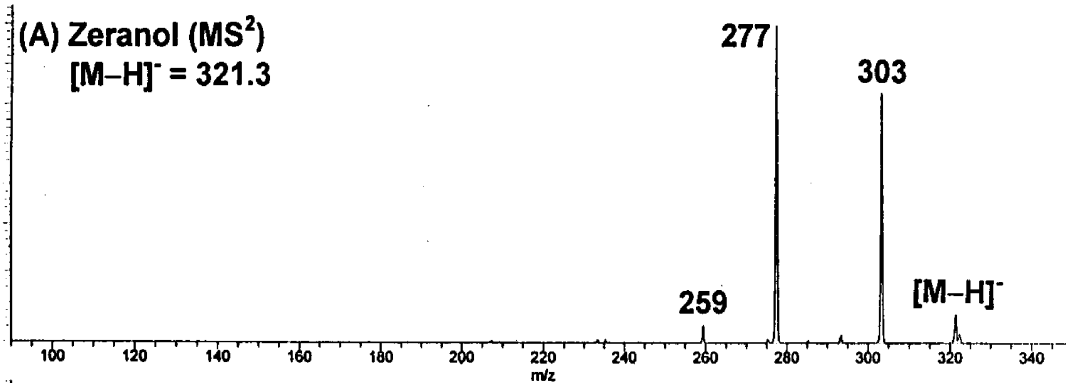
Negativ Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS²) des [M-H]⁻ Spektrums



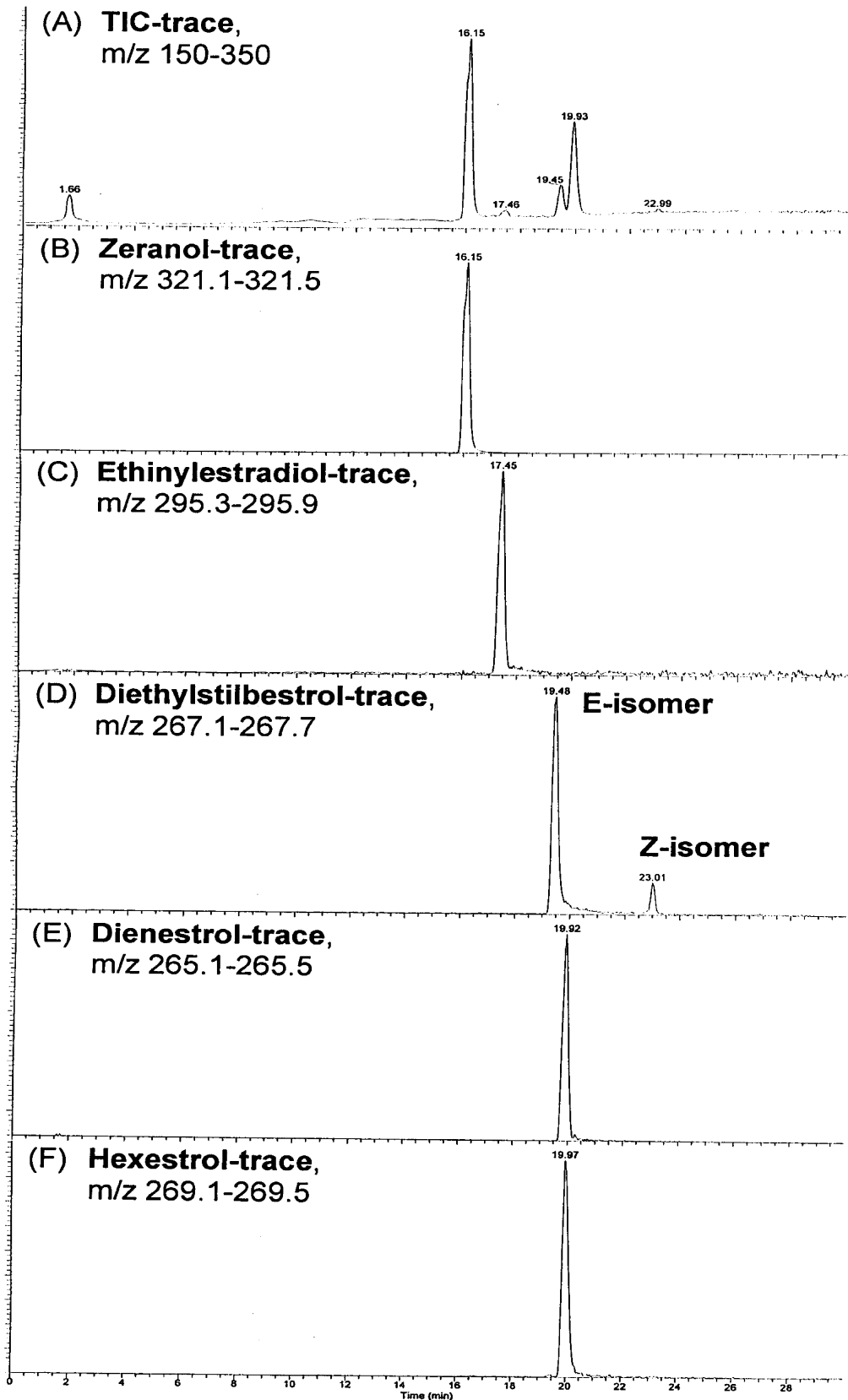
Negativ Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS²) des [M-H]⁻ Spektrums



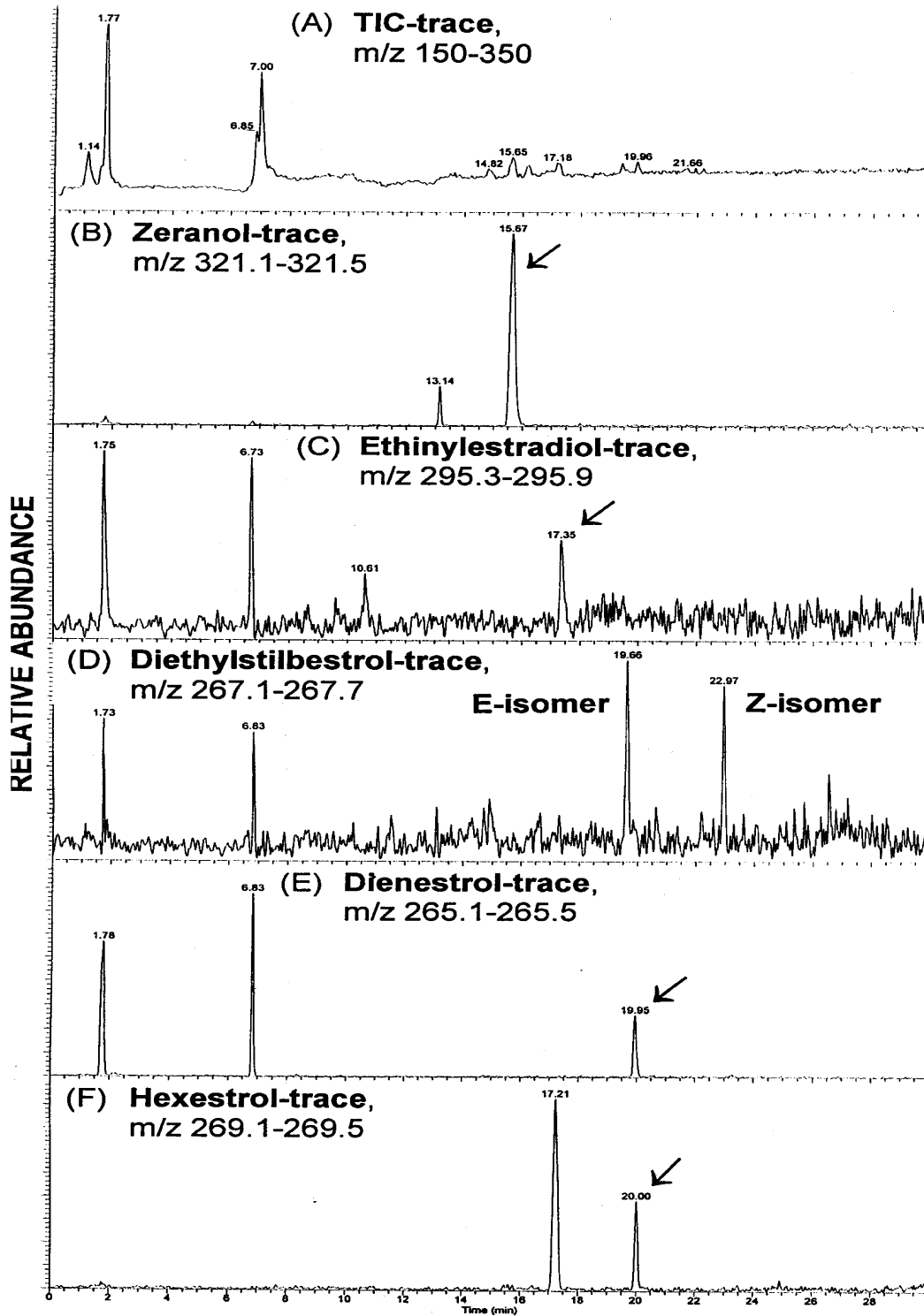
Negativ Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M-H]^-$ Spektrums



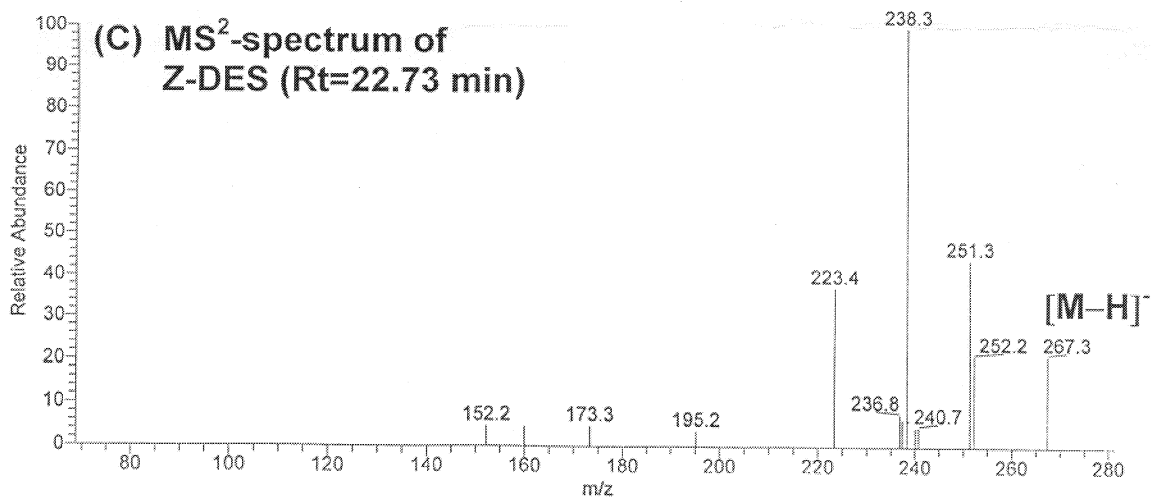
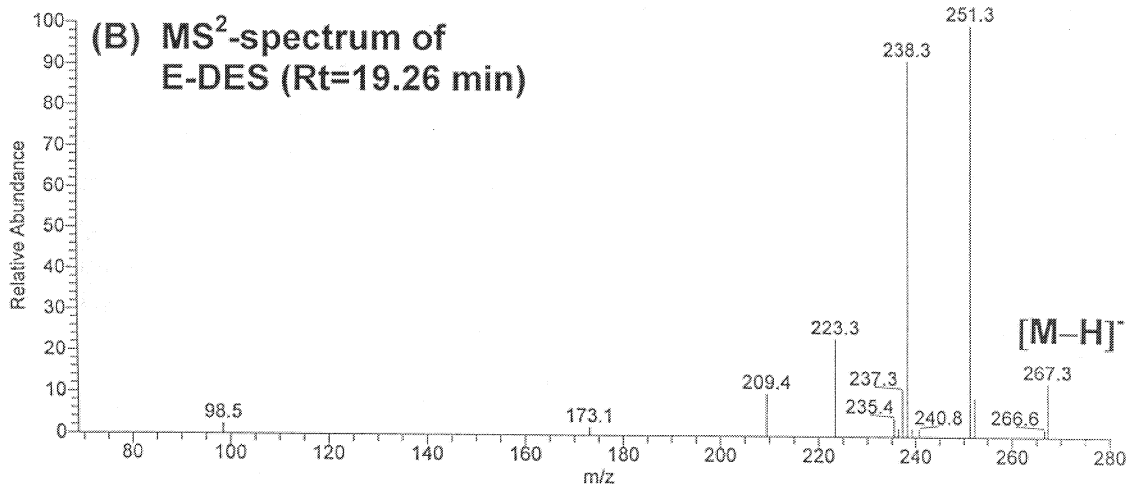
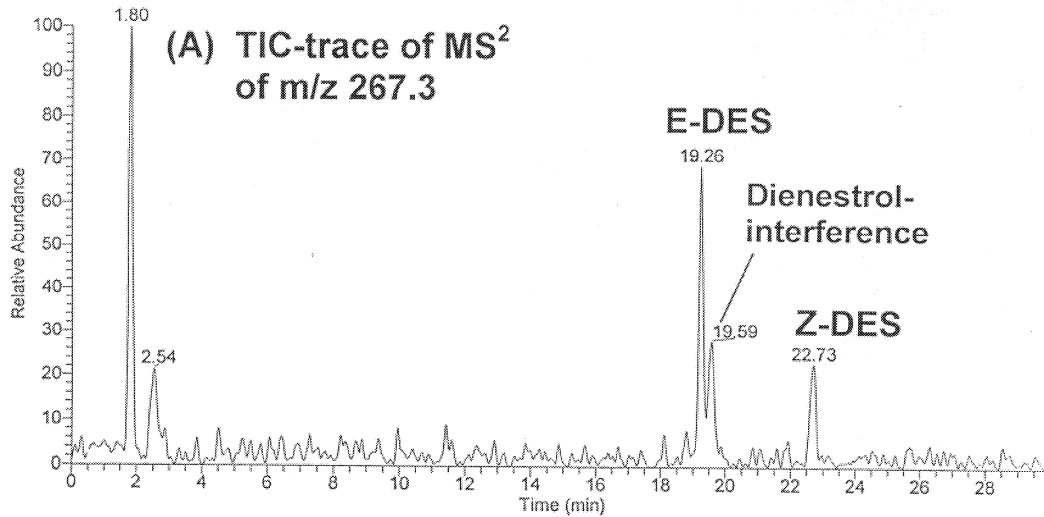
Negativ Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M-H]^-$ Spektrums



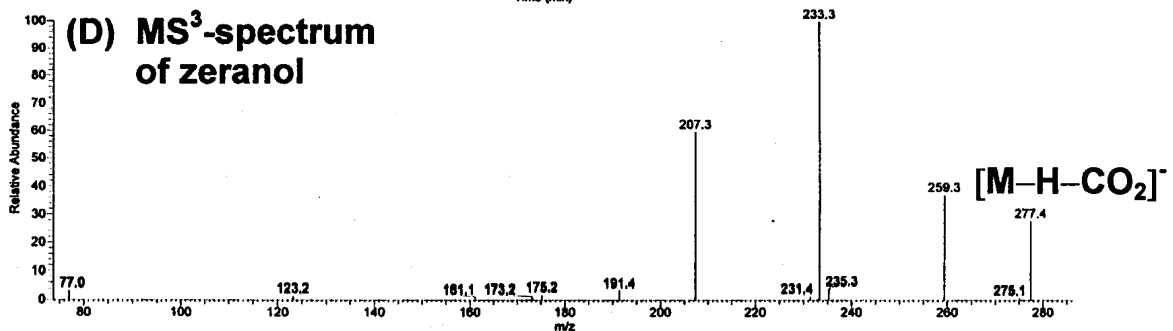
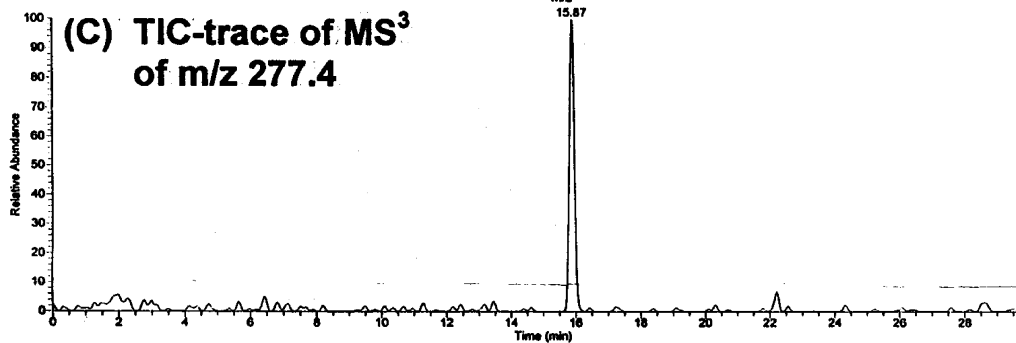
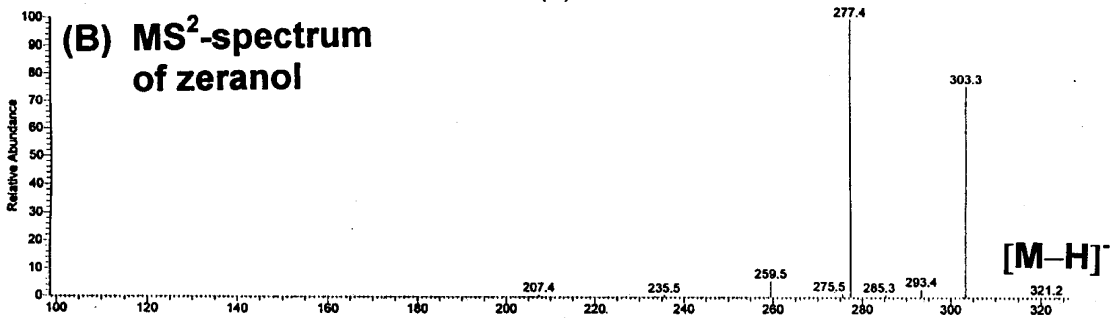
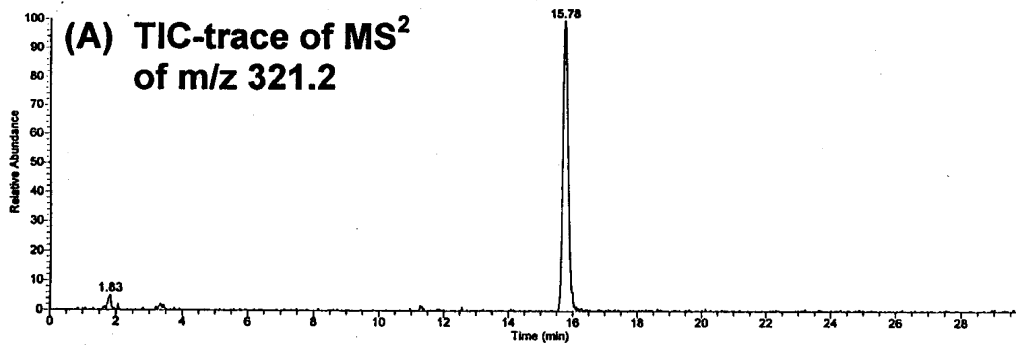
RP-HPLC/NI-ESIMS full scan von 5 oral aktiven Estrogenen (Ion Trap)



RP-HPLC/NI-ESIMS full scan von 5 oral aktiven Estrogenen (Ion Trap)
 Dotierte Probe (40ppb)



RP – HPLC/NI-ESIMS² (Tochterionen von m/z 267.3, [M-H]⁻ Ion von Diethylstilbestrol) full scan Spektrum eines mit 40ppb dotierten Futtermittels



RP – HPLC/NI-ESIMS² (Tochterionen von m/z 321.2, [M-H]⁻ Ion von Zeranol)
 full scan Spektrum eines mit 40ppb dotierten Futtermittels

16. Vermessung der Substanzen Cyproteron Acetat, Megestrol Acetat, Medroxyprogesteron Acetat, Chlormadinon Acetat, Ethisteron, Norethindron Acetat, Melengestrol Acetat und Ethynodiol Diacetat.

Nach der Auswahl von weiteren Substanzen aus der Gruppe der Gestagene wurde eine HPLC/MS/MS Methode auf Basis pos-ESI erarbeitet. Im Gegensatz zu den bisher behandelten Substanzen Equilenin, Equilin, Estrone, Estradiol, Estriol, Ethinylestradiol, Dienestrol, Diethylstilbestrol, Hexestrol und Zeranol, welche im Negativionenmodus gemessen wurden, ergaben die ersten Tests keine befriedigenden Ergebnisse hinsichtlich der Empfindlichkeit für MS/MS Experimente. Erst nach Adaption der Chromatographie, also der Umstellung auf Mikro-HPLC und der Neukonzeption der Ionenquelle wurden optimale Bedingungen für den Nachweis der Gestagene gefunden. Desweiteren muss festgehalten werden, dass nur die Hälfte der Substanzen im MS³ Modus, also der höchsten Identifikationsstufe, gemessen werden können. Die Stabilität der Methode ist zufriedenstellend, sodass für eine Validierung gemäß den internationalen Richtlinien (ICH) keine Probleme bereitete. Die Methode ist auch für den Einsatz zur Spurensuche im Bereich der Gestagene geeignet.

17. Chromatographie

Folgendes System wurde anfangs für die Chromatographie angewendet:

Säule: Spherisorb ODS2, 5 μ , 2.1mm x 200mm

Laufmittel: A: 10mM Ammoniumacetat pH4

B: 835 mg Ammoniumacetat werden in 20 ml Wasser vorgelöst. 500ml Acetonitril werden vorgelegt und die Ammoniumacetatlösung zugegeben. Die Lösung wird leicht trüb, nach kurzer Rührdauer jedoch wieder klar. Anschließend werden 2 ml Essigsäure zugegeben und kurz im Ultraschallbad behandelt. Die Lösung wird daraufhin wieder trüb. Unter Rühren werden dann langsam 10 ml Wasser zugegeben-die Lösung wird wieder klar.

Gradient: 20%B auf 100%B in 30 min

Fluss: 0.3 ml/min

18. Optimierung der Parameter

Wie bereits aus den ersten Experimenten zu sehen war, sind die Empfindlichkeiten trotz Optimierung der Geräteparameter auf die einzelnen Substanzen nicht optimal. Einerseits scheint diese Tatsache an der Ionenbildung selbst, andererseits an der nicht optimalen Transmission der Tröpfchen in die erste Vakuumregion zu liegen. Es war daher notwendig, diese Parameter signifikant zu verbessern. Bei der Optimierung der Geräteparameter auf die einzelnen Substanzen bestand nicht sehr viel Spielraum, ausser dass die Anregungszeiten sowie die Verlängerung der Sammel- und Injektionszeiten eine Verbesserung der Empfindlichkeit bis etwa 10% zuließen. Da die Erhöhung der Ionisationsausbeute über das Laufmittel und die Chromatographie ohnehin innerhalb des Gesamtsystems immer ein Kompromiss zu sein hat, waren auch hier die Verbesserungen durchaus limitiert. Da die Trennung aller Substanzen innerhalb eines chromatographischen Laufes die Selektivität der Trennmaterialien überfordert, wurde ein Kompromiss der Geräteparameter gesucht. Da die einzelnen Optima der Systemgrößen ohnehin einer Gauß'schen Verteilung unterliegen, konnte ein Durchschnittswert, speziell an den Linsenspannungen und der Kapillarspannung eingesetzt werden. Mit diesen, für alle Substanzen „optimalen“ Parametern, konnte schliesslich der gesamte Bereich der Chromatographie abgedeckt werden, ohne signifikante Verlust zu erleiden. Der wirkliche Durchbruch im Empfindlichkeitsgewinn wurde jedoch durch die völlige Umgestaltung der Ionenquelle und den Umstieg auf Mikro-HPLC erreicht. Die Spraygeometrie wurde wie folgt geändert:

- Der Innendurchmesser der Spraydüse wurde auf 0.3mm verringert
- Die Übertragung der Hochspannung erfolgt nicht über das Spraygehäuse sondern über die Kapillare selbst
- Die Spraykapillare ist nicht aus Quarzglas sondern aus Stahl
- Die Abmessungen der Kapillare betragen: aussen 0.16mm, innen 0.06mm
- Die Spitze der Spraykapillare wurde elektroliert
- Der Spraydruck wurde auf 10 bar erhöht
- Die Ausprägung der Spraykegels wurde mit einem Strichlaser unter Beobachtung mittels Minikamera und Bildschirm optimiert, sodass der Kegel bei Annäherung an die Transferkapillare etwa 1/3 der Planfläche bedeckt.
- Die Ionenquelle weist ein offenes Design auf
- Als Chromatographisches System wurde eine 5cm C18 Mikrosäule (ID 0.32) verwendet.
- Der Fluss wurde auf 7 µl/min eingestellt
- Der Abstand Spraynadel/Transferkapillare konnte nach Reduktion der Hochspannung auf 1.8kV auf 0.5cm verringert werden
- Injektionsvolumen beträgt 100nl

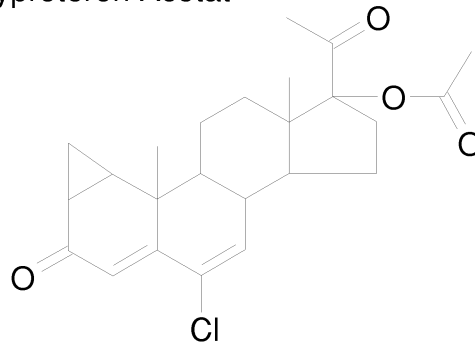
Schon die ersten Ergebnisse der on-line-Messungen mit dieser Konfiguration waren verblüffend. Im Full-scan Modus, ohne die Vorteile der Untergrundreduktion von MS/MS-Messungen zu nutzen, konnte eine Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 100 erreicht werden. Wie die anschließenden Chromatogramme zeigen, ist bei weitem noch nicht die Grenze nach unten erreicht. Es ist davon auszugehen, dass im Tandembetrieb die vertraulich zu messenden Konzentrationen im unteren pg-Bereich liegen werden.

Diese Konfigurationsänderung bringt in Folge noch weitere Vorteile:

1. Der Lösungsmittelverbrauch sinkt dramatisch
2. Durch geringeren Einsatz von Ausgangsmaterial reduzieren sich die Matrixeffekte
3. Die Verunreinigungen des Systems verringern sich (Reinigung)
4. Die Methode kann für den Einsatz von Materialien verwendet werden, von denen nur wenig vorhanden ist.
5. Die Anwendung auf andere verbotene Analyten (z.B.: Antibiotika), welche zum Teil in nur geringen Konzentrationen vorliegen, ist durchaus real (Als Beispiel sei hier genannt, dass mit dieser Konfiguration aus nur 10 menschlichen Haaren mit einer Länge von je 15cm Cocain in einer Menge von nur 500 fg nachgewiesen werden konnte).

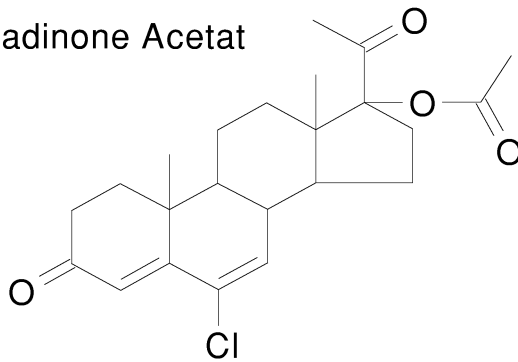
19. Strukturen

Cyproteron Acetat



Molecular Weight =416.95
Exact Mass =416
Molecular Formula =C₂₄H₂₉ClO₄

Chlormadinone Acetat

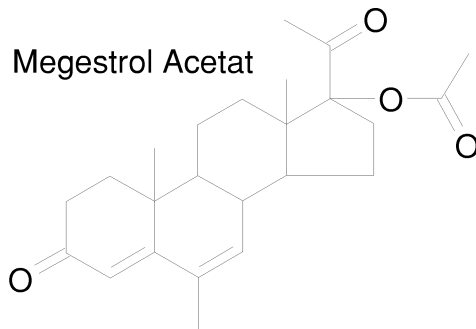


Molecular Weight =404.94

Exact Mass =404

Molecular Formula =C₂₃H₂₉ClO₄

Megestrol Acetat

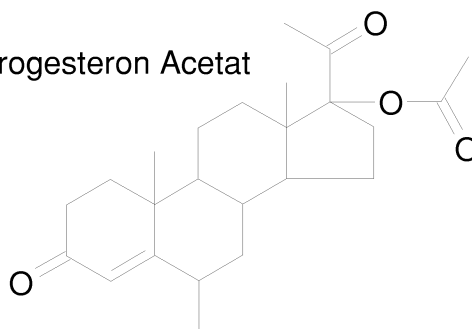


Molecular Weight =384.52

Exact Mass =384

Molecular Formula =C₂₄H₃₂O₄

Medroxyprogesteron Acetat

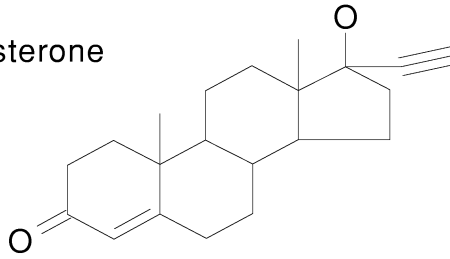


Molecular Weight =386.54

Exact Mass =386

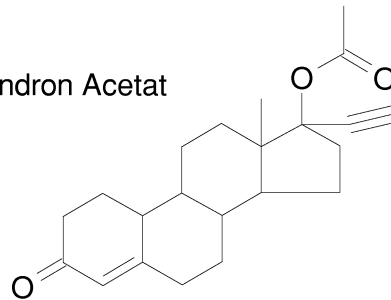
Molecular Formula =C₂₄H₃₄O₄

Ethisterone



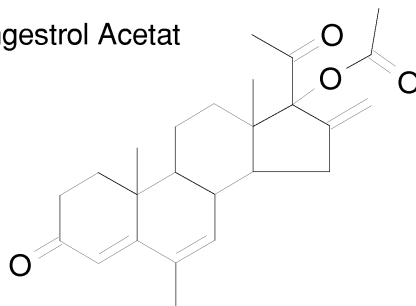
Molecular Weight =312.46
Exact Mass =312
Molecular Formula =C₂₁H₂₈O₂

Norethindron Acetat



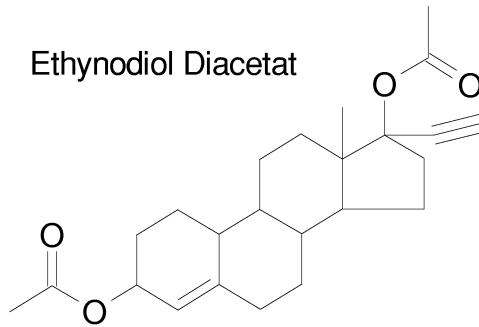
Molecular Weight =340.47
Exact Mass =340
Molecular Formula =C₂₂H₂₈O₃

Melengestrol Acetat



Molecular Weight =396.53
Exact Mass =396
Molecular Formula =C₂₅H₃₂O₄

Ethinodiol Diacetat



Molecular Weight =384.52

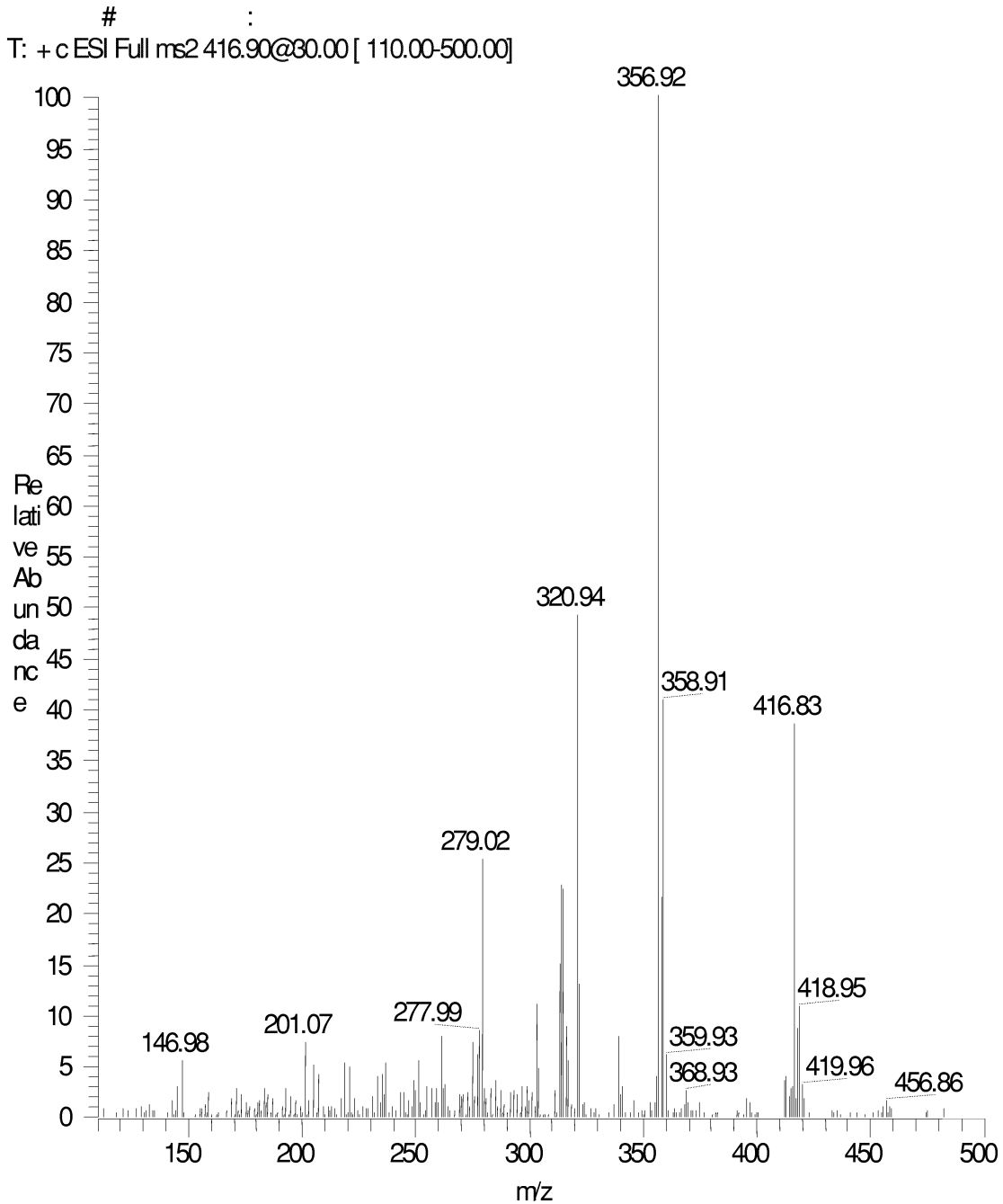
Exact Mass =384

Molecular Formula =C₂₄H₃₂O₄

20. Ionen

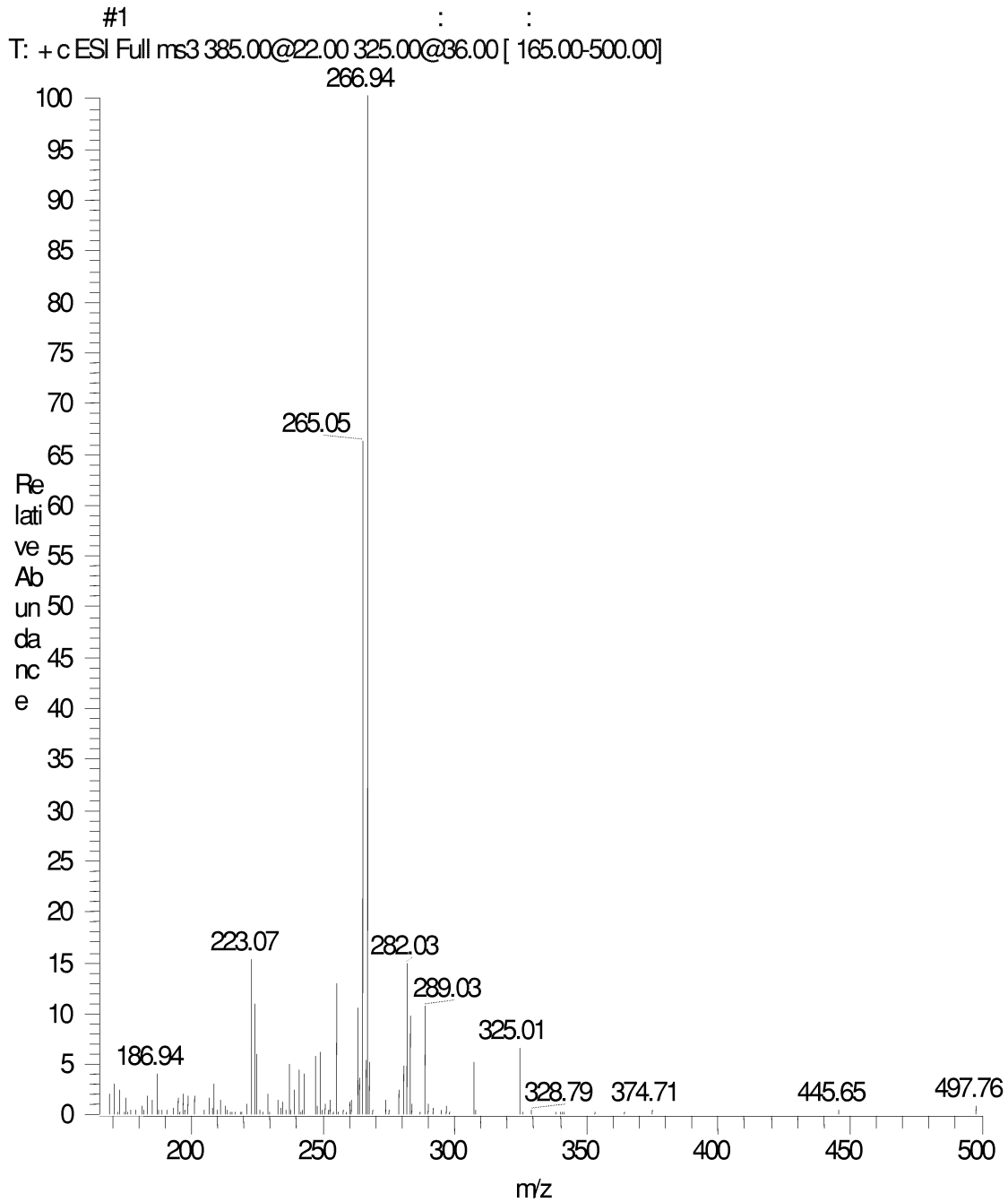
Substanz	Mutterion (M+H) ⁺	MS ²	MS ³
Cyproterone Acetat	416.9	356.9	321
Megestrol Acetat	384.9	325	267
Medroxyprogesterone Acetat	387	327	--
Chlormadinone Acetat	405.2	345	309
Ethisterone	313	--	--
Norethindrone Acetat	340.9	281	--
Melengestrole Acetat	396.8	337	279
Ethinodiol Diacetat	325	265	--

21. Spektren und Chromatogramme



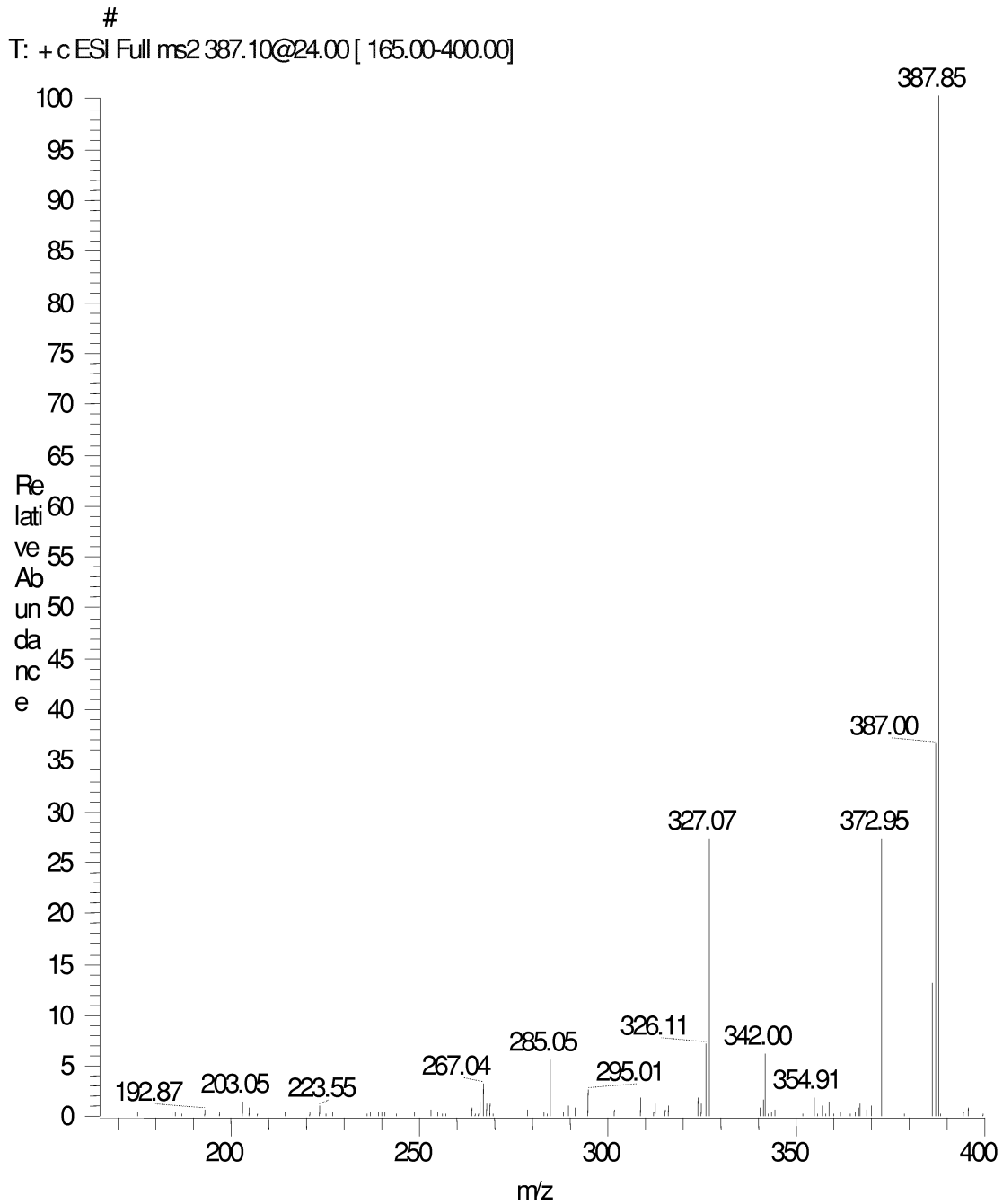
Cyproteron Acetat

Positiv Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M+H]^+$ Spektrums

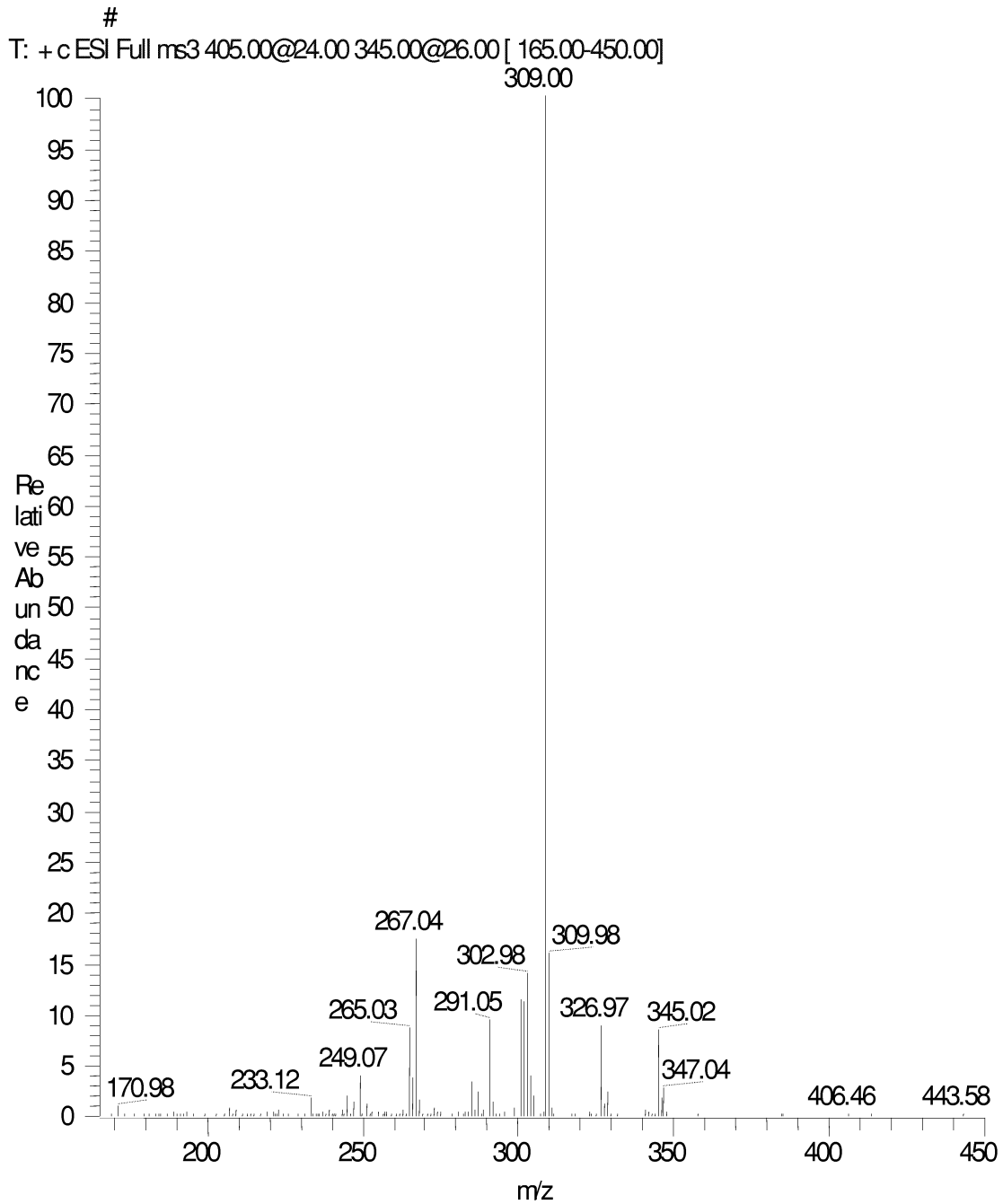


Megestrolacetat

Positiv Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^3) des $[M+H]^+$ Spektrums

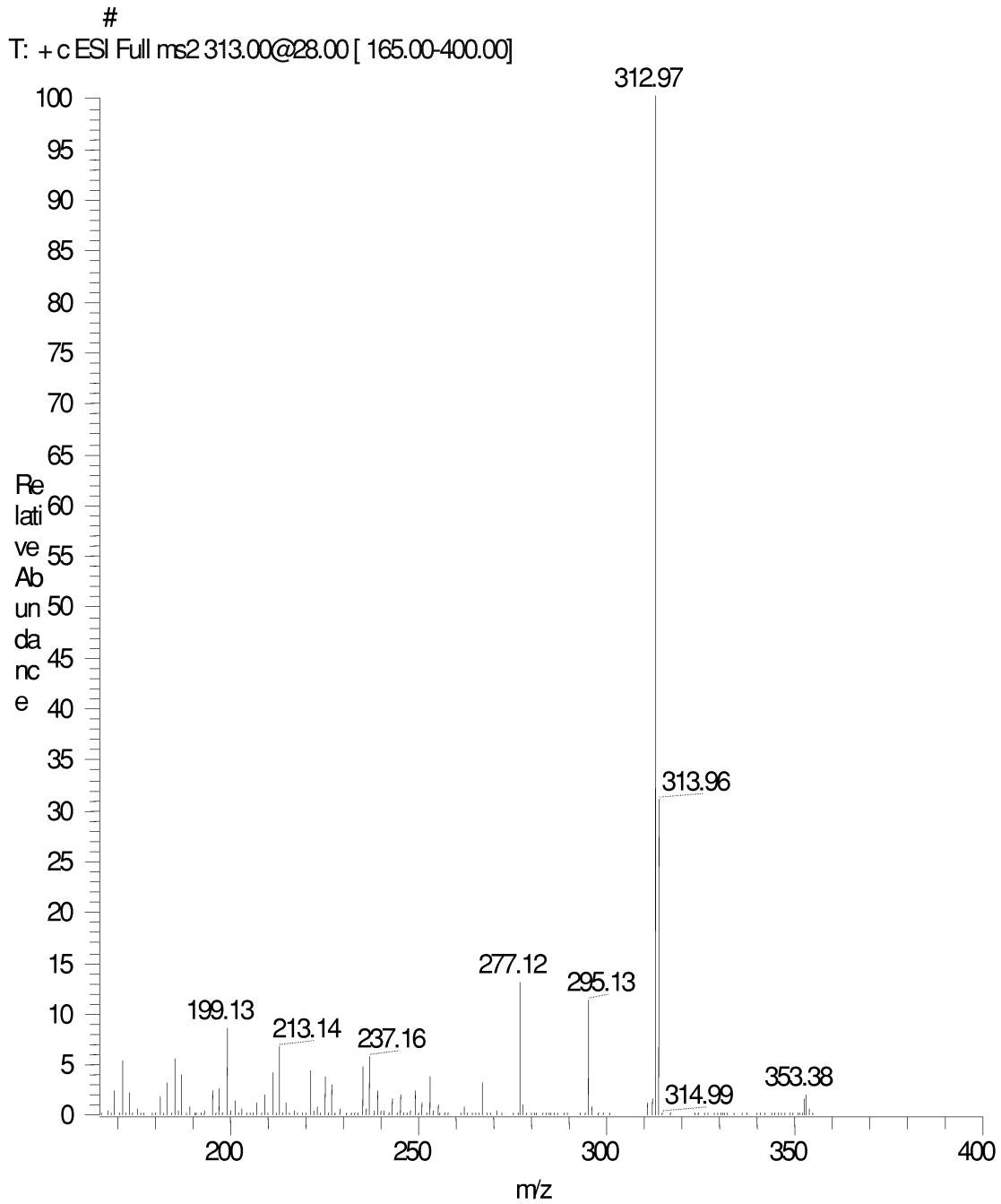


Medroxyprogesteron Acetat
Positiv Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M+H]^+$ Spektrums



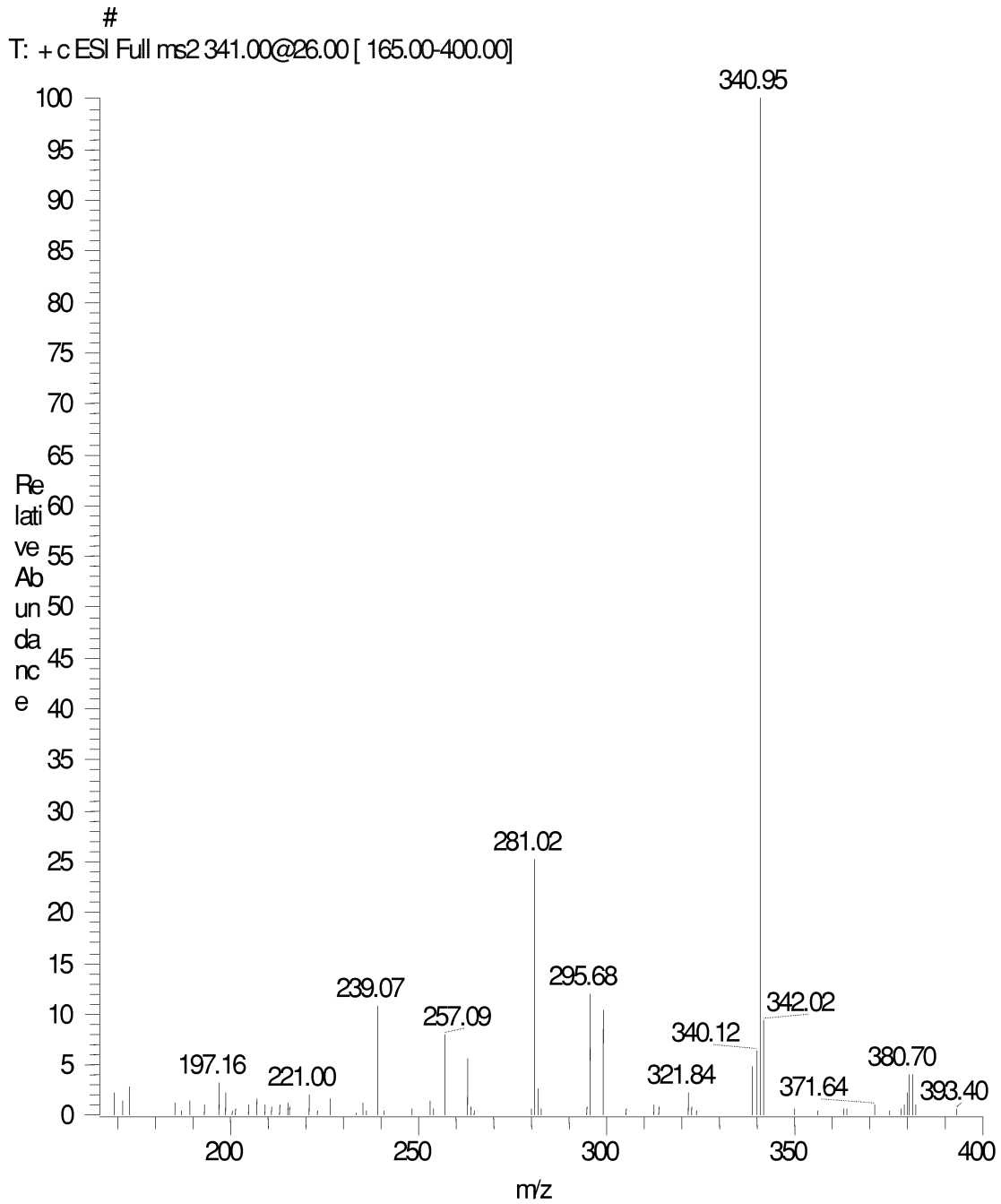
Chlormadinon Acetat

Positiv Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^3) des $[M+H]^+$ Spektrums



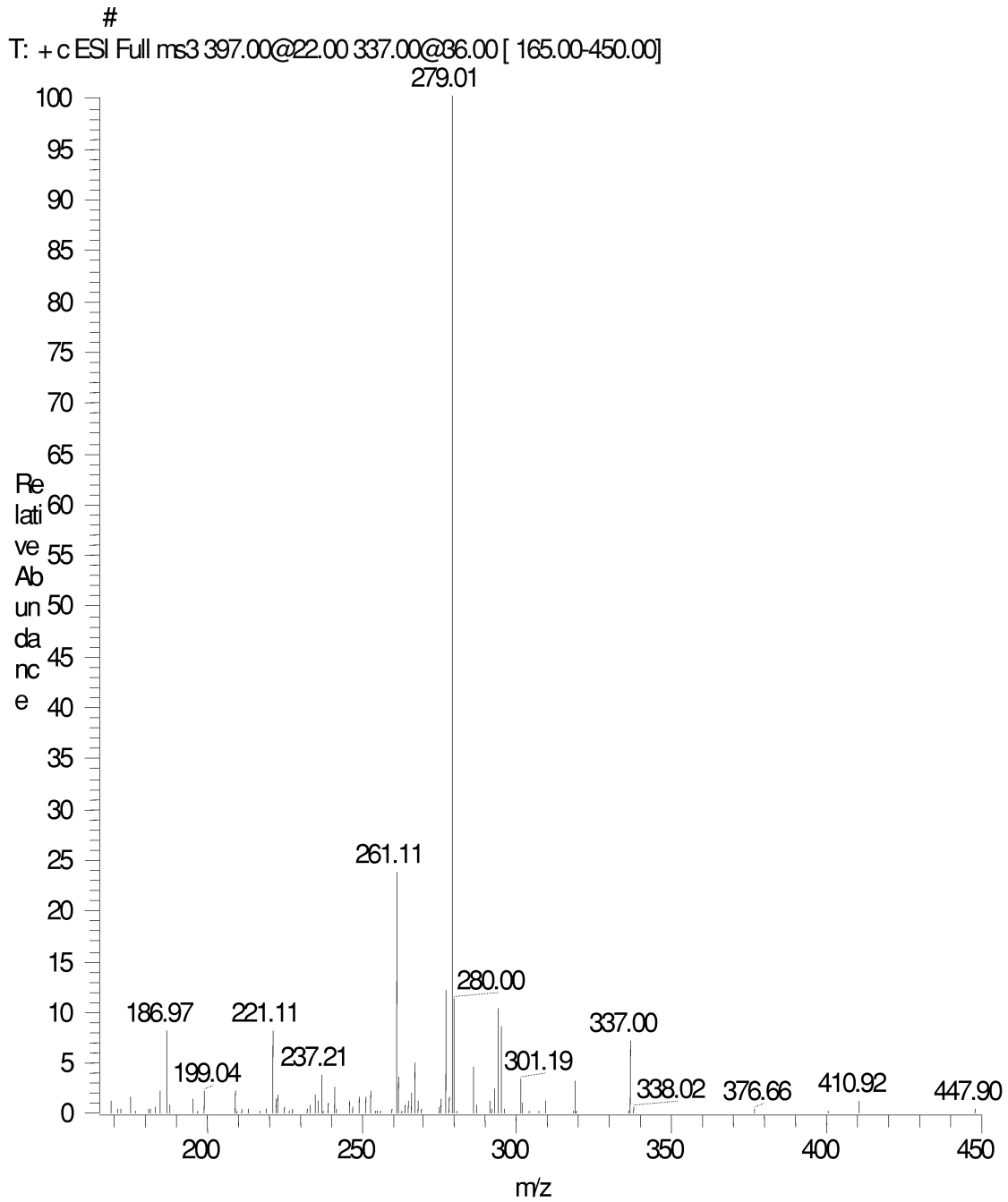
Ethisteron

Positiv Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M+H]^+$ Spektrums



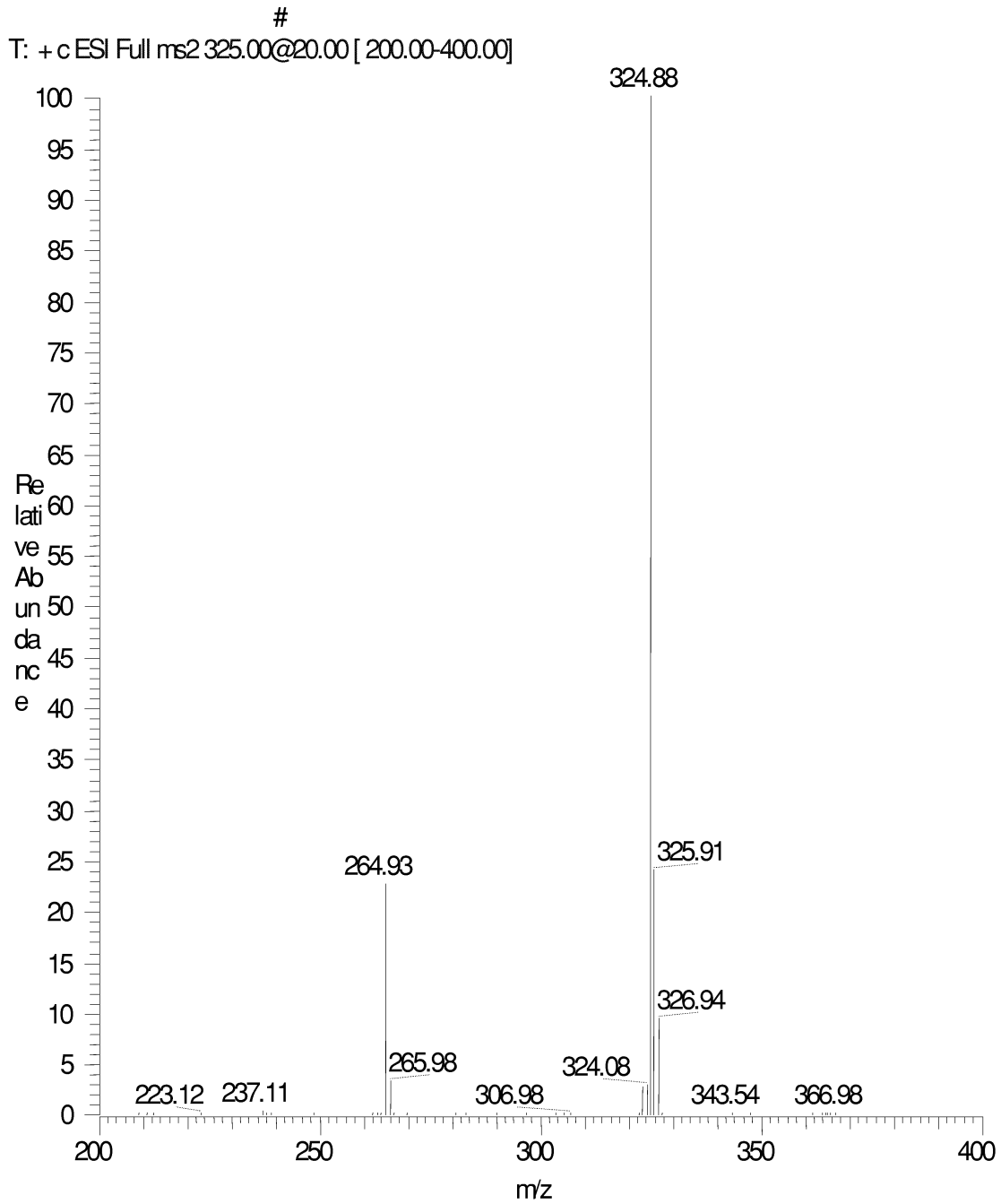
Norethindron Acetat

Positiv Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M+H]^+$ Spektrums



Melengestrol Acetat

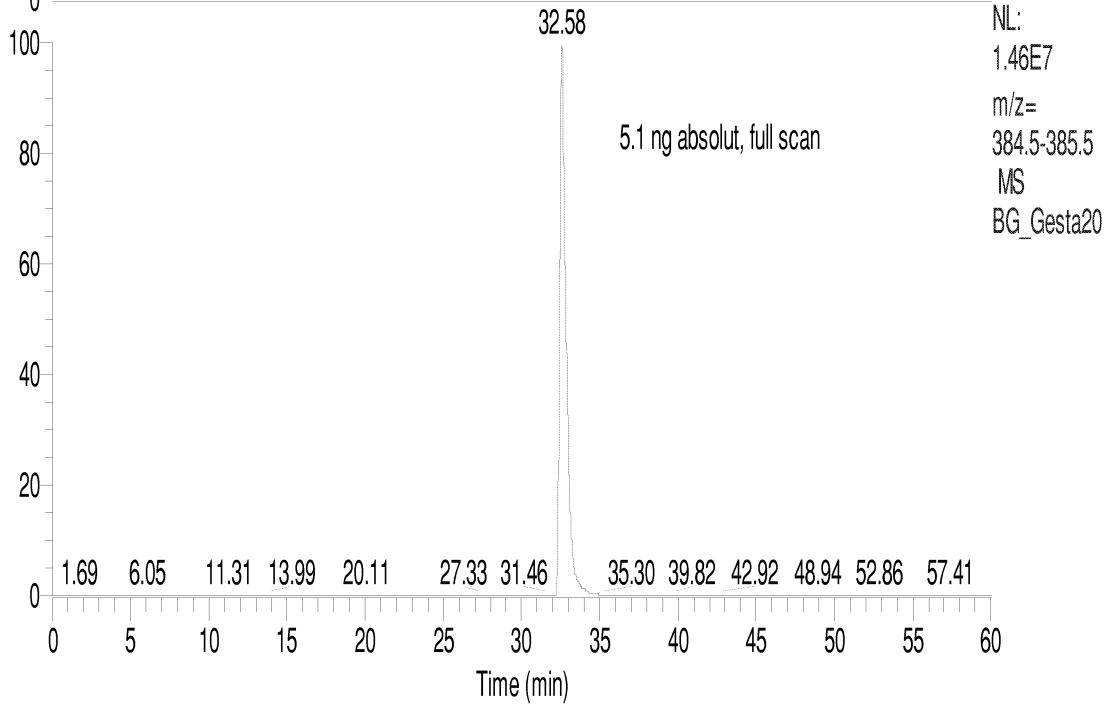
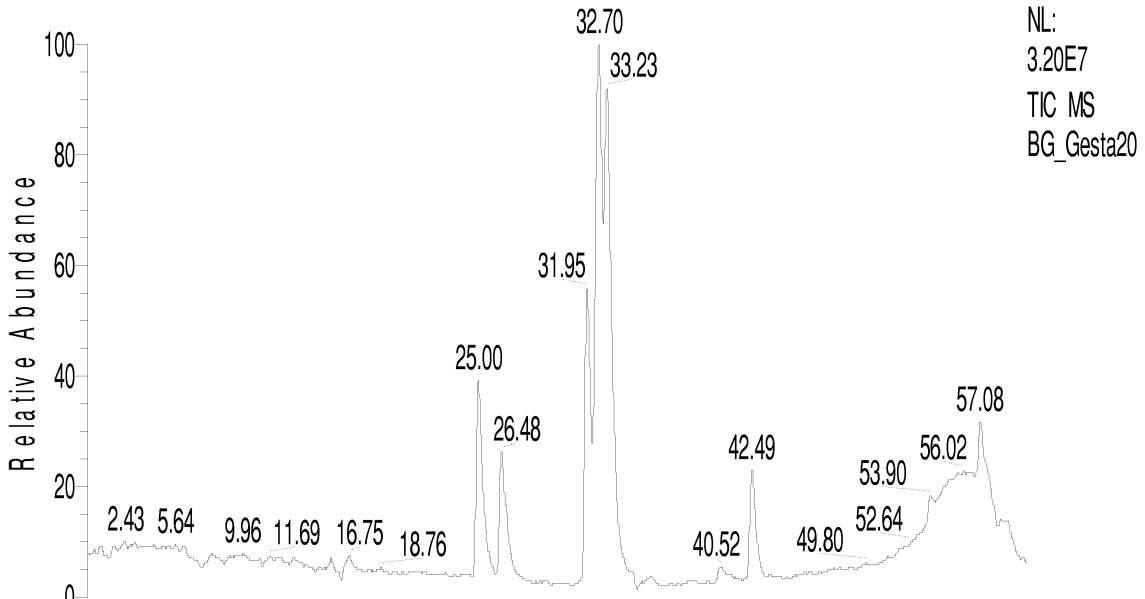
Positiv Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^3) des $[M+H]^+$ Spektrums



Ethynodiol Diacetat

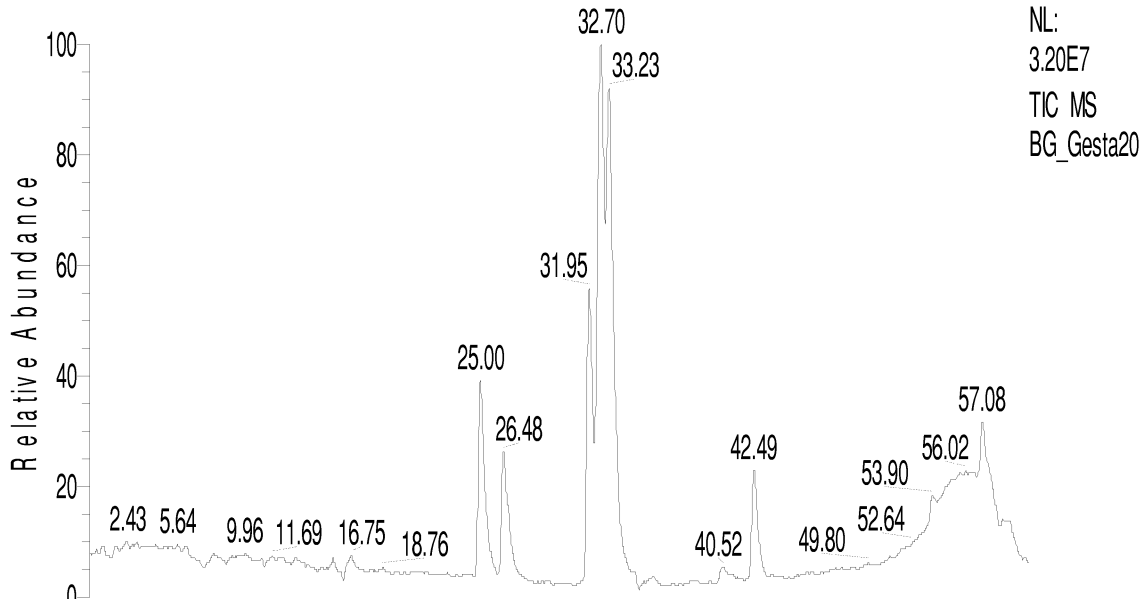
Positiv Ionen Niederenergie CID Spektrum (MS^2) des $[M+H]^+$ Spektrums

RT: 0.00 - 60.02 SM: 15G

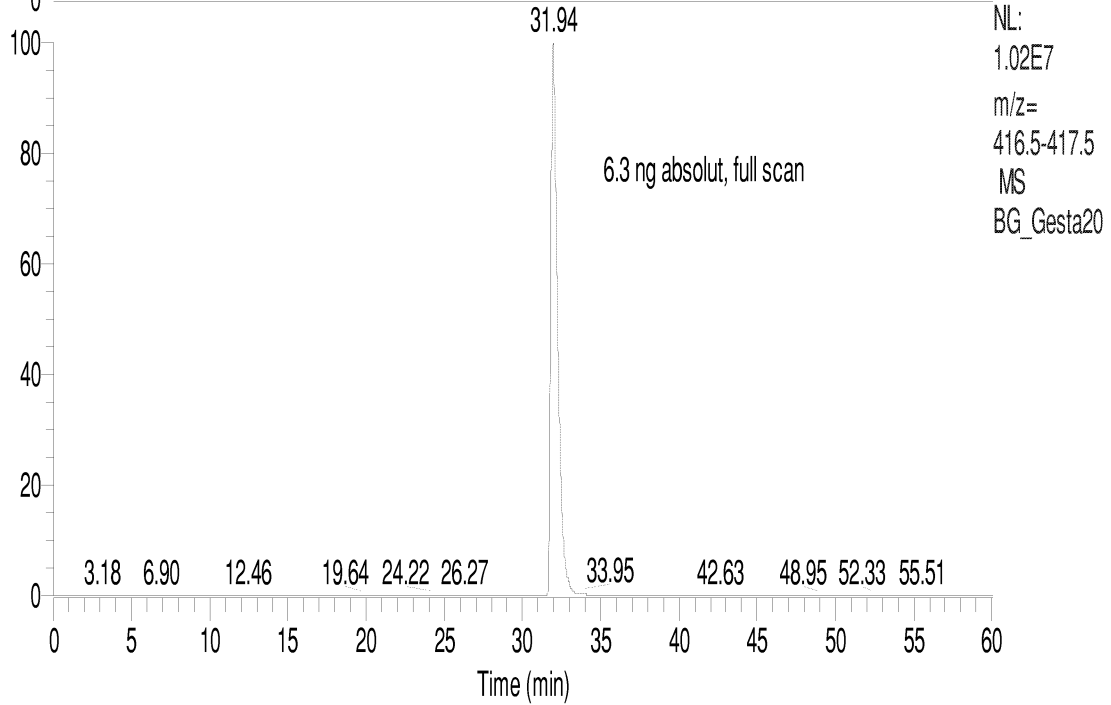


RP-HPLC/POS-ESIMS full scan von 8 oral aktiven Gestagenen (Ion Trap)
 Megestrol Acetat

RT: 0.00 - 60.02 SM: 15G



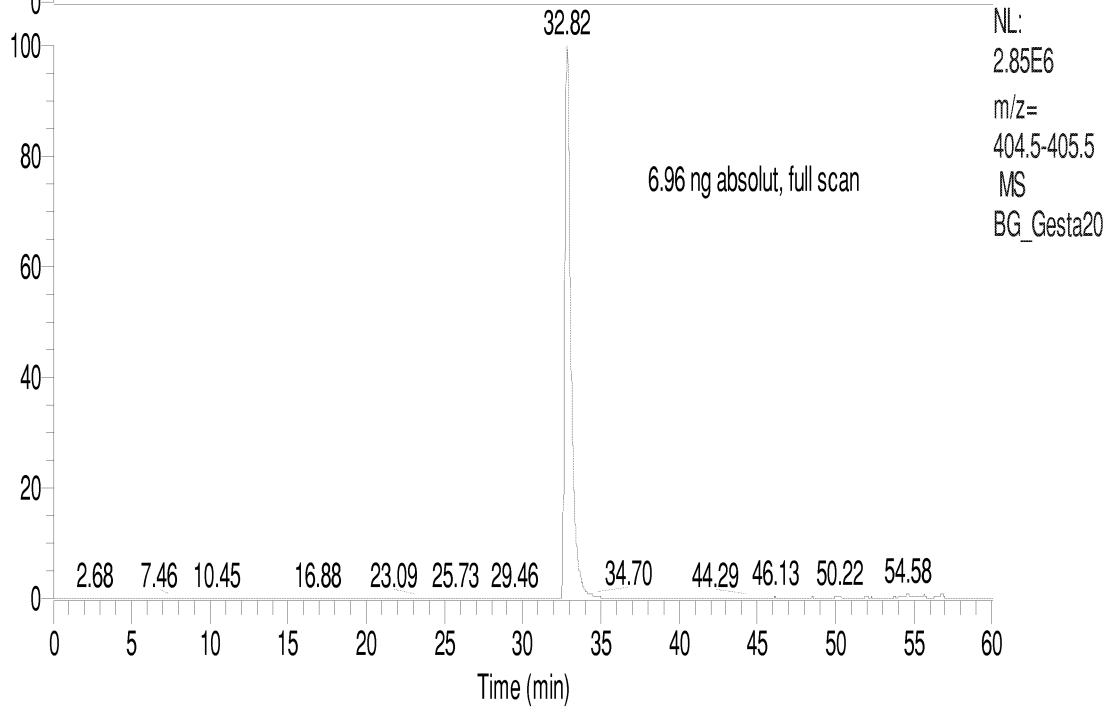
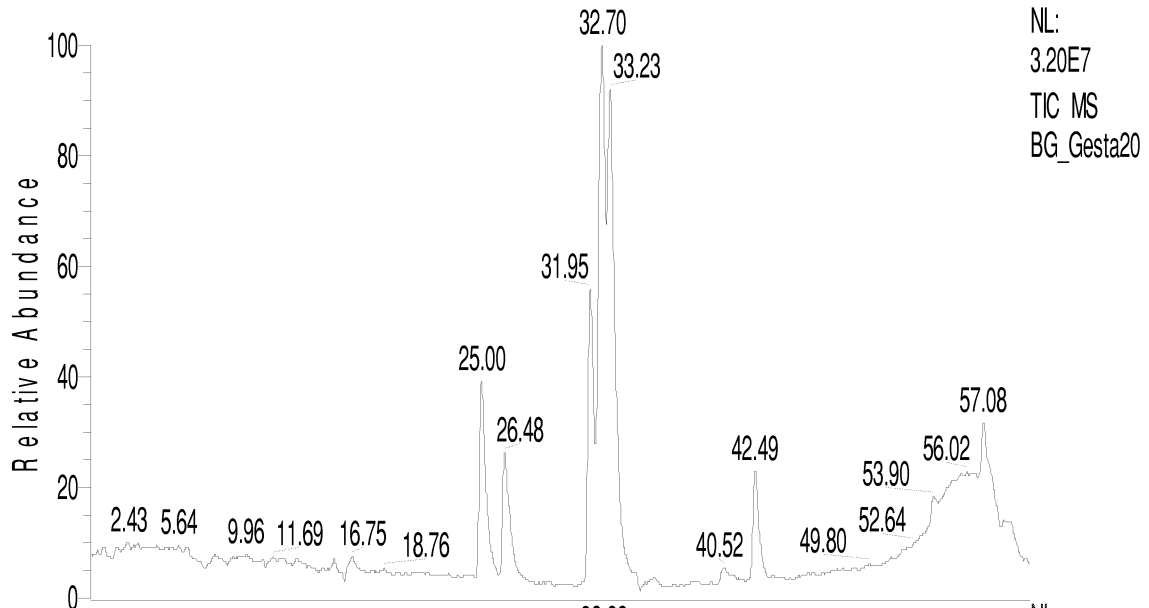
NL:
 3.20E7
 TIC MS
 BG_Gesta20



NL:
 1.02E7
 m/z=
 416.5-417.5
 MS
 BG_Gesta20

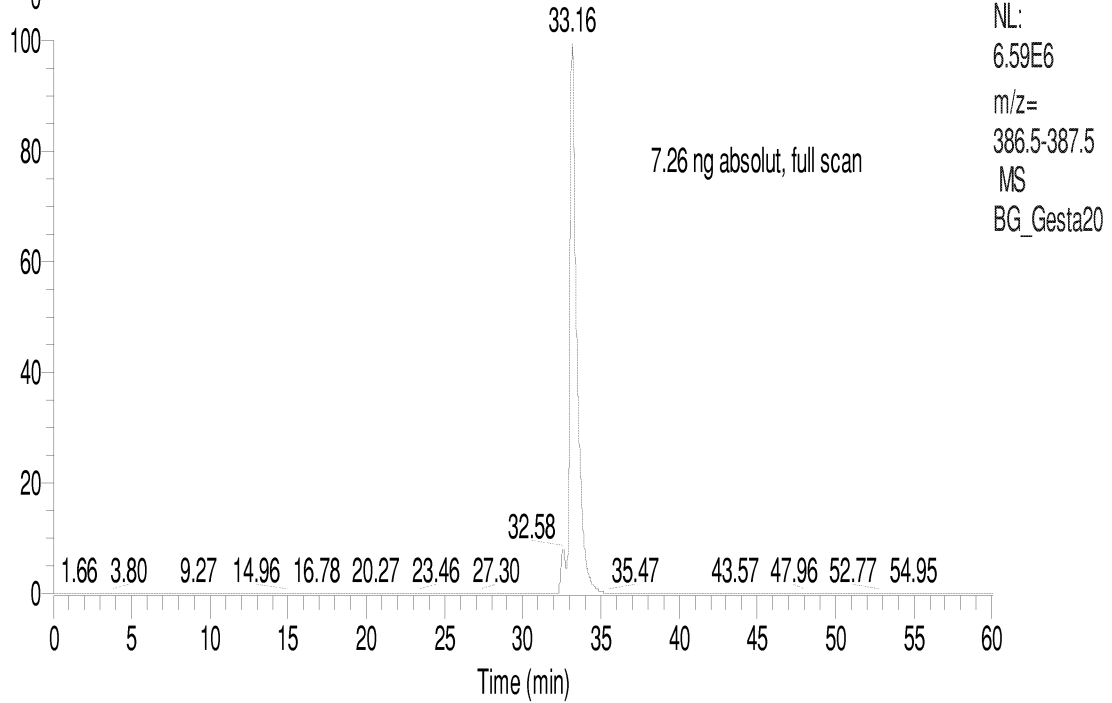
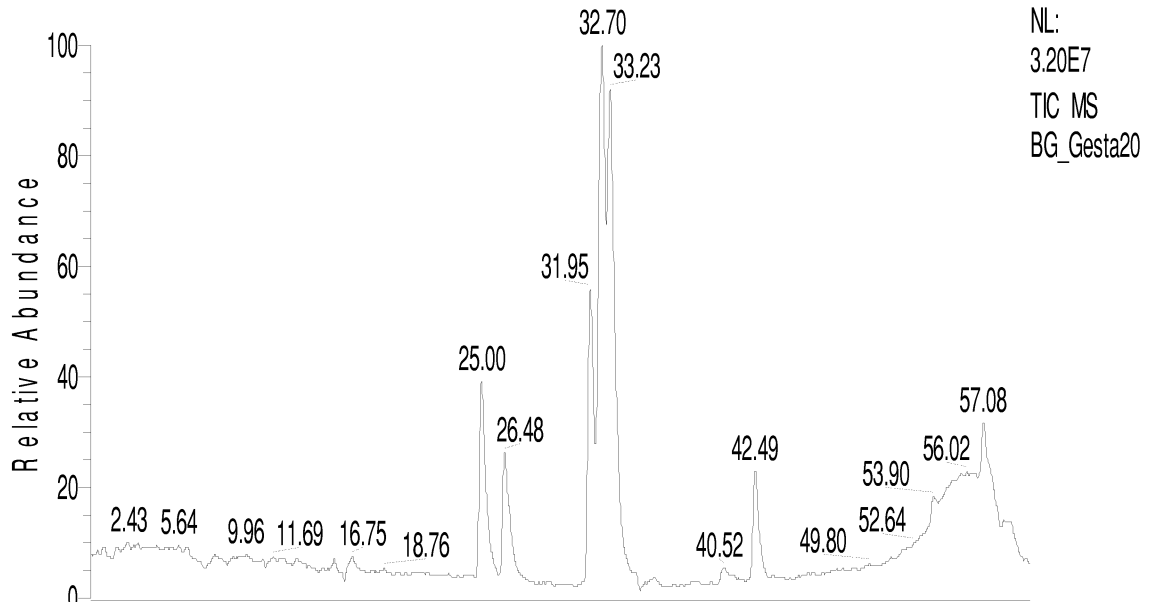
RP-HPLC/POS-ESIMS full scan von 8 oral aktiven Gestagenen (Ion Trap)
 Cyproteron Acetat

RT: 0.00 - 60.02 SM: 15G



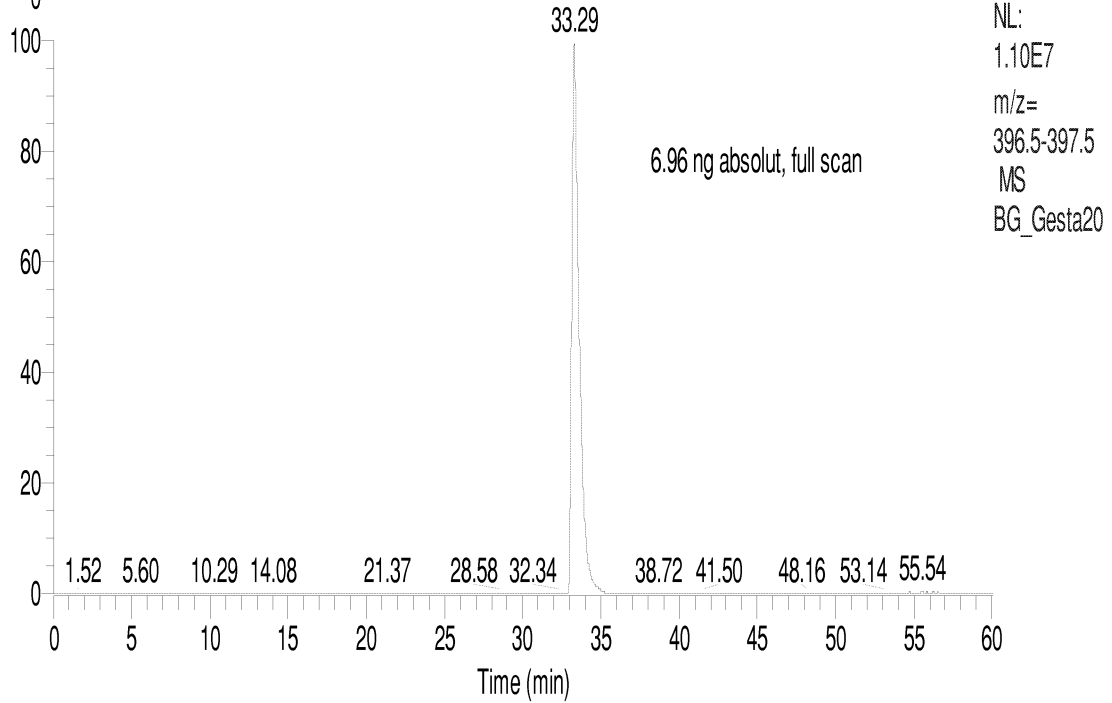
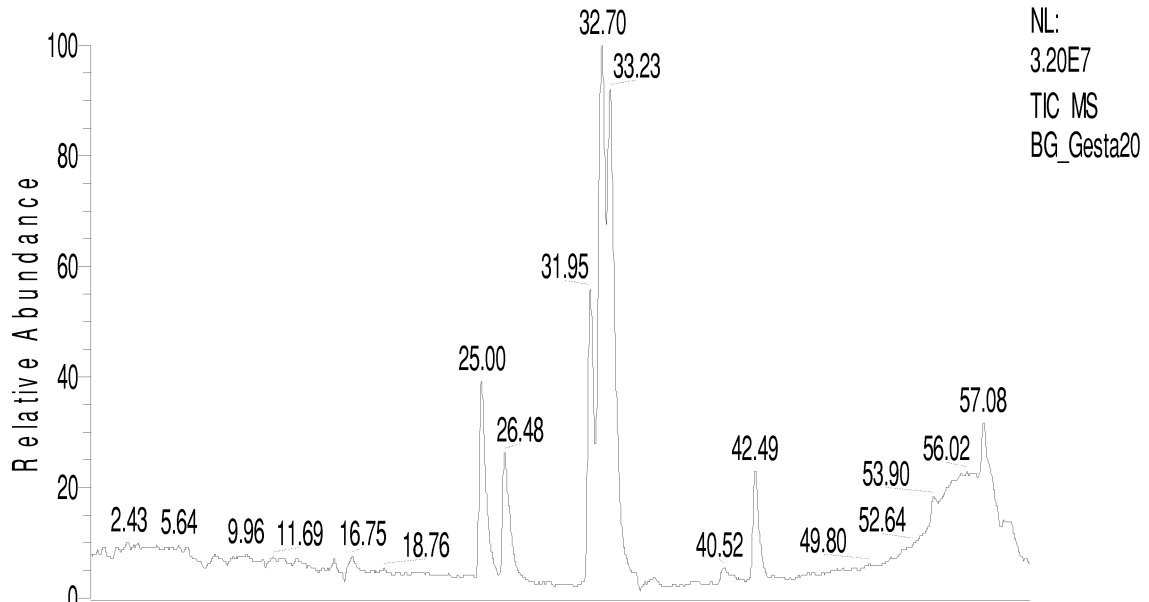
RP-HPLC/POS-ESIMS full scan von 8 oral aktiven Gestagenen (Ion Trap)
 Chlormadinon Acetat

RT: 0.00 - 60.02 SM: 15G



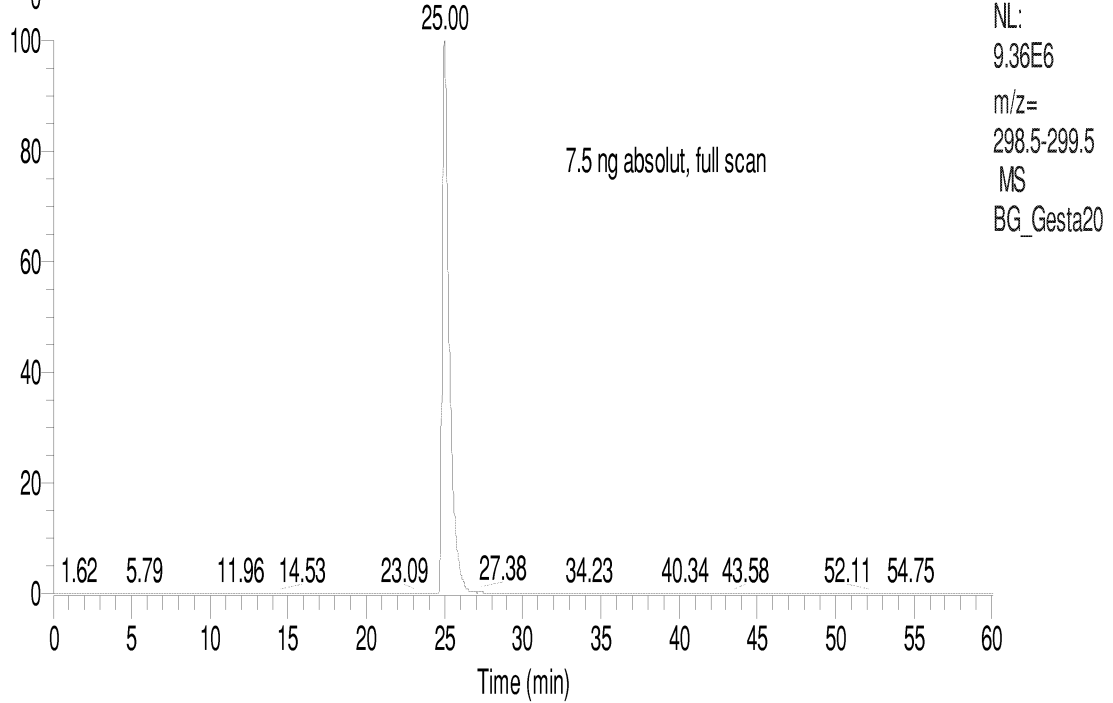
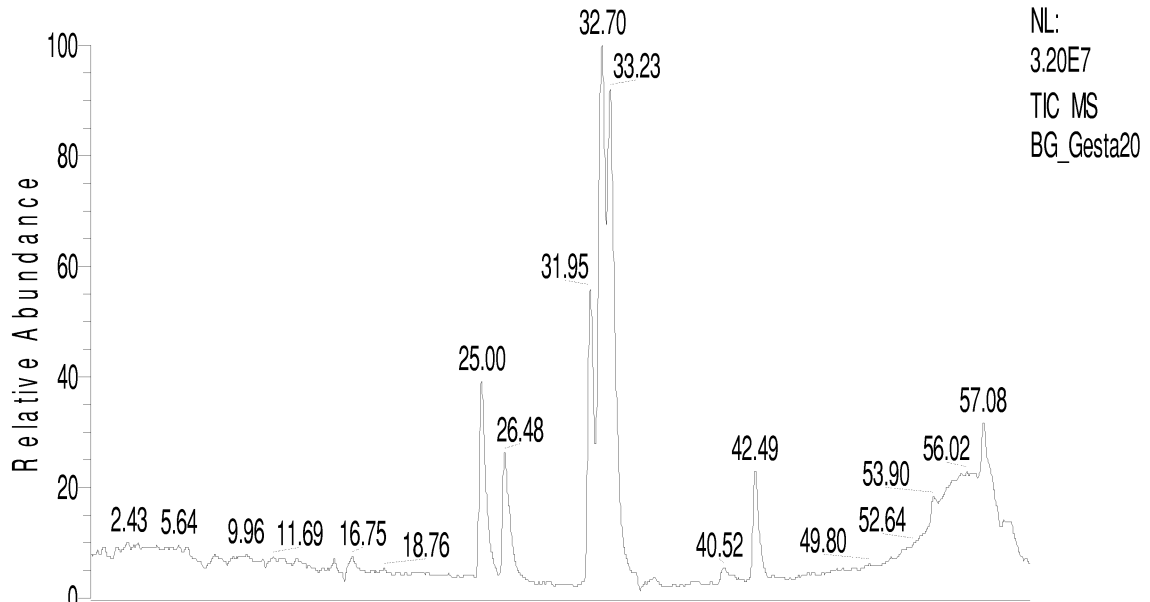
RP-HPLC/POS-ESIMS full scan von 8 oral aktiven Gestagenen (Ion Trap)
 Medroxyprogesteron Acetat

RT: 0.00 - 60.02 SM: 15G



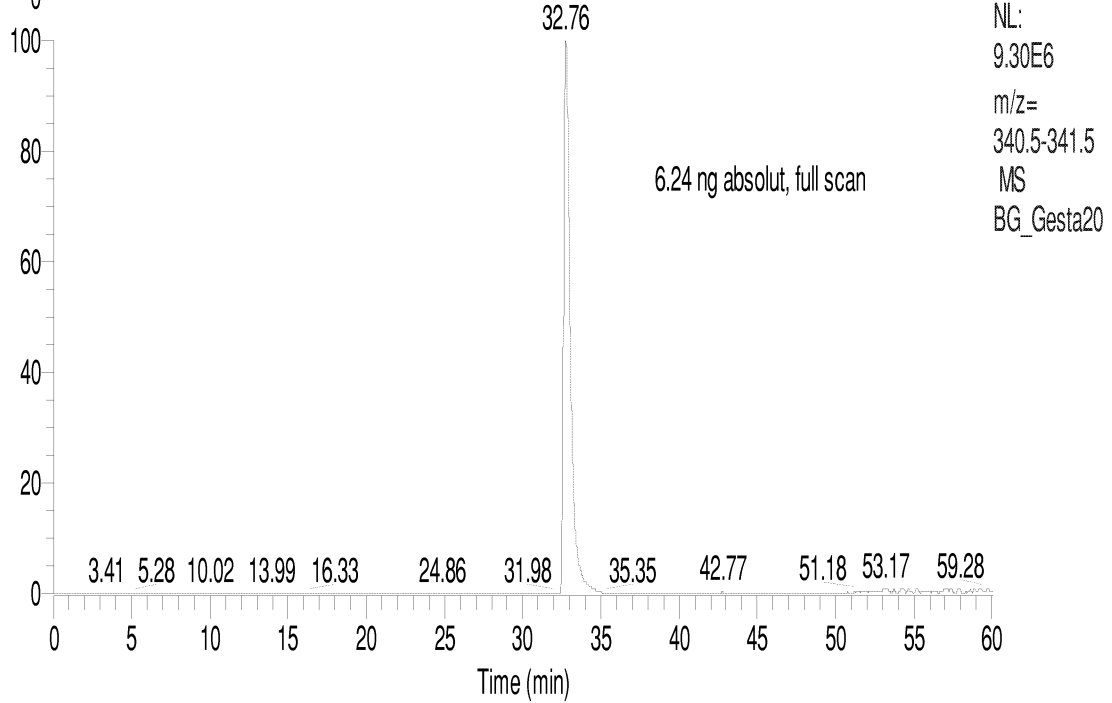
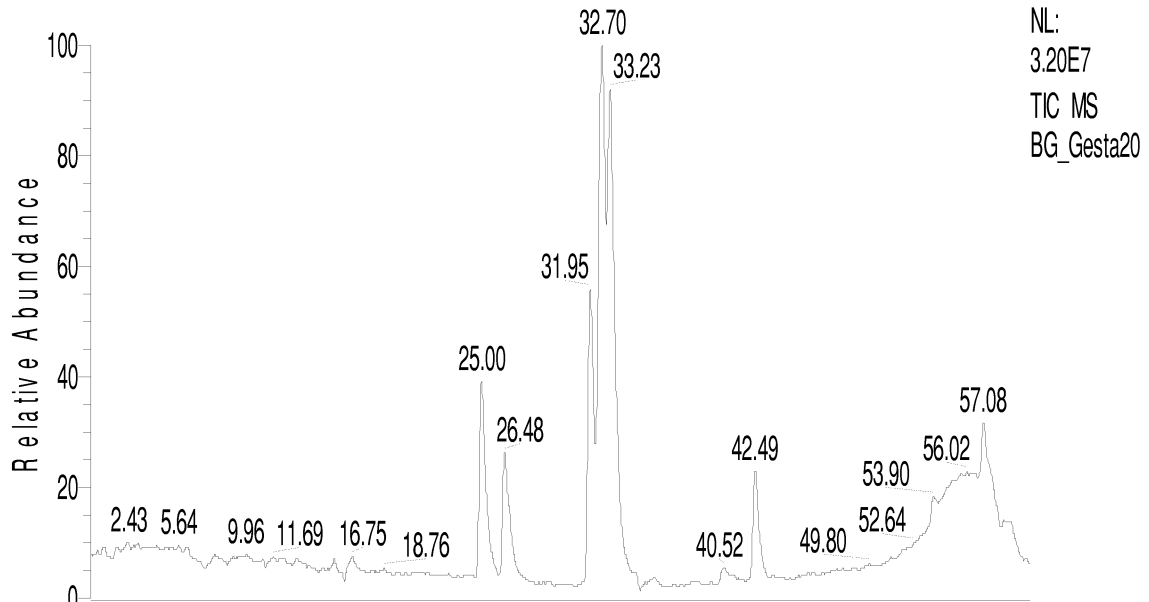
RP-HPLC/POS-ESIMS full scan von 8 oral aktiven Gestagenen (Ion Trap)
 Melengestrol Acetat

RT: 0.00 - 60.02 SM: 15G



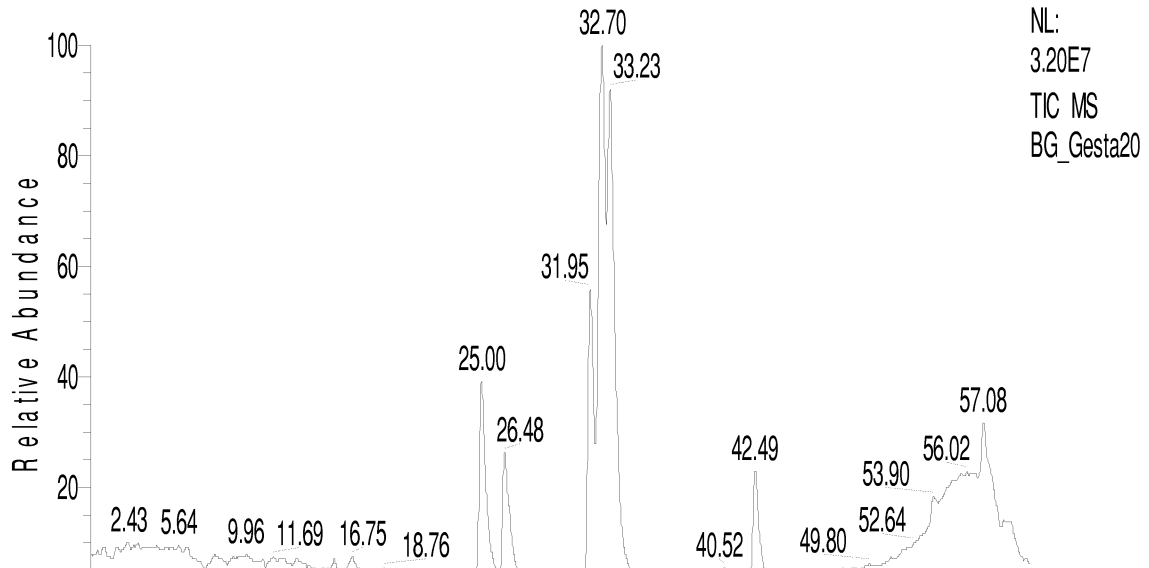
RP-HPLC/POS-ESIMS full scan von 8 oral aktiven Gestagenen (Ion Trap)
 Norethindron

RT: 0.00 - 60.02 SM: 15G

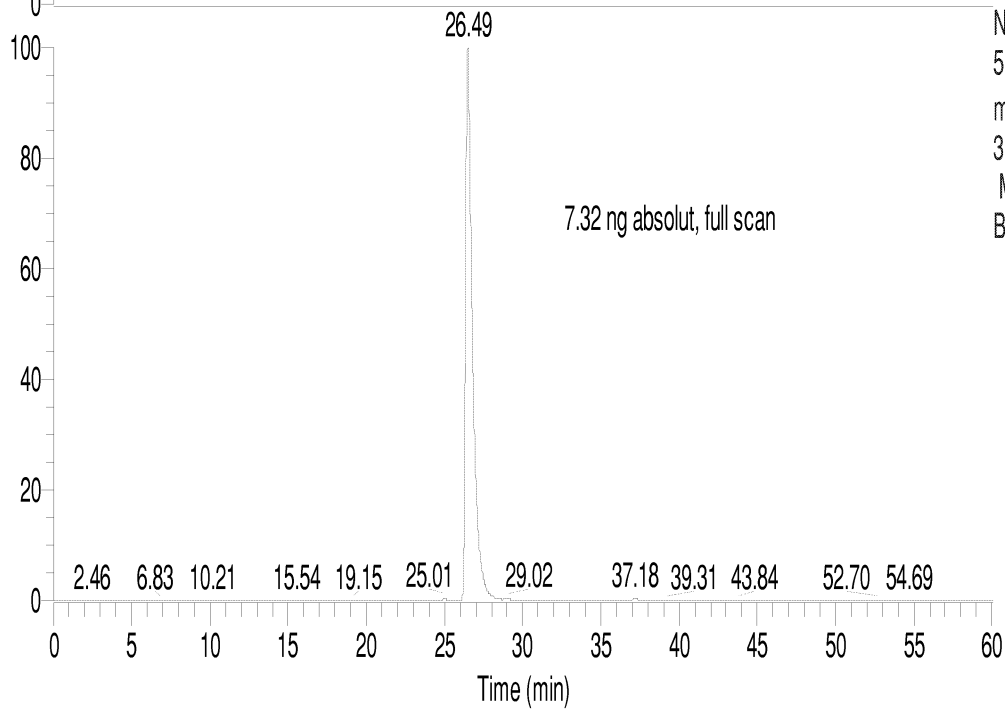


RP-HPLC/POS-ESIMS full scan von 8 oral aktiven Gestagenen (Ion Trap)
 Norethindron Acetat

RT: 0.00 - 60.02 SM: 15G



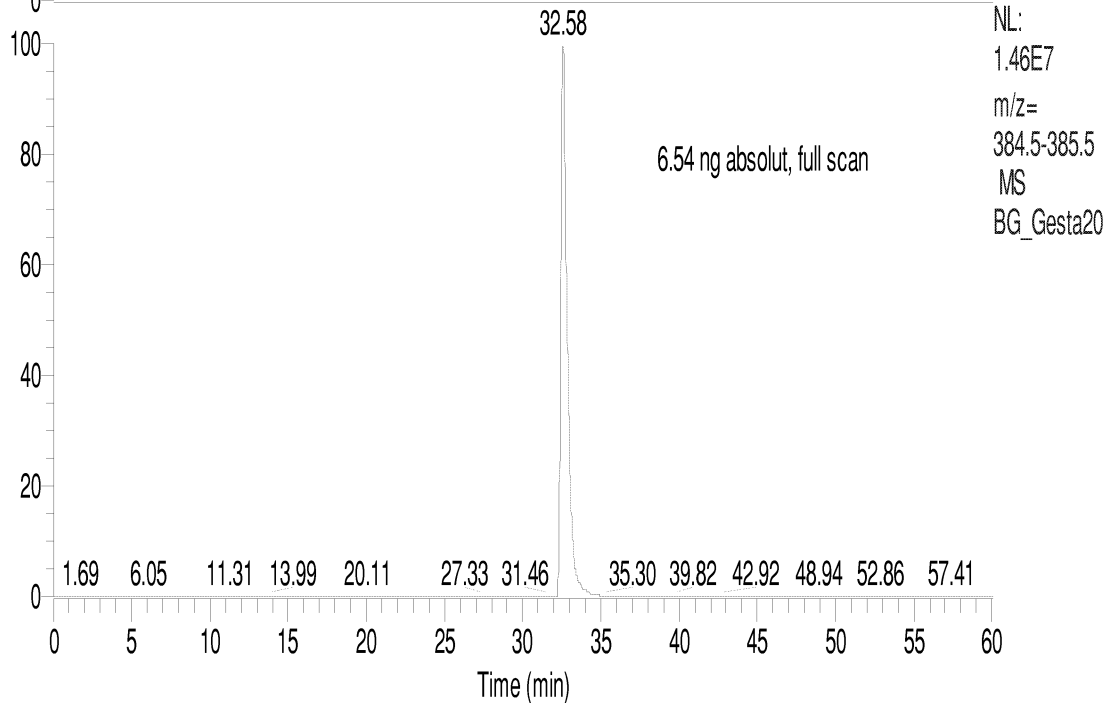
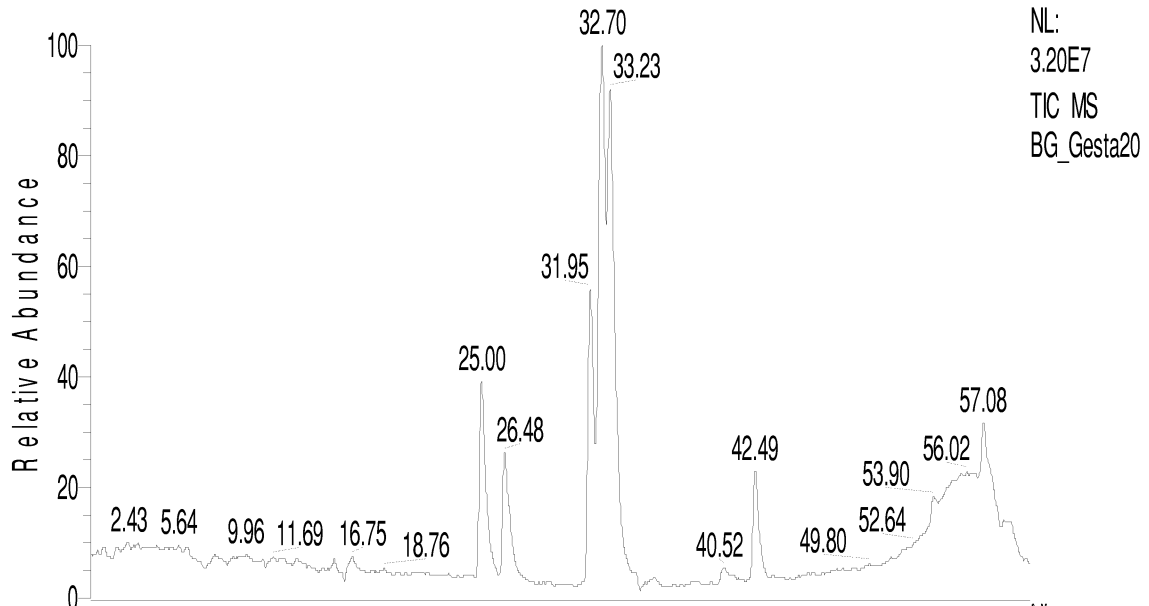
NL:
 3.20E7
 TIC MS
 BG_Gesta20



NL:
 5.96E6
 m/z=
 312.5-313.5
 MS
 BG_Gesta20

RP-HPLC/POS-ESIMS full scan von 8 oral aktiven Gestagenen (Ion Trap)
 Ethisteron

RT: 0.00 - 60.02 SM: 15G



RP-HPLC/POS-ESIMS full scan von 8 oral aktiven Gestagenen (Ion Trap)
 Ethynodiol Diacetat

22. Methodenvalidierung

22.1 Zusammenfassung

Folgende Hormone wurden aus Futtermittelmischungen (etwa 30% Fettanteil) mittels HPLC/MS und HPLC/MSn nach einer mehrstufigen Extraktion bestimmt:

Equilenin, Equilin, Estrone, Estradiol, Estriol, Ethinylestradiol, Dienestrol, Diethylstilbestrol, Hexestrol, Zeranol (neg-ESI) sowie Cyproteron Acetat, Megestrol Acetat, Medroxyprogesteron Acetat, Chlormadinon Acetat, Ethisteron, Norethindron Acetat, Melengestrol Acetat und Ethynodiol Diacetat (pos-ESI).

Die Bestimmungsgrenze wurde bei 10ppb, die Detektionsgrenze bei 3-5ppb bestimmt.

Die Methoden wurde für alle Analyten in einem Bereich von 10ppb bis 100ppb kalibriert.

Die Daten aus den Validierungsexperimenten zeigen, dass die Methoden geeignet sind, um angeführte Analyten aus Futtermittelproben mittleren Fettgehaltes zu bestimmen.

22.2 Einleitung

Projekt Identifizierung

22.2.1 Art der Untersuchung:

Validierung der Methoden "Analytik von Steroidhormonen und nichtsteroidalen Hormonen (Stilbenen) in Futtermitteln"

22.2.2 Sponsor:

Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft
Umwelt und Wasserwirtschaft
1012 Wien, Stubenring 1

22.2.3 Analytisches Labor:

Dr. Walter Welz
Goreon, Bioanalytisches Laboratorium
Durisolstraße 7, 4600 Wels
Tel.: Int. + 7242/65810-510 Fax: Extension -512

22.2.4 Test-System:
Futtermittelmischungen

22.2.5 Analyten
Equilenin, Equilin, Estrone, Estradiol, Estriol, Ethinylestradiol,
Dienestrol, Diethylstilbestrol, Hexestrol, Zeranol (neg-ESI) sowie
Cyproteron Acetat, Megestrol Acetat, Medroxyprogesteron Acetat,
Chlormadinon Acetat, Ethisteron, Norethindron Acetat, Melengestrol
Acetat und Ethynodiol Diacetat (pos-ESI).

22.2.6 Verantwortlicher Analytiker:
Dr. W. Welz

22.2.7 Bericht:
Dr. W. Welz

22.3 Guidelines und Empfehlungen

Die Validierung der Methoden zum Projekt wurden nach den Empfehlungen der ICH und den Bestimmungen der Good Laboratory Practice ("OECD-Principles of Good Laboratory Practice (GLP)", adopted Paris, May 1992) durchgeführt.

23. Methoden

23.1 Chromatographisches System

Pumpe: HP-1090 quat. Pumpen System
Säule1: Spherisorb ODS2, 5 μ , 2.1mm x 200mm
Säule2: 5cm C18 Mikrosäule (ID 0.32):
Fluss: 0.3 ml/min (Säule1)
7 μ l/min (Säule2)

Mobile Phase:
Neg ESI A: Wasser
B: Acetonitril
Gradient: 25%-35% Acetonitril in 30 min

Mobile Phase:
Pos ESI A: 10mM Ammoniumacetat pH4
B: 835 mg Ammoniumacetat werden in 20 ml Wasser
vorgelöst. 500ml Acetonitril werden vorgelegt und die
Ammoniumacetatlösung zugegeben. Die Lösung wird

leicht trüb, nach kurzer Rührdauer jedoch wieder klar. Anschließend werden 2 ml Essigsäure zugegeben und kurz im Ultraschallbad behandelt. Die Lösung wird daraufhin wieder trüb. Unter Rühren werden dann langsam 10 ml Wasser zugegeben-die Lösung wird wieder klar.

Gradient: 20%B auf 100%B in 30 min

Temperatur: Raumtemperatur
Injekt. Vol.: 30 µl (Built-In HP-1090) bzw. 100nl manuell über Rotor dosierung
MS: Finnigan LCQ Classic Tandemmassenspektrometer
Daten System: X-Calibur, Version 1.2

24. Extraktion

24.1 Extraktion mit Acetonitril

Einwaage 2 x 5 g Probe in 100 ml Becherglas
Dotierung mit Standard, durchmischen
Extraktion mit 3 x 40 ml Acetonitril: 1 min Ultra Turax mit geringster Geschwindigkeit (gelber Bereich) und geradem 2cm Kopf
Filtration über Blaubandfilter, mit 3 x 5 ml Acetonitril nachwaschen
Zwischendurch immer etwas absetzen lassen

24.2 Ausschütteln mit Hexan oder Petrolbenzin (Entfettung)

Den Acetonitrilextrakt mit 2 x 60 ml n-Hexan oder Petrolbenzin in 250 ml Scheidetrichter ausschütteln
Acetonitril-Phase (unten) in 250 ml Spitzkolben ablassen, Hexanphase (Petrolbenzinphase) verwerfen

24.3 Dichlormethan (Chloroform) -Wasser - Verteilung Lösungsmittelwechsel

Einengen des Acetonitril am Rotationsverdampfer, Wasserbad ca. 60° C
5 ml Wasser zugeben
Acetonitril vollständig abrotieren, Wasser bleibt zurück

Letzte Reste von Acetonitril mit Stickstoff abblasen

24.4 Extraktion mit Dichlormethan (Chloroform)

Wasserphase mit 3 x 30 ml Dichlormethan in 100 ml Scheidetrichter ausschütteln

untere Phase (Dichlormethan, Chloroform) in 100 ml Erlenmeyer mit Schliff sammeln, Wasserphase verwerfen

einen Laborlöffel wasserfreies Na_2SO_4 zugeben, schütteln, über

Schwarzbandfilter in 100 ml Spitzkolben filtrieren, mit 2 x 5 ml Dichlormethan nachwaschen

Dichlormethan-Phase auf ca. 1 ml abrotieren

25. Festphasenextraktion

Säulchen: NH_2 -Phase, Vorkonditionierung mit 5ml n-Hexan und 5 ml Dichlormethan

Den Dichlormethanextrakt auf die SPE Säulchen überführen, Kolben mit 2 ml Dichlormethan nachwaschen, mit Elution beginnen. Nicht trockenlaufen lassen mit 10 ml Dichlormethan: iso-Propanol (2+1) weiter eluieren

Eluat in 25 ml Spitzkolben sammeln

Dichlormethan vollständig abrotieren, im Stickstoffstrom trocknen

Rückstand in 1 ml Acetonitril lösen (Vortex-Schüttler und 1min im Ultraschallbad)

in 2 ml Vial abfüllen, verschließen und beschriften

im Kühlschrank lagern (max. 14 Tage)

26. Fraktionierung mittels HPLC

Säule: Ultrasphere ODS 10 μ , 250 x 10 mm mit Vorsäule: C18 ODS, 4 x 3 mm
UV-Detektion bei 220 nm

Flussrate: 3 ml/min; 50% auf 60% Acetonitril in 15 min, dann 15 min auf 100%;
in 5

min auf 100 %TBME, in 5 min auf 100 % Acetonitril, 5 Min Postrun
Injektion des Standards zur Prüfung der HPLC-Bedingungen und zum Festlegen des Fensters, in dem fraktioniert wird. Das Chromatogramm wird ausgedruckt und mit Notizen zu Säule, Laufmittel, Analyt und allfälligen Besonderheiten versehen, abgelegt

Injektion: 2 x 231 μ l Probe über manuelles Einlassventil. (das größte Injection Loop hat ein Volumen von 231 μ l)

Fraktionierung 8 bis 16 Minuten in 50 ml Spitzkolben
Acetonitril/H₂O Phase abrotieren und Extrakt entsprechend der weiteren
Vorgangsweise lösen

27. Methodvalidierung

27.1 Eichgeraden

Die Linearität, Richtigkeit und Präzision der Futtermittlextraktion wurden über die Injektion von dotierten Proben ermittelt. Der Eichbereich wurde für alle Analyten auf 10ppb bis 100ppb festgelegt. Bei den rückgerechneten Konzentrationen wurden für die Richtigkeit $\pm 15 \%$ und für die Präzision 15% festgelegt. Am unteren Ende der Eichgeraden durften jedoch die Werte $\pm 20\%$ and 20% streuen.

27.2 QC Proben

Für jeden Analyten wurde ein 3-er Set von Qualitätskontrollproben nach den Eichgeraden, quasi als simulierte Echtproben analysiert. Die maximalen Abweichungen hinsichtlich der Richtigkeit wurden mit $\pm 20 \%$ festgelegt.

27.3 Quantifizierungslimit (LOQ)

Das Quantifizierungslimit wurde durch 10 Injektionen der untersten Konzentration, bei der noch ein S/N Verhältnis von 10:1 wiederholbar war, ermittelt. Dies war bei allen Substanzen bei einer Konzentration von 10ppb ermittelbar.

27.4 Detektionslimit (LOD)

Das Detektionslimit wurde durch 10 Injektionen der untersten Konzentration, bei der noch ein S/N Verhältnis von 3:1 wiederholbar war, ermittelt. Dies war bei allen Substanzen bei einer Konzentration von 3-5ppb ermittelbar.

27.5 Stabilität der Analyten

Die Stabilität der Analyten wurden in der Stocklösung bei 25°C und bei 4°C über 168 Stunden ermittelt, bei den Extrakten wurde die Stabilität im automatischen Probengeber auf die Dauer von 24 Stunden beobachtet.

27.6 Spezifität

Die Spezifität der Methode wurde durch Vergleich der analytischen Standardlösung, des dotierten Extraktes sowie eines Blindwertes untersucht. Folgende Parameter wurden während der Beurteilung beobachtet: MS und MS/MS Spektrum, Retentionszeit und die Abwesenheit von Interferenzen.

Im Wesentlichen kann davon ausgegangen werden, dass die Detektion mittels Tandemmassenspektrometrie ohnehin den höchsten Spezifitätswert beinhaltet.

27.7 Extraktionsausbeute

Die Ausbeuten hinsichtlich der Extraktion wurden bei 3 verschiedenen Konzentrationen mittels Vergleich zu den selben Konzentrationen in direkter Lösung ermittelt.

28. Kalkulation

28.1 Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad x \dots (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$$

n .. number of individual values

28.2 Standard Abweichung

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

28.3 Präzision

[Relative Standard Abweichung (R.S.D.)]

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

28.4 Lineare Regressions Analyse

Basierend auf individuellen Datenpaaren $(\frac{1}{x}, y)$ wurde nach folgendem Modell gerechnet:

$$\dot{y} = a_{yx} + b_{yx} * x$$

$$b_{yx} = \frac{\Sigma - \frac{1}{n} (\Sigma x)(\Sigma y)}{\Sigma x^2 - \frac{1}{n} (\Sigma x)^2}$$

$$a_{yx} = \frac{(\Sigma y)(\Sigma x^2) - (\Sigma x)(\Sigma xy)}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} = \frac{\Sigma y - b_{yx} \Sigma x}{n}$$

$$r = \frac{\Sigma xy - \frac{1}{n} (\Sigma x)(\Sigma y)}{\sqrt{\left[\Sigma x^2 - \frac{1}{n} (\Sigma x)^2 \right] \left[\Sigma y^2 - \frac{1}{n} (\Sigma y)^2 \right]}}$$

(r .. Korrelationskoeffizient)

29. Ergebnisse und Diskussion

29.1 Allgemeine Aspekte

Bei der hohen Selektivität der MS-Detektion ist besonders in Futtermittelproben kaum mit Interferenzen zu rechnen. Die Aufreinigung (Entfettung) ist daher kein wesentliches Kriterium und muss allenfalls nicht erschöpfend durchgeführt werden. Hinsichtlich der Stabilität der Ausbeuten muss jedoch der Extraktionsprozess gründlich durchgeführt werden. Auch das Nachspülen der Filter und Extraktionsgefäße sowie der Festphasensäulchen ist gründlich durchzuführen, da bei geringen Analytkonzentrationen mit Substanzverlusten gerechnet werden muss. Die Stabilität des Systems hinsichtlich der chromatographischen Parameter (Fluss, Gradient etc.) ist kaum von Bedeutung, sodass geringe Veränderungen keine Störfaktoren bei der Quantifizierung darstellen. Hinsichtlich der Stabilität der Stocklösungen ist eine jeweils frische Zubereitung nach mind. 2 Tagen (4°C) durchzuführen.

29.2 Eichgeraden

Im anschließenden Teil der graphischen Darstellungen und Tabellen sind die Eichgeraden für alle Substanzen aufgelistet. Im Eichbereich zwischen 10ppb und 100ppb lag die Richtigkeit der rückgerechneten Konzentrationen zwischen -18.49 und 19.27, die Präzision lag zwischen 0.07 und 10.16.

Die in den Akzeptanzkriterien festgesetzten Grenzen (Richtigkeit $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ bei untersten Eichpunkten) und Präzision 15% wurden erreicht und die Ergebnisse zeigen, dass die Methode in diesen Bereichen zufriedenstellend arbeitet.

29.3 Quantifizierungslimit (LOQ)

Das Quantifizierungslimit wurde bei allen Substanzen mit 10 ppb und einem S/N- Verhältnis von 10:1 festgelegt. Die Akzeptanzkriterien wurden gleich wie die rückgerechneten niedrigsten Eichpunkte bearbeitet. Die Tabellen zeigen, dass alle Wiederholungsinjektionen entsprechen (Richtigkeit -12.5 - - 0.26, sowie Präzision 3.9 – 9.8).

29.4 Detektionslimit (LOD)

Das Detektionslimit wurde durch Wiederholungsinjektionen über das S/N – Verhältnis festgestellt. Zwischen 3ppb und 5ppb konnte bei allen Substanzen das Kriterium mind. 3:1 ermittelt werden. Aufgrund der bereits stark schwankenden Quantifizierungsergebnisse wurde auf eine statistische Auswertung im Sinne Richtigkeit und Präzision verzichtet.

29.5 Stabilität der Analyten

Ein wesentliches Validierungsexperiment war die Überprüfung der Stabilität der Analyten in den Lösungen, die zur Eichung eingesetzt wurden. Dabei hat sich herausgestellt, dass über einen Zeitraum von 168 Stunden bei Raumtemperatur die Lösungen nur begrenzt stabil waren. Obwohl eine Kühlung auf 4°C leichte Verbesserungen in der Stabilität bewirkten, kann davon ausgegangen werden, dass nach etwa 48 Stunden die Eich- und Prüflösungen jeweils neu angesetzt werden sollen. Weiters war abzuklären, wie sich die Stabilität im Autosampler der HPLC (unter der Annahme einer 24 Stunden andauernden Analysenzeit = etwa 100 Proben) verhält. Interessanterweise war die Lösung der Analyten in diesem Zeitraum (mobile Phase) mit durchaus akzeptierbaren Verlusten im Bereich der validen Ergebnisse, was wiederum bedeutet, dass ein Analysenset von etwa 100 Proben durchaus unbedenklich auszuwerten ist. Es ist anzunehmen, dass bei der Quantifizierung, die durch Probendotation

vorgenommen wird, die Dotation im selben Ausmaß der Stabilität unterworfen ist wie der reale Gehalt an Analyten. Diese Tatsache gibt zusätzliche Sicherheit im Sinne der richtigen Quantifizierung.

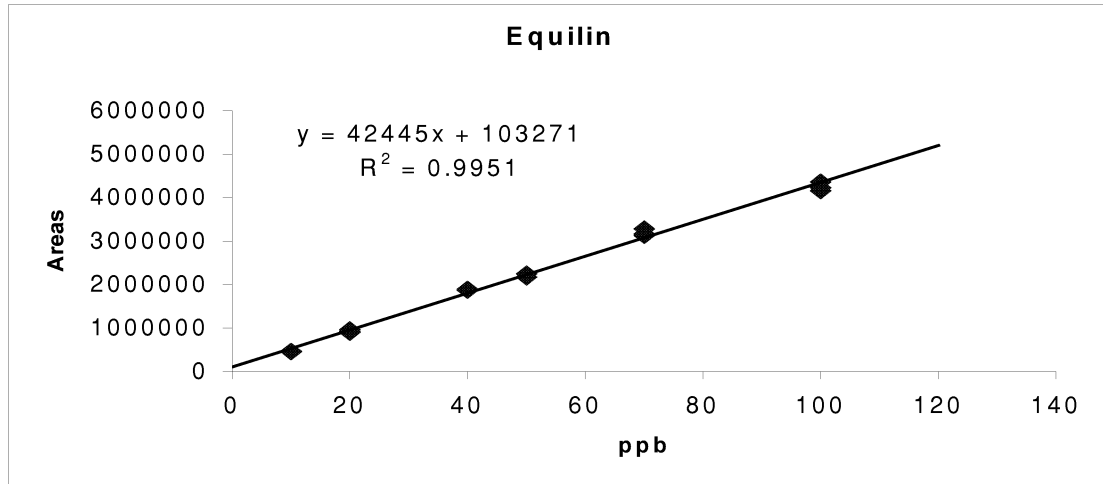
29.6 Spezifität

Die Spezifität des Systems konnte über Standardsubstanzen, charakteristische MS und MS/MS Spektren sowie über die Stabilität der Retentionszeiten eindeutig bewiesen werden. In keinem Falle der Extraktion konnten Störfaktoren aus der Matrix beobachtet werden.

29.7 Extraktionsausbeute

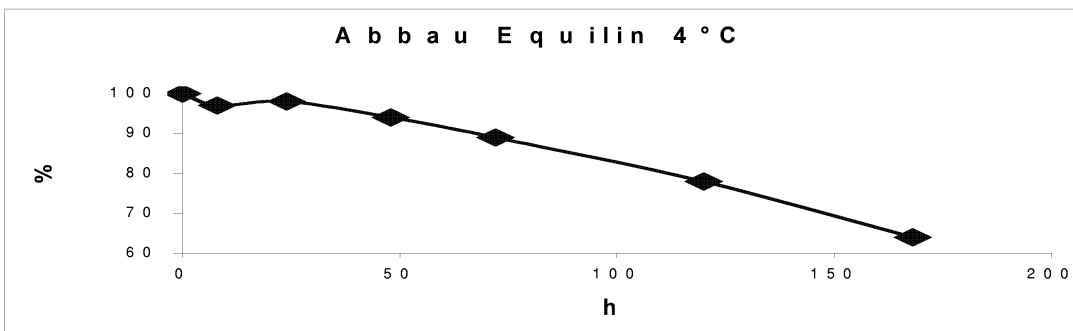
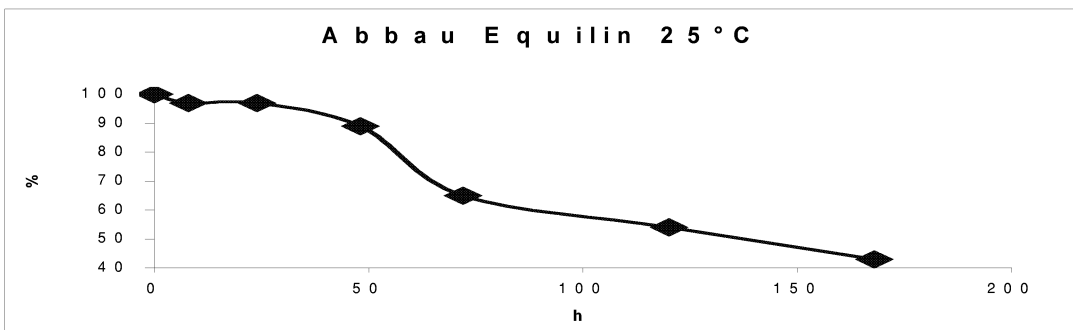
Die Extraktionsausbeuten lagen zwischen 67% für Chlormadinon Acetat (10ppb) und 91% für Equilenin (100ppb). Innerhalb der einzelnen Dotierungsmengen und Substanzen waren sie jedoch stabil. Naturgemäß finden sich bei den niedrigsten Konzentrationen relativ gesehen die größten Verluste und umgekehrt. Durch intensive Extraktion können sowohl die Ausbeute als auch die relevante Konstanz innerhalb der Analyten erheblich verbessert werden.

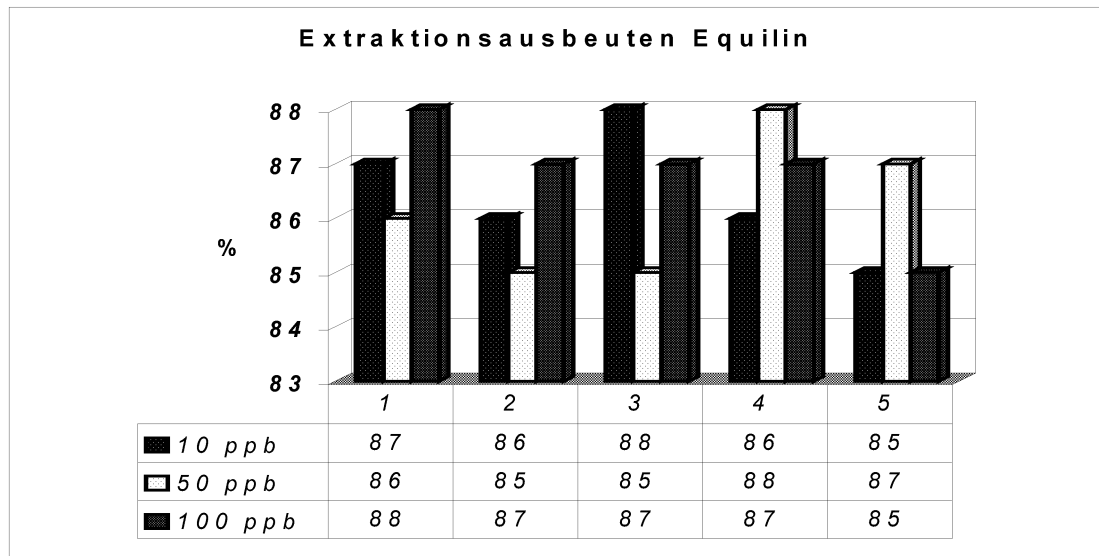
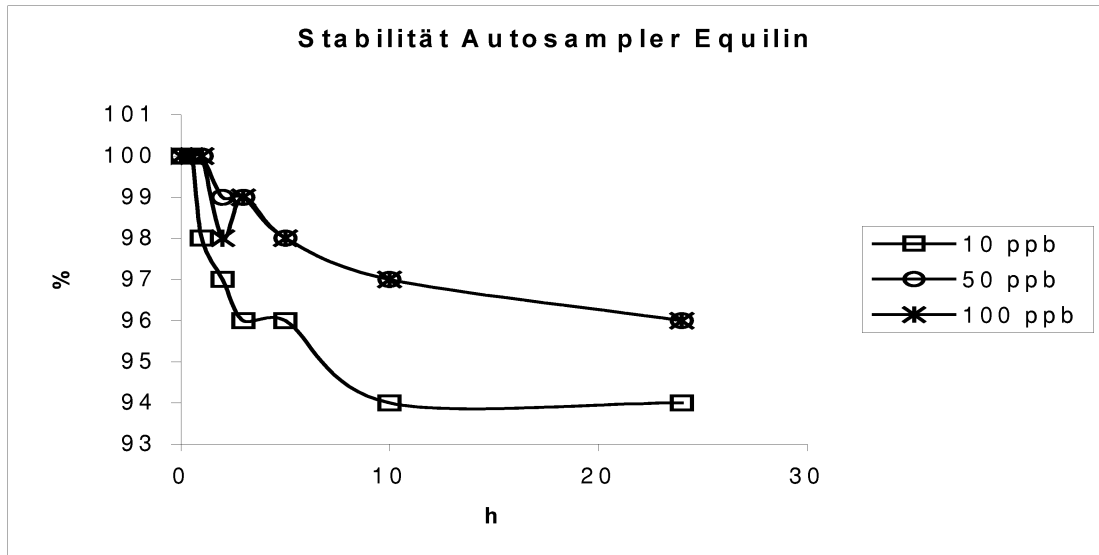
30. Tabellen, Graphiken, Diagramme



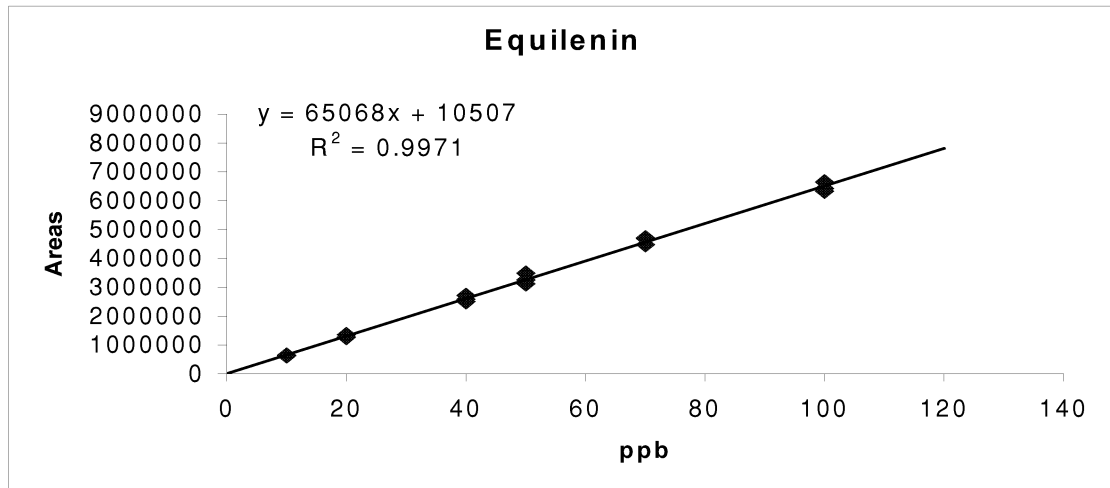
Equilin					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	458346	8.37	8.38	-16.18	2.38
10	467844	8.59			
10	450963	8.19			
20	963888	20.28	19.44	-2.78	3.96
20	899367	18.76			
20	922567	19.30			
40	1863528	41.47	41.89	4.72	0.94
40	1896733	42.25			
40	1883452	41.94			
50	2246358	50.49	49.87	-0.27	2.09
50	2168935	48.67			
50	2244376	50.44			
70	3281563	74.88	72.78	3.97	2.58
70	3128346	71.27			
70	3166834	72.18			
100	4228347	97.19	97.64	-2.36	2.43
100	4356388	100.20			
100	4157999	95.53			

Equilin Qualifier Set 1			Equilin Qualifier Set 1			Equilin Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	9.25	-7.5	10.0	10.30	3.0	10.0	10.05	0.5
50.0	50.45	0.9	50.0	51.00	2.0	50.0	47.18	-5.6
100.0	98.00	-2.0	100.0	99.00	-1.0	100.0	96.15	-3.8
10.0	10.12	1.2	10.0	10.45	4.5	10.0	8.95	-10.5
50.0	51.00	2.0	50.0	52.00	4.0	50.0	48.35	-3.3
100.0	98.70	-1.3	100.0	99.30	-0.7	100.0	91.00	-9.0
10.0	9.03	-9.7	10.0	9.11	-8.9	10.0	8.99	-10.1
50.0	48.95	-2.1	50.0	49.99	0.0	50.0	49.00	-2.0
100.0	97.18	-2.8	100.0	101	1.0	100.0	89.9	-10.1



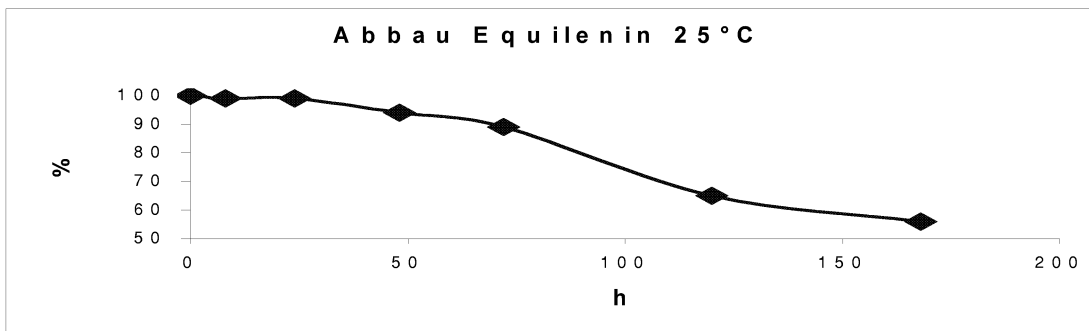
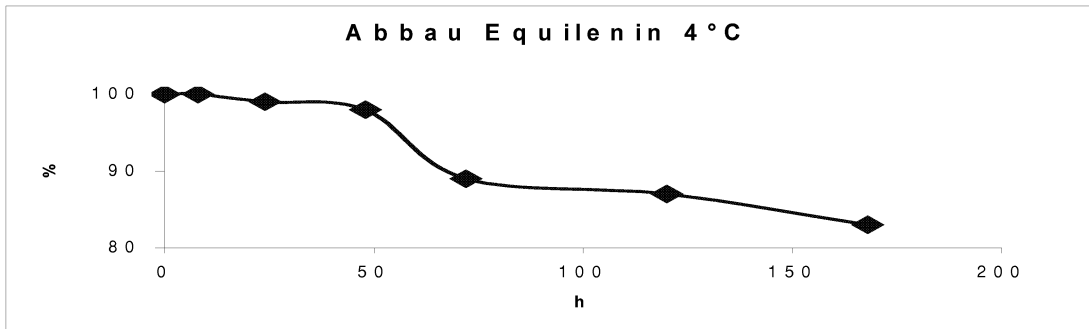


Quantifizierungslimit(LOQ) Equilin		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	8.97	11
10 ppb	9.16	12
10 ppb	9.35	10
10 ppb	8.94	10
10 ppb	9.6	12
10 ppb	9.45	11
10 ppb	8.77	13
10 ppb	8.34	13
10 ppb	9.55	11
10 ppb	9.19	12
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.132	-8.68	4.269229893

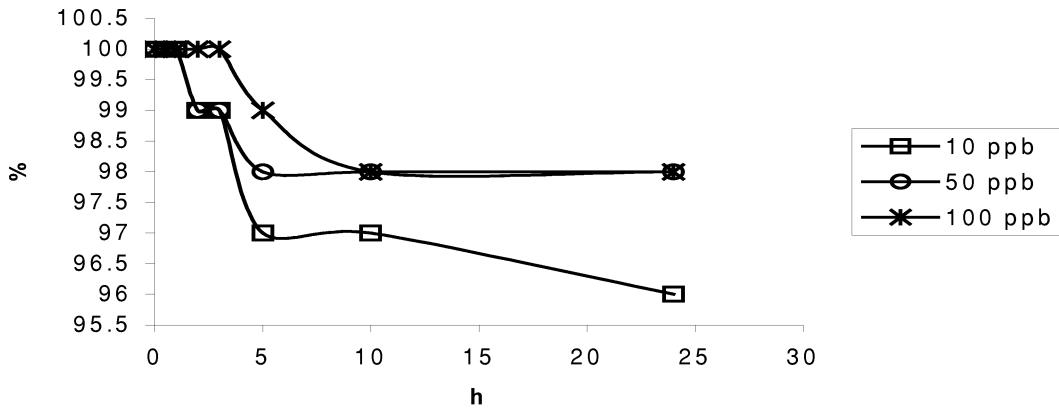


Equilenin					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	651348	9.85	9.72	-2.78	1.63
10	631548	9.54			
10	646338	9.77			
20	1282016	19.54	19.86	-0.71	3.51
20	1271243	19.38			
20	1354683	20.66			
40	2581435	39.51	39.81	-0.48	4.14
40	2716359	41.58			
40	2504733	38.33			
50	3256882	49.89	50.40	0.80	5.57
50	3125973	47.88			
50	3486625	53.42			
70	4710023	72.22	70.93	1.33	2.78
70	4478326	68.66			
70	4689225	71.91			
100	6423551	98.56	99.28	-0.72	2.54
100	6335298	97.20			
100	6652976	102.09			

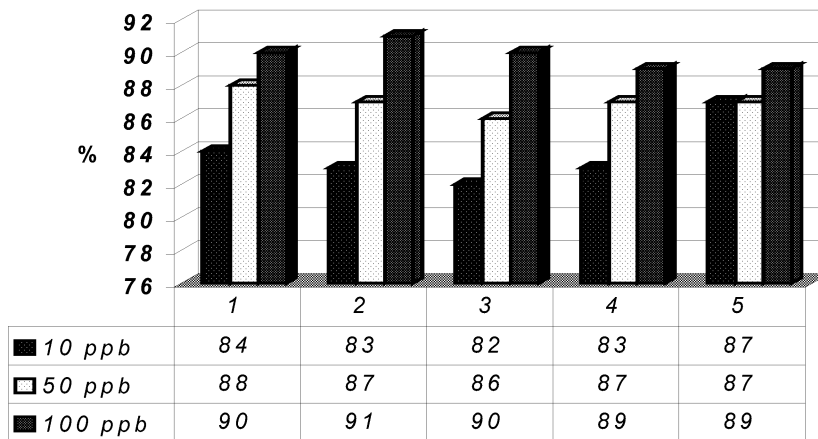
Equilenin Qualifier Set 1			Equilenin Qualifier Set 1			Equilenin Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	10.00	0.0	10.0	8.56	-14.4	10.0	8.94	-10.6
50.0	49.10	-1.8	50.0	48.88	-2.2	50.0	48.65	-2.7
100.0	99.40	-0.6	100.0	93.80	-6.2	100.0	97.74	-2.3
10.0	9.20	-8.0	10.0	9.25	-7.5	10.0	9.64	-3.6
50.0	48.35	-3.3	50.0	49.90	-0.2	50.0	51.38	2.8
100.0	89.16	-10.8	100.0	98.67	-1.3	100.0	95.26	-4.7
10.0	8.76	-12.4	10.0	9.36	-6.4	10.0	8.95	-10.5
50.0	46.80	-6.4	50.0	51.40	2.8	50.0	52.07	4.1
100.0	91.4	-8.6	100.0	102.16	2.2	100.0	103.8	3.8



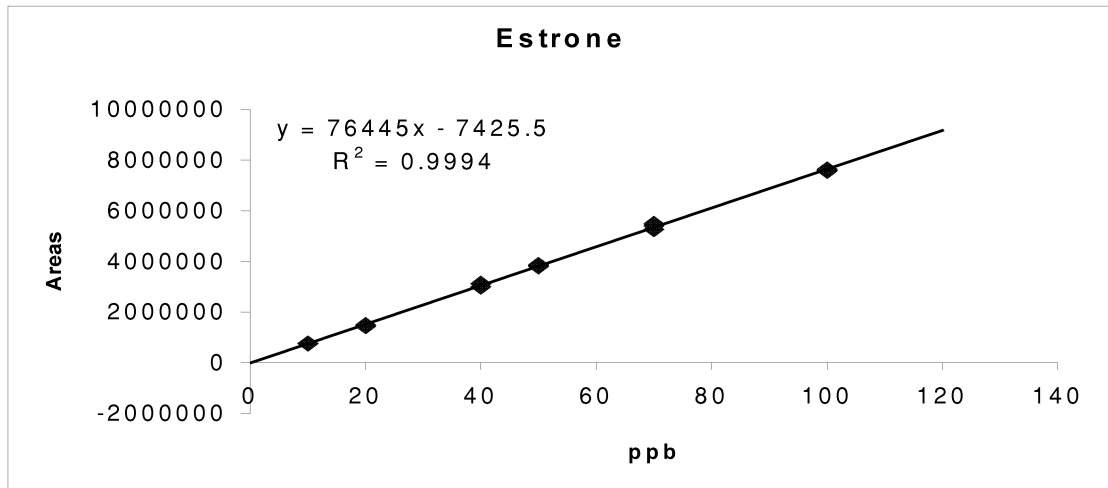
Stabilität Autosampler Equilenin



Extraktionsausbeuten Equilenin

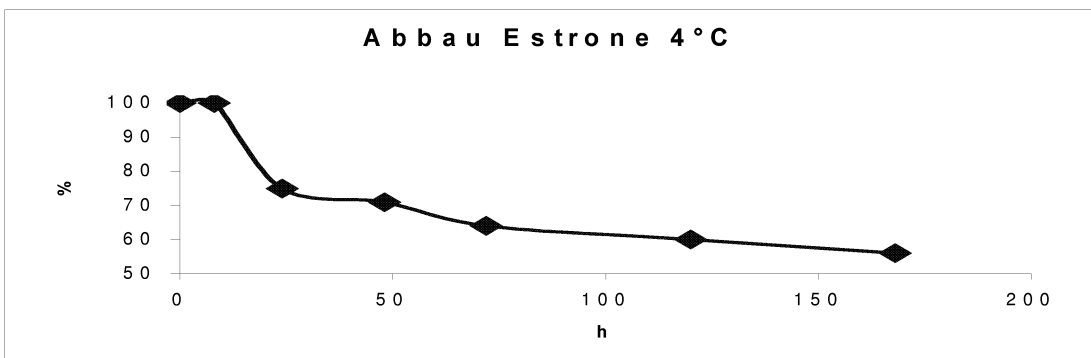
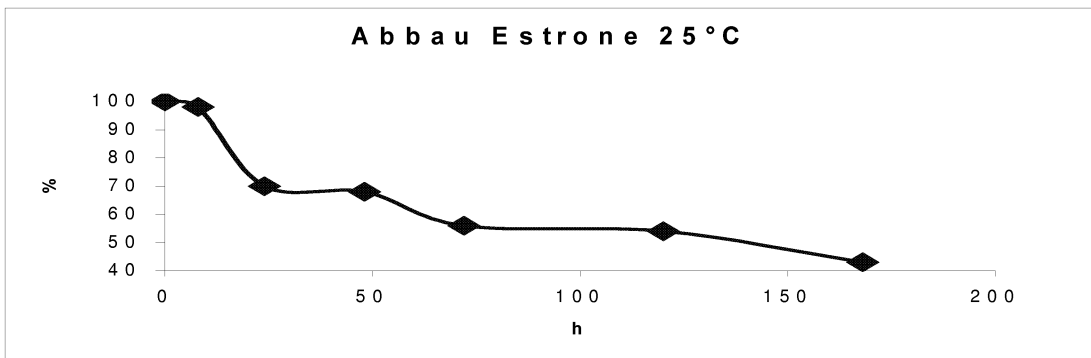


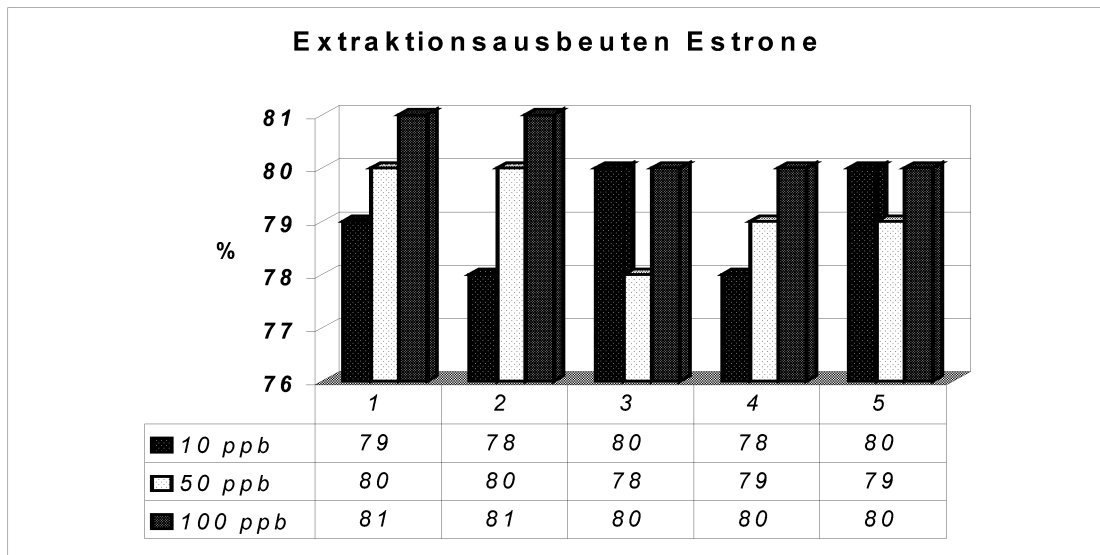
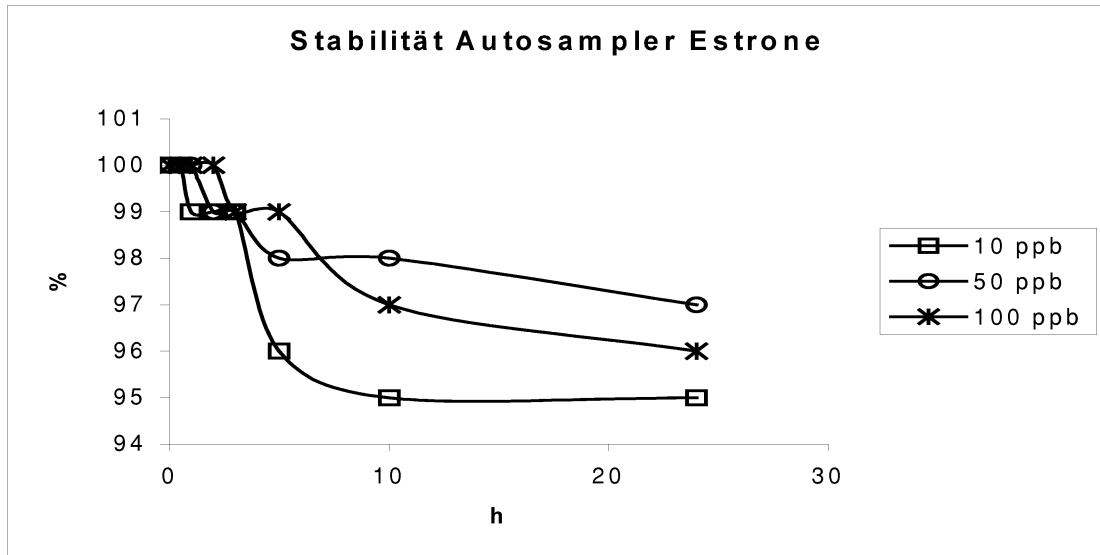
Quantifizierungslimit(LOQ) Equilenin		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	10.09	12
10 ppb	9.89	14
10 ppb	9.59	10
10 ppb	9.85	10
10 ppb	9.70	14
10 ppb	9.76	13
10 ppb	9.65	10
10 ppb	9.71	11
10 ppb	9.21	10
10 ppb	8.76	12
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.622448875	-3.77551125	3.921020763



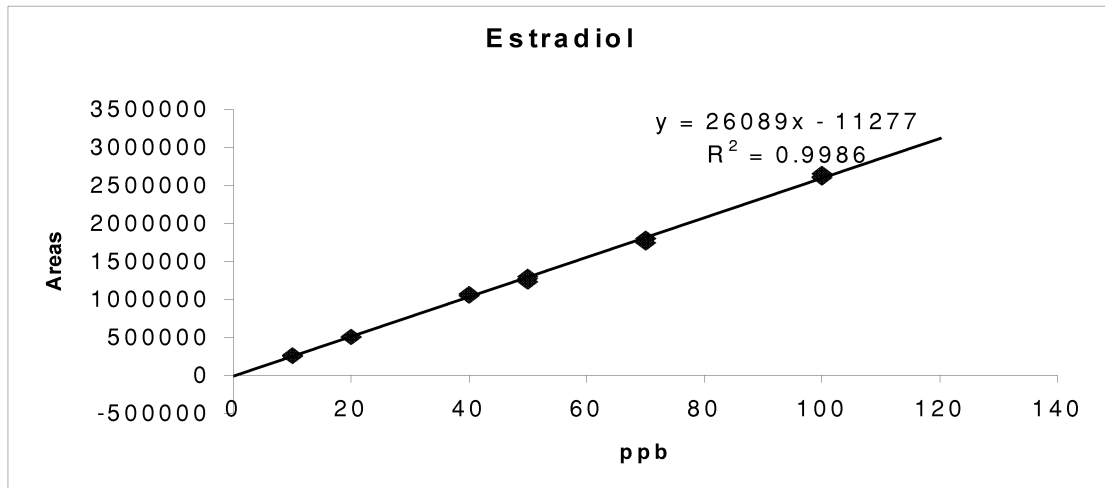
Estrone					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	762346	10.07	9.97	-0.29	0.88
10	752438	9.94			
10	749599	9.90			
20	1488359	19.57	19.38	-3.11	2.41
20	1433275	18.85			
20	1500366	19.72			
40	3004388	39.40	40.38	0.95	2.11
40	3122438	40.94			
40	3111288	40.80			
50	3865428	50.66	50.28	0.57	0.88
50	3799533	49.80			
50	3844683	50.39			
70	5264389	68.96	70.51	0.73	2.05
70	5483499	71.83			
70	5400213	70.74			
100	7566438	99.08	99.48	-0.52	0.47
100	7635864	99.98			
100	7588634	99.37			

Estrone Qualifier Set 1			Estrone Qualifier Set 1			Estrone Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	8.88	-11.2	10.0	9.90	-1.0	10.0	10.45	4.5
50.0	47.73	-4.5	50.0	52.00	4.0	50.0	51.90	3.8
100.0	100.30	0.3	100.0	101.36	1.4	100.0	100.40	0.4
10.0	9.46	-5.4	10.0	10.89	8.9	10.0	8.75	-12.5
50.0	51.86	3.7	50.0	51.00	2.0	50.0	52.37	4.7
100.0	102.00	2.0	100.0	102.50	2.5	100.0	99.46	-0.5
10.0	11.00	10.0	10.0	10.75	7.5	10.0	11.01	10.1
50.0	50.34	0.7	50.0	52.27	4.5	50.0	49.20	-1.6
100.0	101.35	1.3	100.0	101.56	1.6	100.0	98.76	-1.2



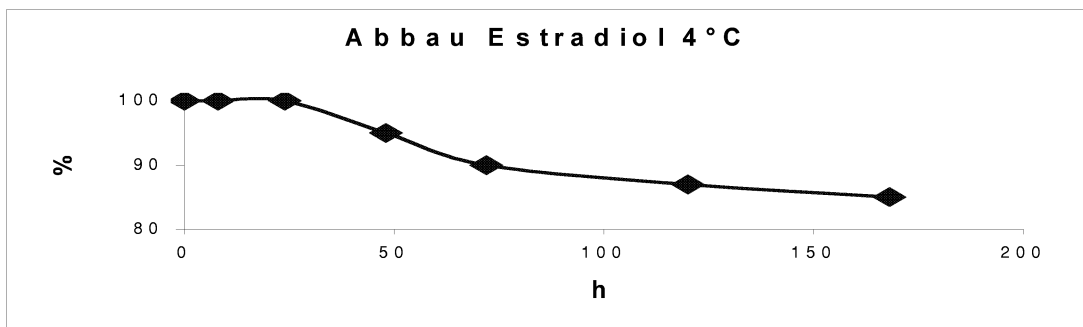
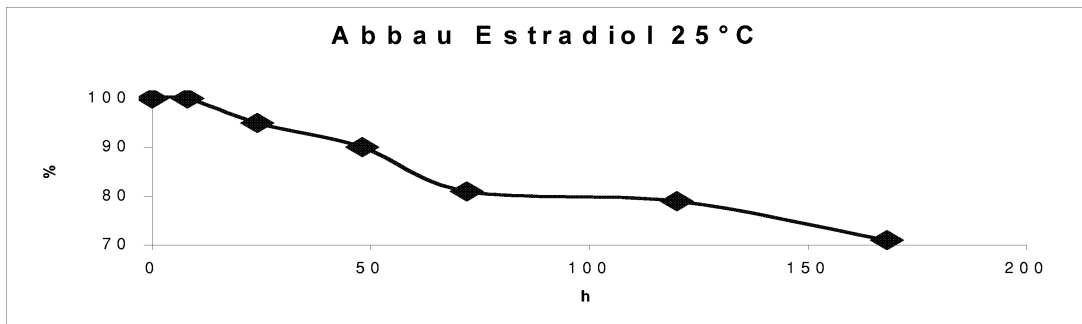


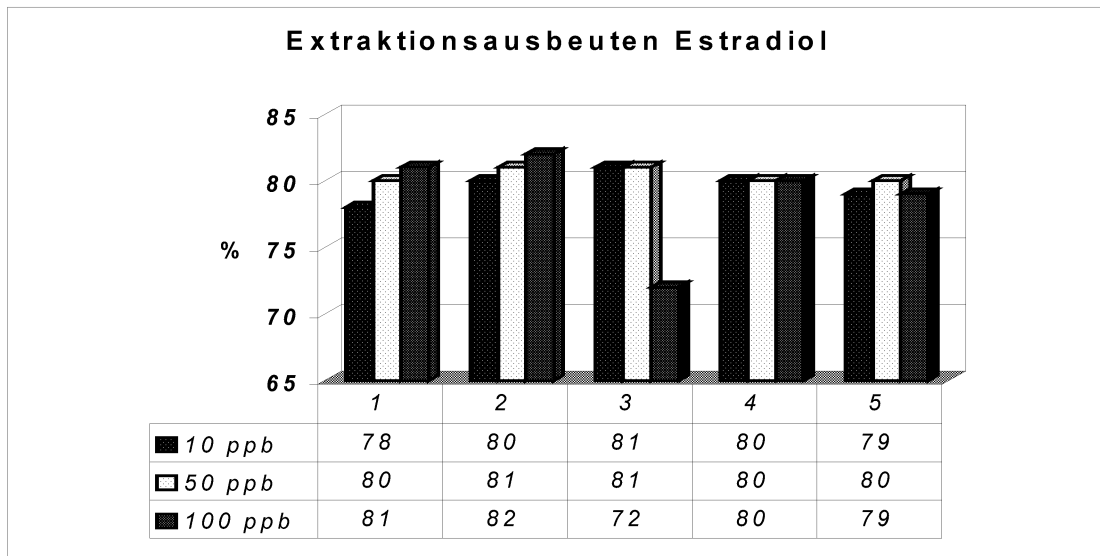
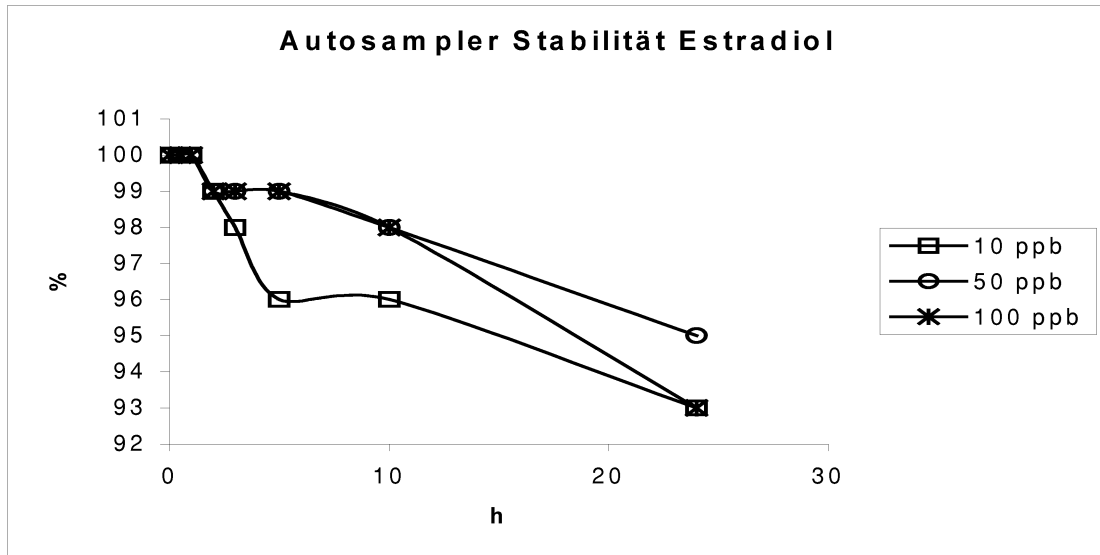
Quantifizierungslimit(LOQ) Estrone		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	8.29	14
10 ppb	9.69	15
10 ppb	10.78	14
10 ppb	8.92	17
10 ppb	8.93	13
10 ppb	8.22	14
10 ppb	9.20	16
10 ppb	9.59	14
10 ppb	9.21	15
10 ppb	9.45	13
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.227306865	-7.72693135	7.975357978



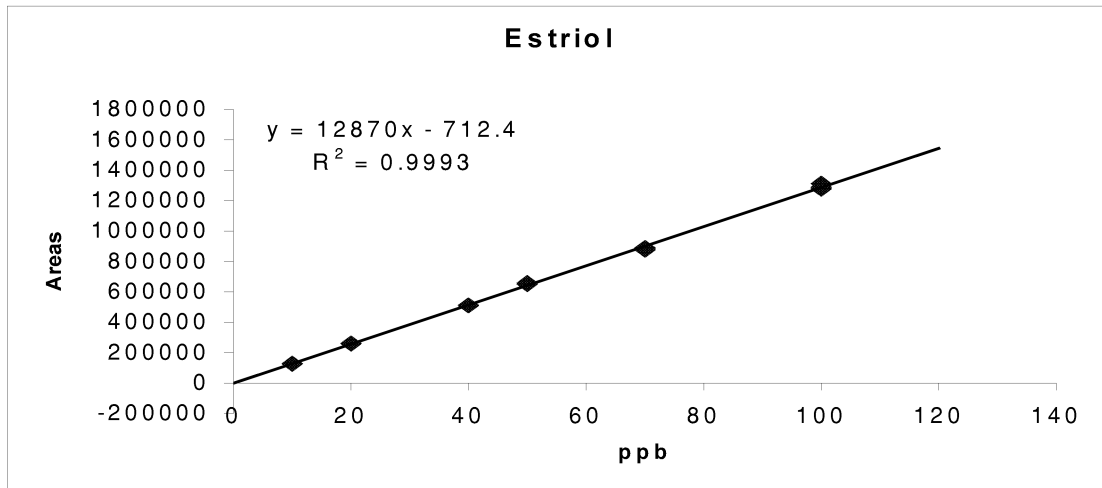
Estradiol					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	253468	10.15	10.38	3.83	2.40
10	266438	10.64			
10	258894	10.36			
20	510666	20.01	19.87	-0.64	0.70
20	503422	19.73			
20	507396	19.88			
40	1048355	40.62	41.01	2.53	1.22
40	1073346	41.57			
40	1054386	40.85			
50	1273428	49.24	49.04	-1.91	2.67
50	1299543	50.24			
50	1231689	47.64			
70	1804536	69.60	68.76	-1.78	1.88
70	1799356	69.40			
70	1743627	67.27			
100	2653769	102.15	100.93	0.93	1.08
100	2599346	100.07			
100	2612345	100.56			

Estradiol Qualifier Set 1			Estradiol Qualifier Set 1			Estradiol Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	8.57	-14.3	10.0	9.43	-5.7	10.0	9.56	-4.4
50.0	51.00	2.0	50.0	51.30	2.6	50.0	50.05	0.1
100.0	102.47	2.5	100.0	101.67	1.7	100.0	94.51	-5.5
10.0	9.55	-4.5	10.0	9.99	-0.1	10.0	10.04	0.4
50.0	47.59	-4.8	50.0	47.97	-4.1	50.0	47.85	-4.3
100.0	99.00	-1.0	100.0	98.31	-1.7	100.0	97.90	-2.1
10.0	9.43	-5.7	10.0	11.30	13.0	10.0	8.99	-10.1
50.0	48.57	-2.9	50.0	53.27	6.5	50.0	47.32	-5.4
100.0	95.69	-4.3	100.0	102.3	2.3	100.0	93.5	-6.5



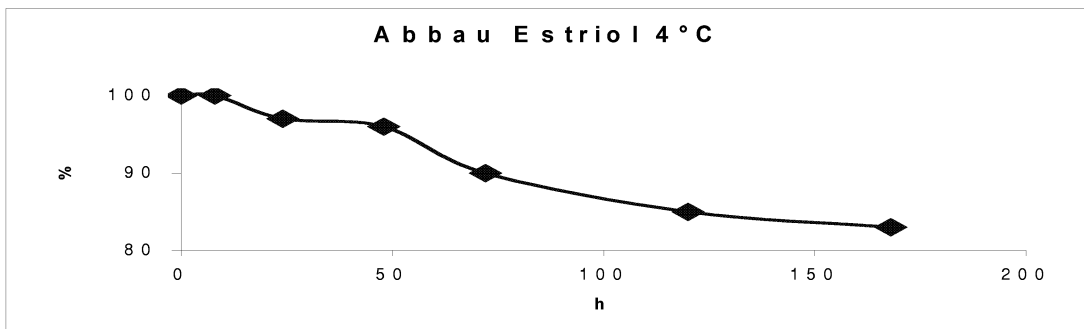
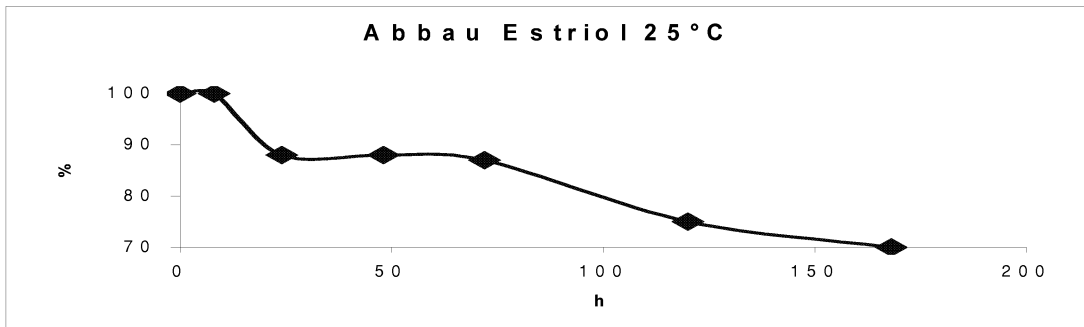


Quantifizierungslimit(LOQ) Estradiol		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	9.53	11
10 ppb	9.29	19
10 ppb	9.57	12
10 ppb	10.25	13
10 ppb	11.42	15
10 ppb	9.71	17
10 ppb	9.88	10
10 ppb	9.87	15
10 ppb	10.09	13
10 ppb	10.14	13
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.975370464	-0.246295359	5.906902818

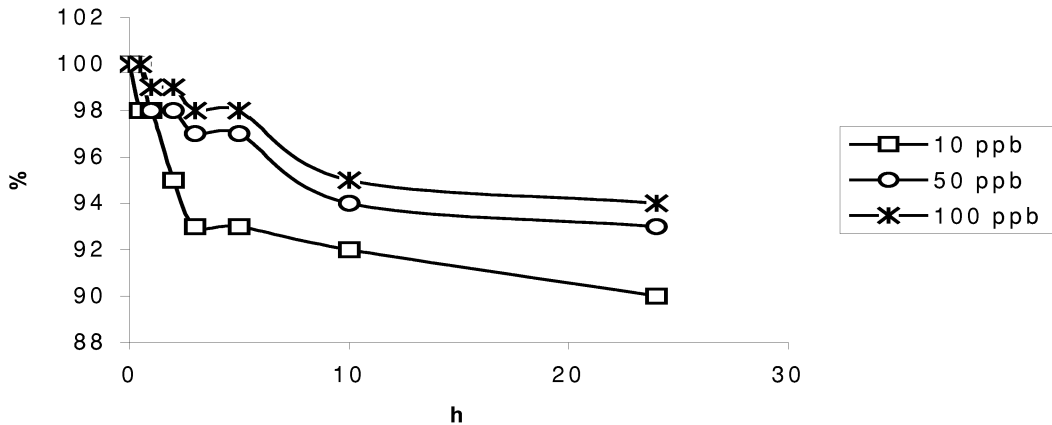


Estriol					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	127300	9.95	9.95	-0.47	0.46
10	126843	9.91			
10	128016	10.00			
20	260142	20.27	20.22	1.09	0.29
20	258677	20.15			
20	259633	20.23			
40	510769	39.74	39.72	-0.70	0.20
40	511358	39.79			
40	509375	39.63			
50	651242	50.66	50.79	1.59	0.58
50	650389	50.59			
50	657396	51.14			
70	890345	69.24	68.80	-1.72	0.89
70	888136	69.06			
70	875693	68.10			
100	1311536	101.96	100.52	0.52	1.32
100	1277856	99.34			
100	1289514	100.25			

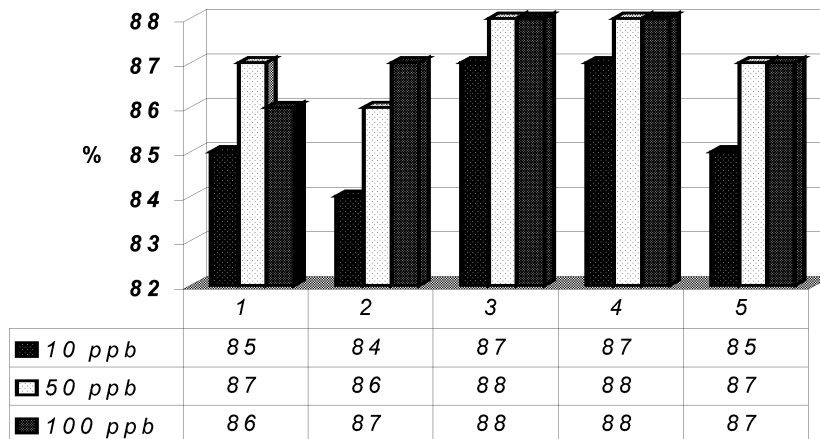
Estriol Qualifier Set 1			Estriol Qualifier Set 1			Estriol Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	9.46	-5.4	10.0	8.87	-11.3	10.0	9.54	-4.6
50.0	51.00	2.0	50.0	48.53	-2.9	50.0	51.10	2.2
100.0	99.43	-0.6	100.0	94.58	-5.4	100.0	98.98	-1.0
10.0	10.01	0.1	10.0	10.94	9.4	10.0	8.94	-10.6
50.0	50.44	0.9	50.0	51.48	3.0	50.0	48.66	-2.7
100.0	97.56	-2.4	100.0	102.40	2.4	100.0	101.32	1.3
10.0	8.99	-10.1	10.0	8.86	-11.4	10.0	9.03	-9.7
50.0	51.49	3.0	50.0	46.70	-6.6	50.0	48.00	-4.0
100.0	98.74	-1.3	100.0	89.7	-10.3	100.0	96.59	-3.4



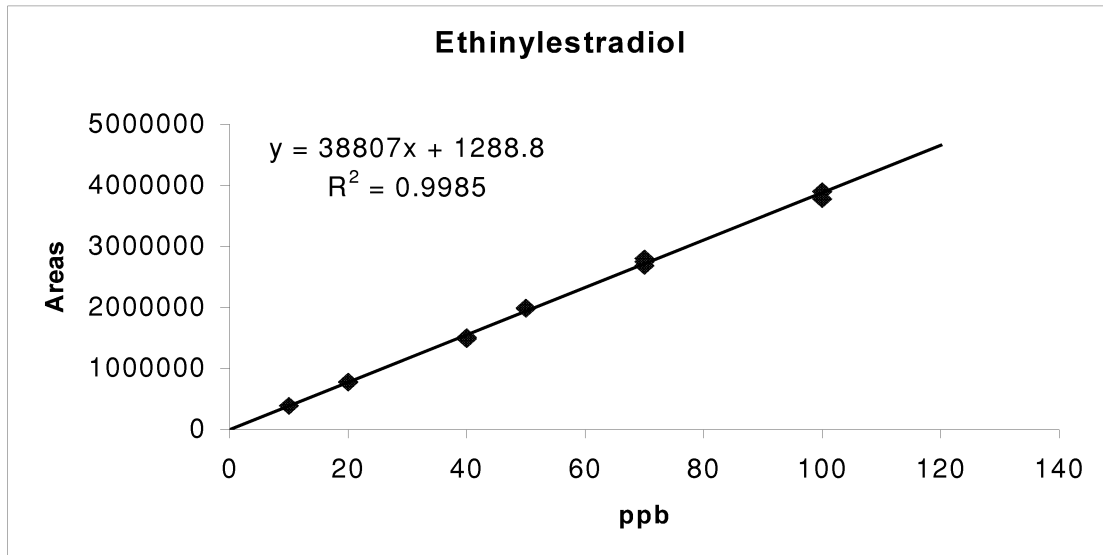
Autosampler Stabilität Estriol



Extraktionsausbeuten Estriol

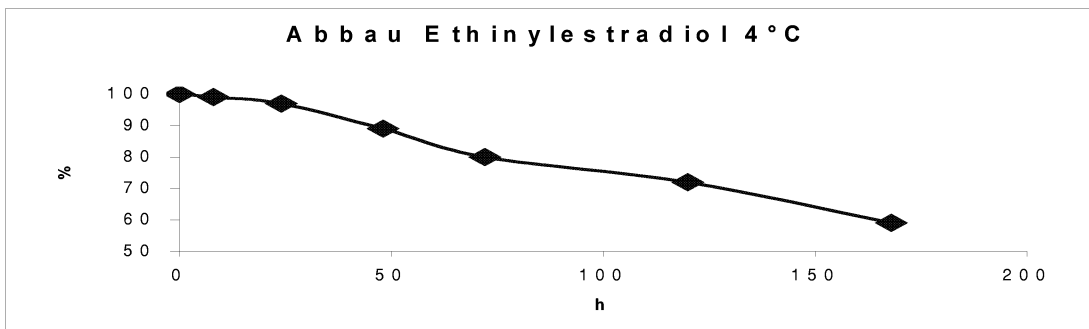
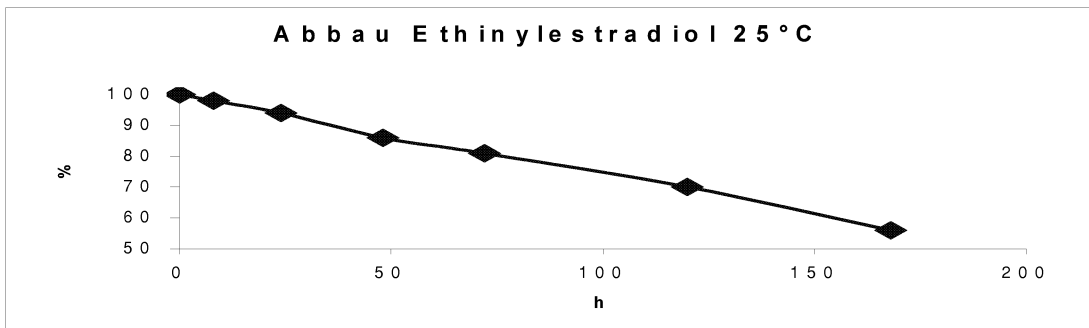


Quantifizierungslimit(LOQ) Estriol		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	9.44	10
10 ppb	9.02	13
10 ppb	9.01	13
10 ppb	10.15	12
10 ppb	10.27	15
10 ppb	9.49	16
10 ppb	9.42	10
10 ppb	8.65	11
10 ppb	9.72	11
10 ppb	9.78	12
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.495132056	-5.048679443	5.368986279

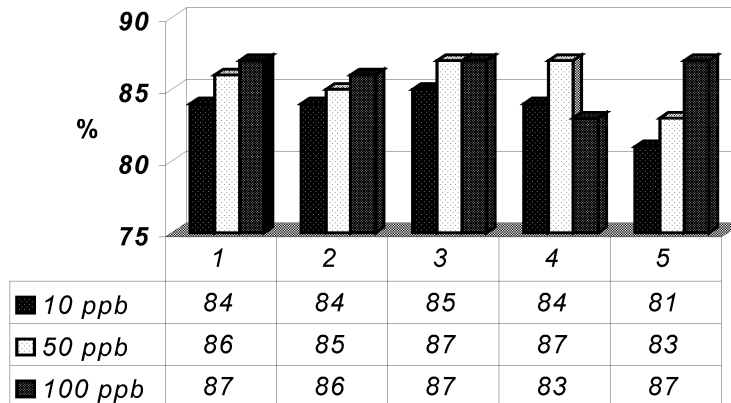


Ethinylestradiol					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	388458	9.98	9.98	-0.24	0.48
10	390261	10.02			
10	386512	9.93			
20	780269	20.07	20.02	0.08	0.89
20	783599	20.16			
20	770321	19.82			
40	1486358	38.27	38.61	-3.47	0.88
40	1512866	38.95			
40	1499658	38.61			
50	1988375	51.20	51.26	2.52	0.43
50	2000125	51.51			
50	1983356	51.07			
70	2685355	69.16	70.71	1.01	2.15
70	2803444	72.21			
70	2746899	70.75			
100	3902756	100.54	99.43	-0.57	1.85
100	3899247	100.44			
100	3777566	97.31			

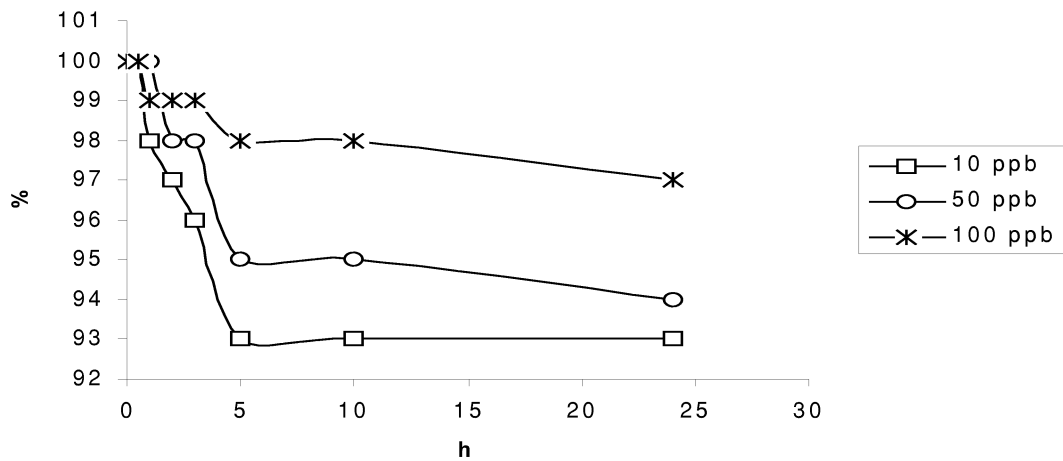
Ethinylestradiol Qualifier Set 1			Ethinylestradiol Qualifier Set 1			Ethinylestradiol Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	11.43	14.3	10.0	9.56	-4.4	10.0	10.23	2.3
50.0	50.00	0.0	50.0	49.76	-0.5	50.0	52.00	4.0
100.0	103.43	3.4	100.0	101.20	1.2	100.0	102.00	2.0
10.0	9.56	-4.4	10.0	10.30	3.0	10.0	9.56	-4.4
50.0	50.32	0.6	50.0	53.05	6.1	50.0	48.80	-2.4
100.0	102.97	3.0	100.0	101.24	1.2	100.0	89.96	-10.0
10.0	8.96	-10.4	10.0	11.20	12.0	10.0	10.30	3.0
50.0	49.00	-2.0	50.0	52.10	4.2	50.0	51.11	2.2
100.0	97.44	-2.6	100.0	103	3.0	100.0	103.03	3.0



Extraktionsausbeuten Ethinylestradiol

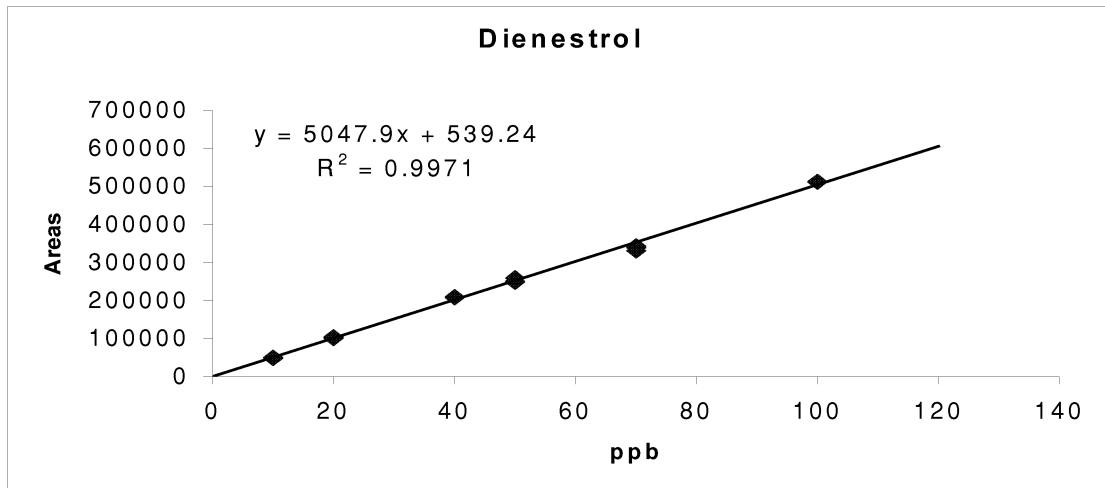


Autosampler Stabilität Ethinylestradiol



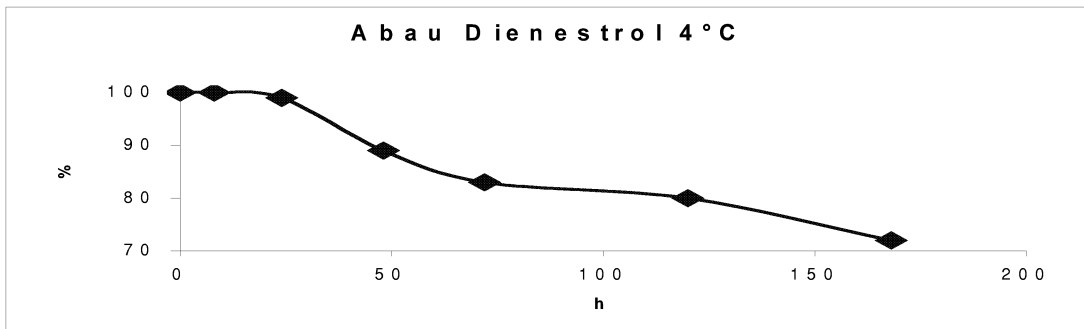
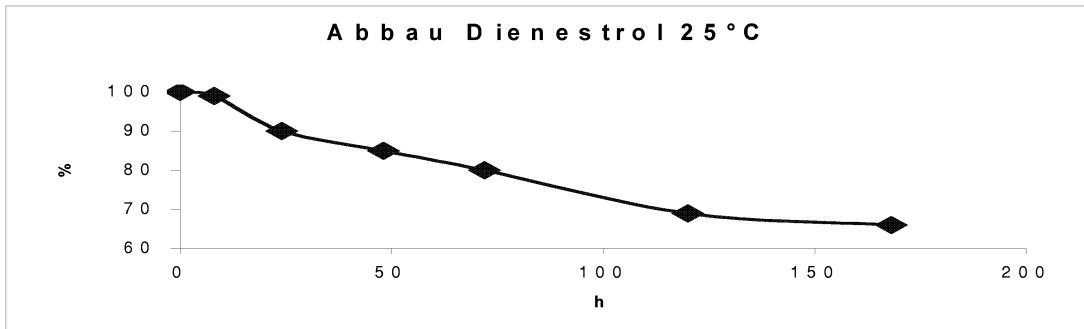
Quantifizierungslimit(LOQ) Ethinylestradiol

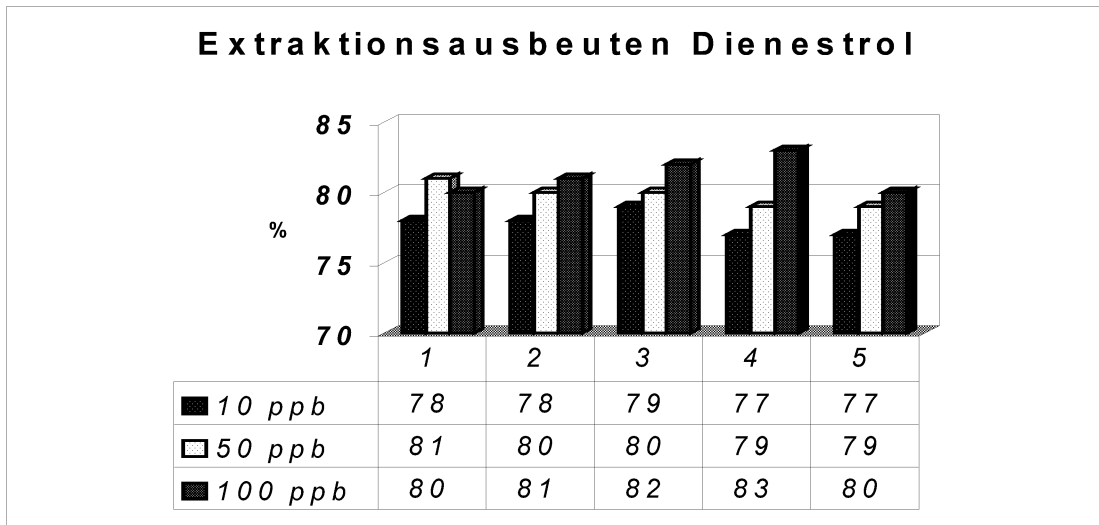
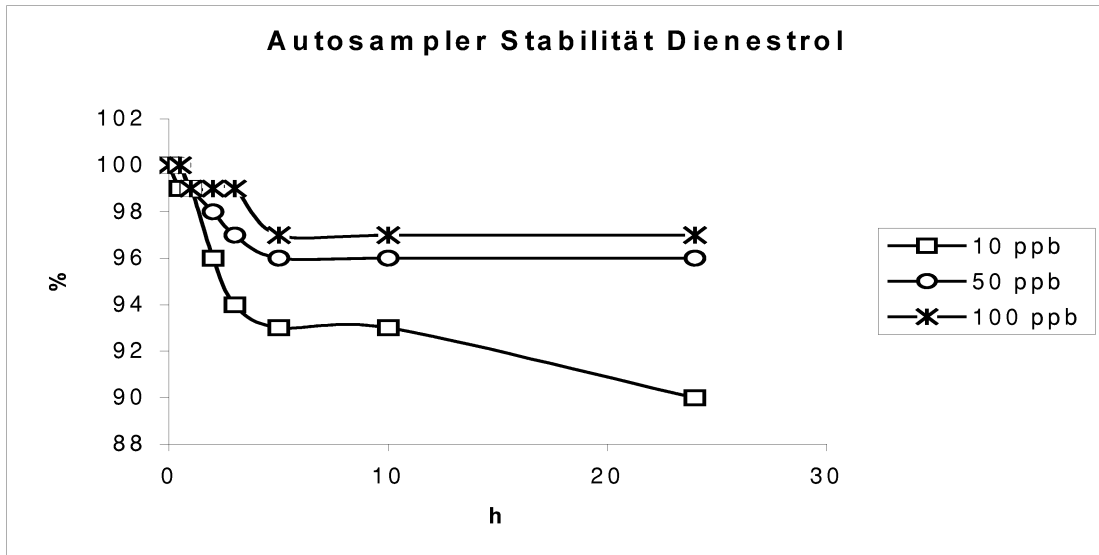
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	9.93	11
10 ppb	9.88	11
10 ppb	9.94	13
10 ppb	9.67	11
10 ppb	10.43	10
10 ppb	10.30	10
10 ppb	9.28	14
10 ppb	9.59	14
10 ppb	9.07	12
10 ppb	10.32	15
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.843566009	-1.564339911	4.544753814



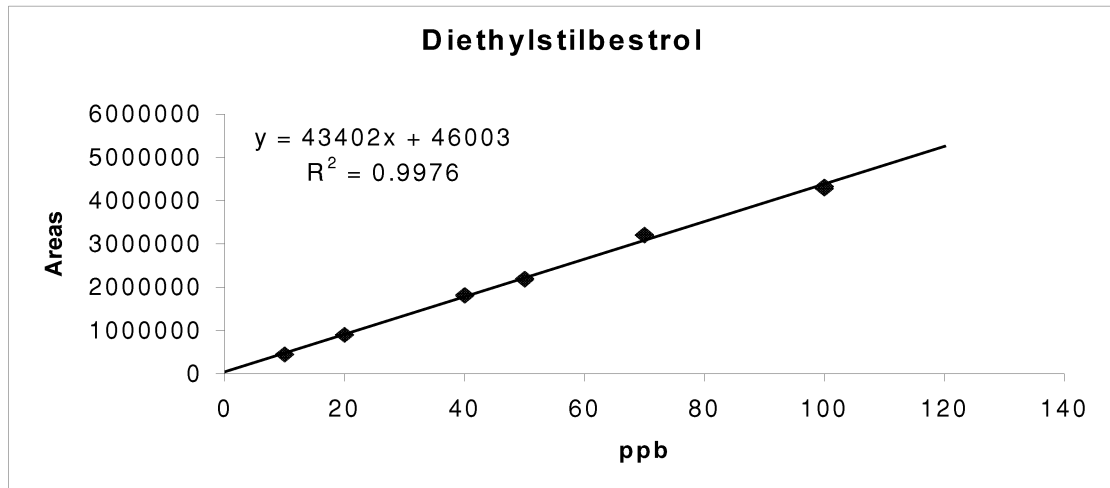
Dienestrol					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	50288	9.86	9.79	-2.15	2.88
10	51147	10.03			
10	48366	9.47			
20	103788	20.45	20.34	1.70	2.29
20	100633	19.83			
20	105231	20.74			
40	210366	41.57	41.31	3.26	0.55
40	208521	41.20			
40	208244	41.15			
50	248977	49.22	50.11	0.22	2.29
50	251468	49.71			
50	260018	51.40			
70	344163	68.07	66.94	-4.37	1.86
70	331734	65.61			
70	339469	67.14			
100	513444	101.61	101.52	1.52	0.21
100	513764	101.67			
100	511746	101.27			

Dienestrol Qualifier Set 1			Dienestrol Qualifier Set 1			Dienestrol Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	8.95	-10.5	10.0	11.03	10.3	10.0	8.95	-10.5
50.0	48.70	-2.6	50.0	52.00	4.0	50.0	46.80	-6.4
100.0	97.69	-2.3	100.0	104.00	4.0	100.0	99.00	-1.0
10.0	9.54	-4.6	10.0	8.94	-10.6	10.0	8.95	-10.5
50.0	51.30	2.6	50.0	46.77	-6.5	50.0	47.98	-4.0
100.0	100.53	0.5	100.0	97.60	-2.4	100.0	95.60	-4.4
10.0	9.54	-4.6	10.0	10.44	4.4	10.0	9.45	-5.5
50.0	51.10	2.2	50.0	51.10	2.2	50.0	48.50	-3.0
100.0	96.42	-3.6	100.0	99.56	-0.4	100.0	103.04	3.0



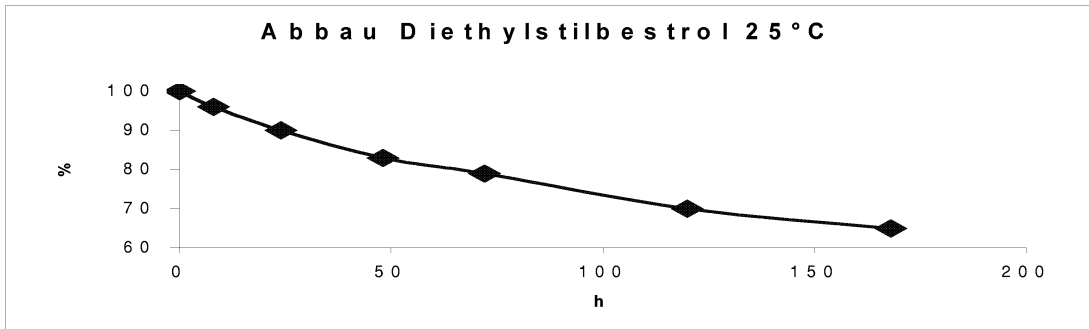


Quantifizierungslimit(LOQ)Dienestrol		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	9.32	12
10 ppb	9.08	11
10 ppb	9.08	11
10 ppb	9.36	10
10 ppb	9.47	12
10 ppb	8.89	13
10 ppb	10.77	10
10 ppb	10.11	11
10 ppb	10.27	12
10 ppb	8.10	10
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.443945066	-5.560549341	8.125034465

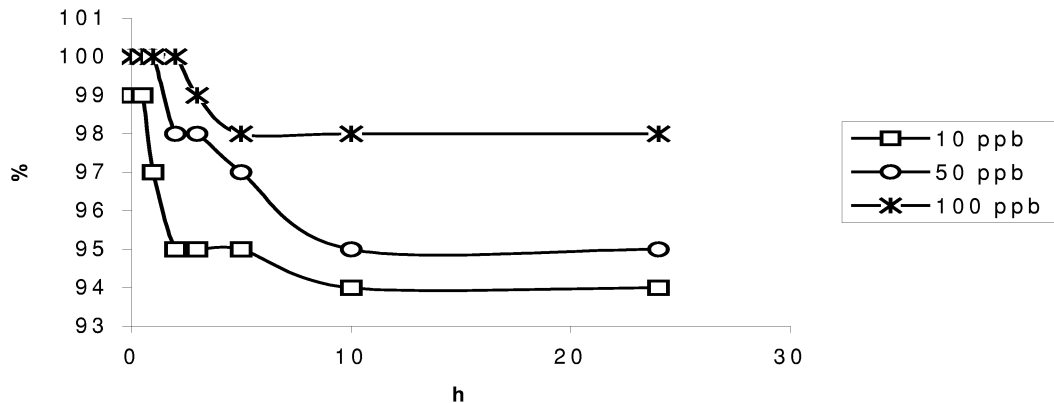


Diethylstilbestrol					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	448233	9.27	9.31	-6.95	0.36
10	450377	9.32			
10	451016	9.33			
20	903112	19.75	19.67	-1.64	0.35
20	897253	19.61			
20	899184	19.66			
40	1804336	40.51	40.67	1.67	0.80
40	1827314	41.04			
40	1801758	40.45			
50	2175441	49.06	49.28	-1.44	0.73
50	2176225	49.08			
50	2203047	49.70			
70	3216499	73.05	72.81	4.02	0.29
70	3198543	72.64			
70	3203786	72.76			
100	4280355	97.56	98.26	-1.74	0.63
100	4332421	98.76			
100	4318756	98.45			

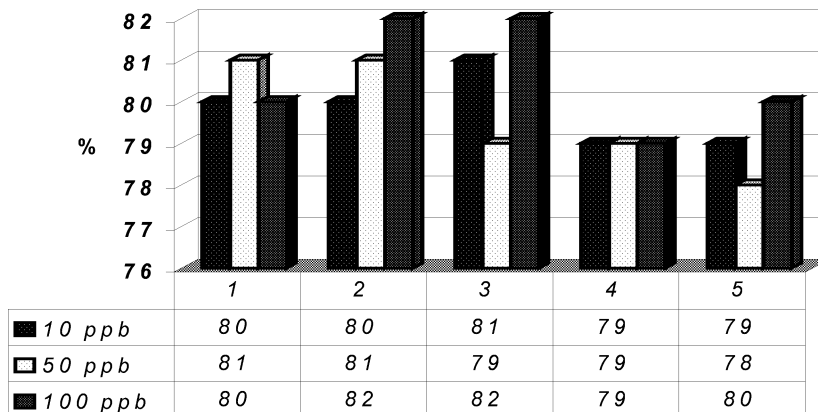
Diethylstilbestrol Qualifier Set 1			Diethylstilbestrol Qualifier Set 1			Diethylstilbestrol Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	8.96	-10.4	10.0	10.23	2.3	10.0	9.43	-5.7
50.0	49.44	-1.1	50.0	51.39	2.8	50.0	52.20	4.4
100.0	102.43	2.4	100.0	100.70	0.7	100.0	102.48	2.5
10.0	9.45	-5.5	10.0	9.34	-6.6	10.0	8.78	-12.2
50.0	52.03	4.1	50.0	51.42	2.8	50.0	48.59	-2.8
100.0	102.40	2.4	100.0	98.40	-1.6	100.0	97.31	-2.7
10.0	10.05	0.5	10.0	9.12	-8.8	10.0	10.05	0.5
50.0	49.37	-1.3	50.0	48.91	-2.2	50.0	53.30	6.6
100.0	101.1	1.1	100.0	101.7	1.7	100.0	102.58	2.6



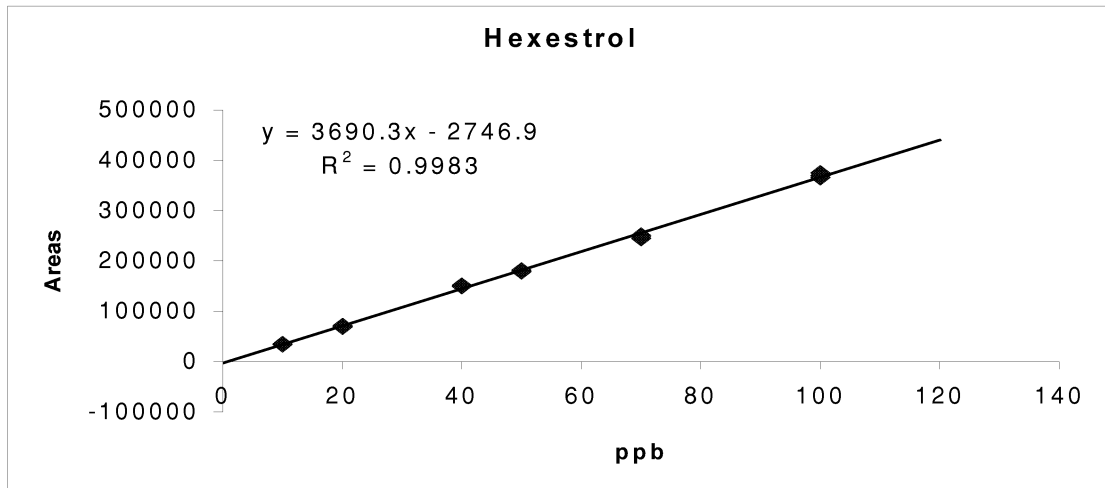
Autosampler Stabilität Diethylstilbestrol



Extraktionsausbeuten Diethylstilbestrol

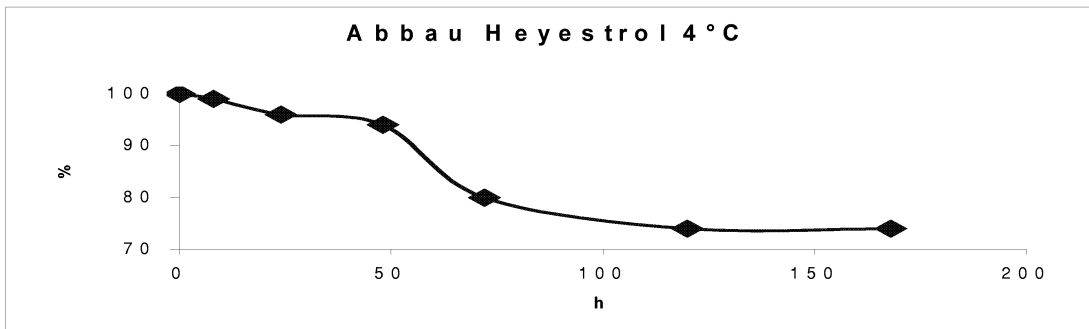
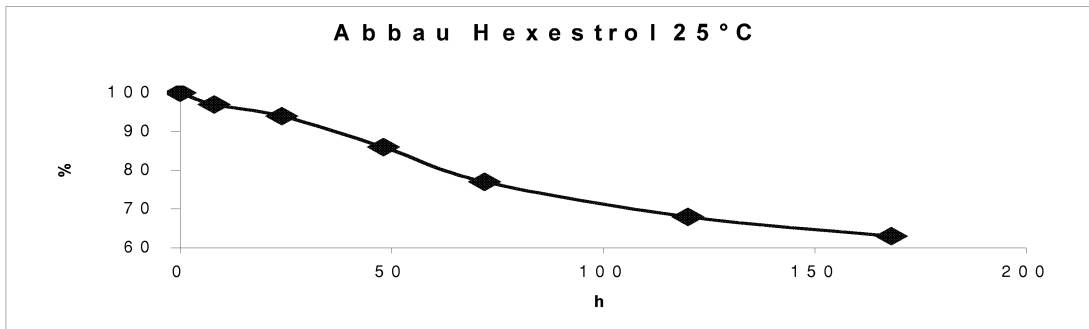


Quantifizierungslimit(LOQ)Diethylstilbestrol		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	9.51	12
10 ppb	9.18	12
10 ppb	9.27	10
10 ppb	9.45	10
10 ppb	9.01	14
10 ppb	9.98	13
10 ppb	8.80	15
10 ppb	10.63	10
10 ppb	8.60	11
10 ppb	8.18	12
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.260641311	-7.393586894	7.527663737

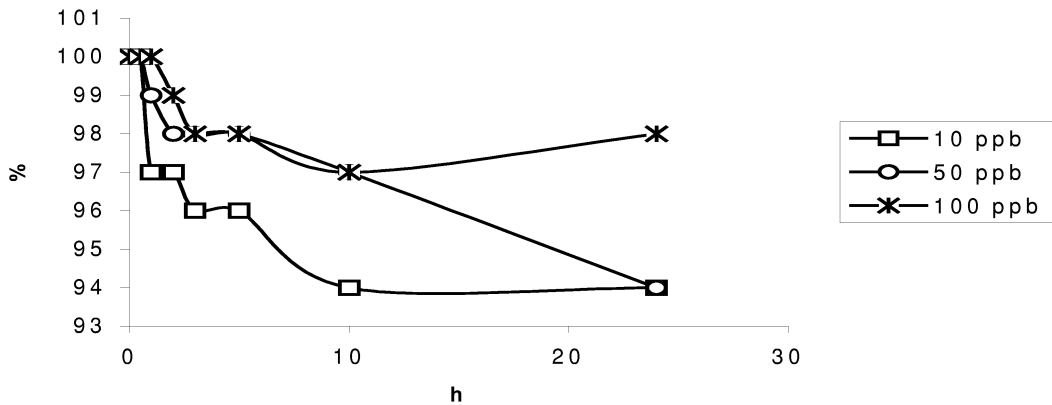


Hexestrol					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	33650	9.87	10.14	1.45	2.38
10	35210	10.29			
10	35178	10.28			
20	70218	19.78	19.74	-1.31	2.00
20	71453	20.11			
20	68547	19.32			
40	150236	41.47	41.53	3.82	0.78
40	149388	41.24			
40	151743	41.88			
50	182203	50.13	49.56	-0.87	1.05
50	178445	49.11			
50	179681	49.45			
70	244988	67.15	68.03	-2.82	1.28
70	251405	68.89			
70	248302	68.05			
100	374855	102.35	101.08	1.08	1.20
100	365922	99.93			
100	369731	100.96			

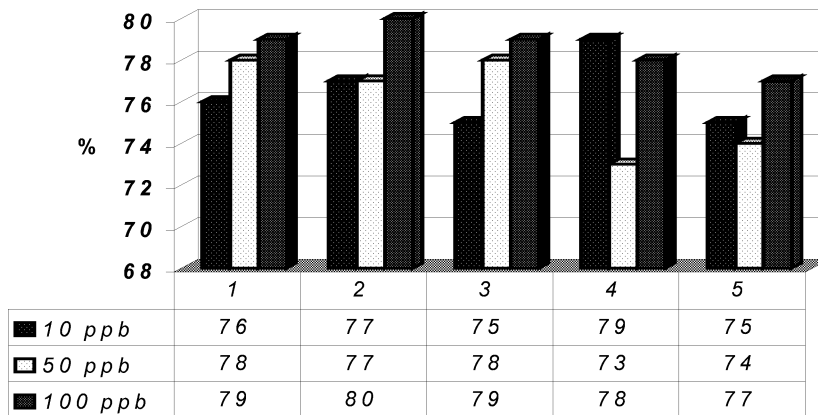
Hexestrol Qualifier Set 1			Hexestrol Qualifier Set 1			Hexestrol Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	9.45	-5.5	10.0	9.45	-5.5	10.0	9.90	-1.0
50.0	46.66	-6.7	50.0	52.10	4.2	50.0	51.34	2.7
100.0	101.35	1.3	100.0	99.20	-0.8	100.0	102.83	2.8
10.0	8.99	-10.1	10.0	10.30	3.0	10.0	9.64	-3.6
50.0	50.30	0.6	50.0	51.45	2.9	50.0	50.42	0.8
100.0	96.70	-3.3	100.0	96.69	-3.3	100.0	103.50	3.5
10.0	9.44	-5.6	10.0	10.29	2.9	10.0	9.48	-5.2
50.0	51.34	2.7	50.0	53.12	6.2	50.0	52.38	4.8
100.0	102.3	2.3	100.0	103.28	3.3	100.0	101.72	1.7



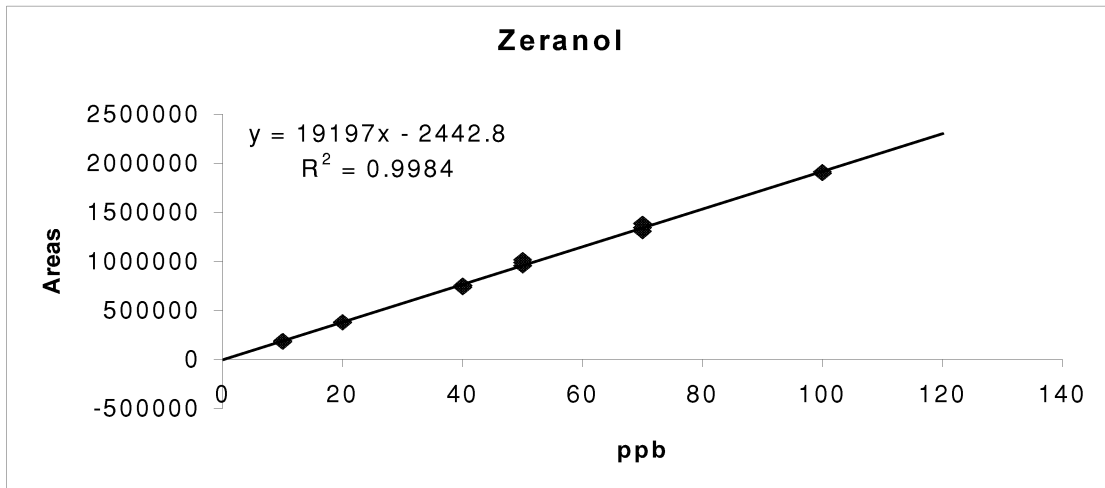
Autosampler Stabilität Hexestrol



Extraktionsausbeuten Hexestrol

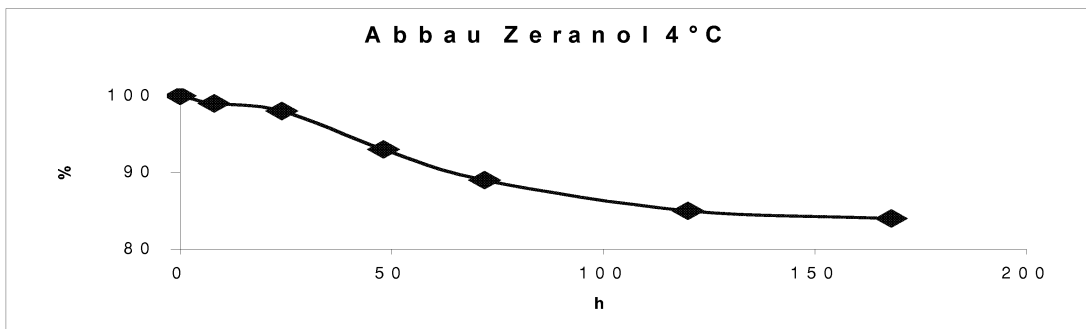
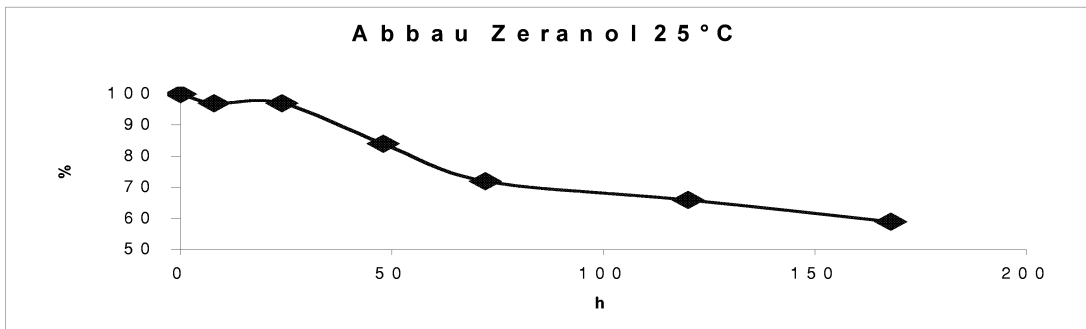


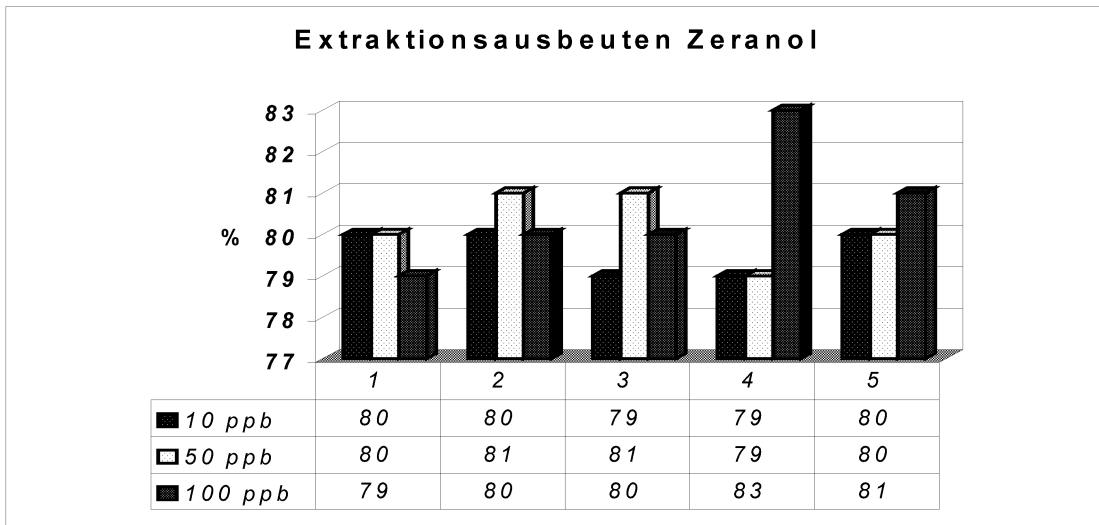
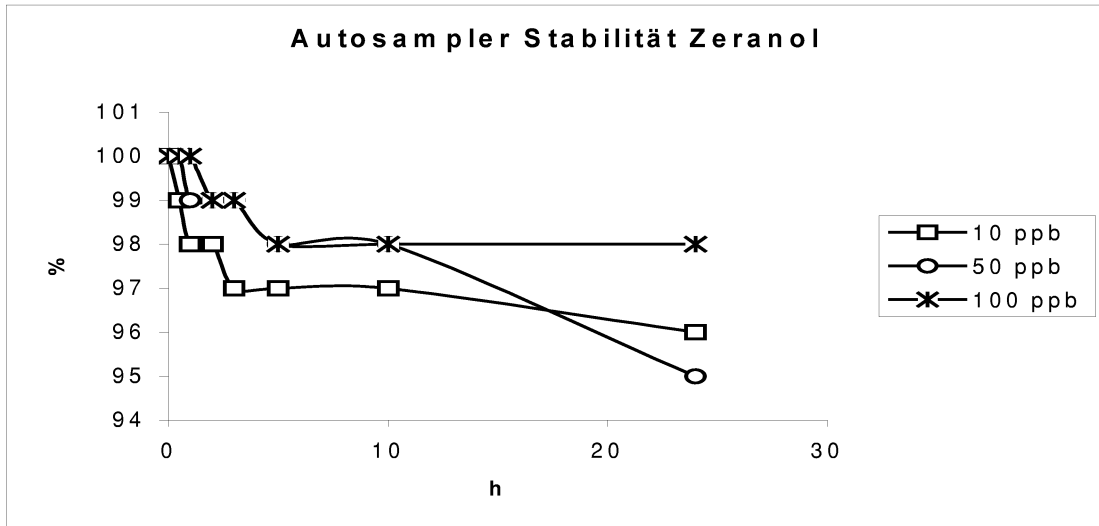
Quantifizierungslimit(LOQ)Hexestrol		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	8.51	13
10 ppb	9.04	14
10 ppb	9.94	12
10 ppb	9.25	10
10 ppb	9.72	12
10 ppb	9.47	14
10 ppb	9.35	10
10 ppb	9.74	11
10 ppb	9.46	11
10 ppb	9.89	13
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.437083022	-5.62916978	4.592666061



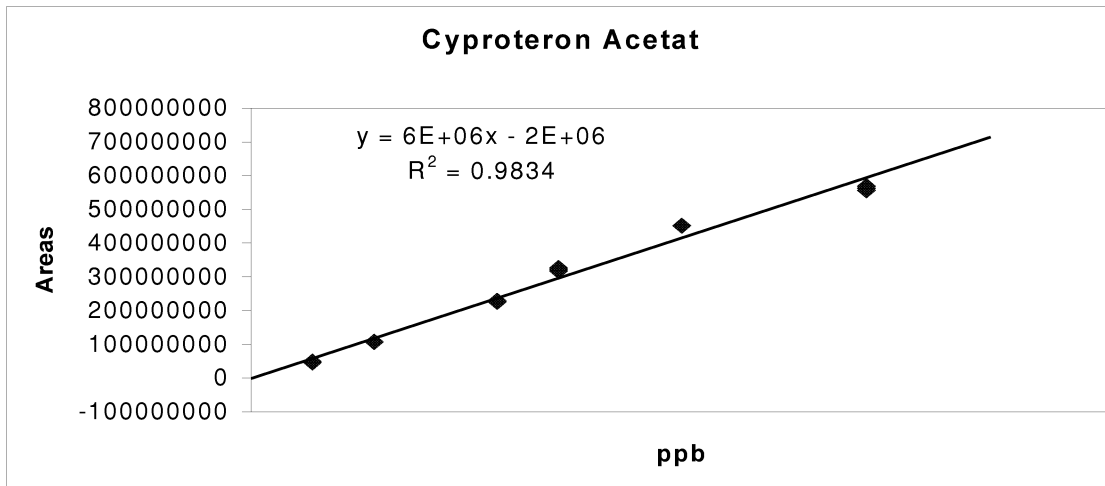
Zeranol					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	187225	9.88	9.78	-2.19	3.28
10	190310	10.04			
10	178456	9.42			
20	381742	20.01	19.90	-0.50	0.63
20	380012	19.92			
20	376989	19.77			
40	736147	38.47	39.08	-2.30	1.39
40	756239	39.52			
40	750833	39.24			
50	1016485	53.08	51.53	3.05	3.09
50	955342	49.89			
50	988276	51.61			
70	1386486	72.35	70.22	0.31	3.01
70	1344678	70.17			
70	1305299	68.12			
100	1912468	99.75	99.49	-0.51	0.37
100	1899356	99.07			
100	1910714	99.66			

Zeranol Qualifier Set 1			Zeranol Qualifier Set 1			Zeranol Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	8.88	-11.2	10.0	10.01	0.1	10.0	8.98	-10.2
50.0	50.50	1.0	50.0	52.33	4.7	50.0	48.45	-3.1
100.0	101.20	1.2	100.0	101.25	1.3	100.0	97.61	-2.4
10.0	9.56	-4.4	10.0	10.84	8.4	10.0	10.36	3.6
50.0	48.60	-2.8	50.0	49.65	-0.7	50.0	52.31	4.6
100.0	98.33	-1.7	100.0	99.20	-0.8	100.0	102.50	2.5
10.0	9.76	-2.4	10.0	11.03	10.3	10.0	9.85	-1.5
50.0	51.87	3.7	50.0	51.19	2.4	50.0	51.39	2.8
100.0	101.49	1.5	100.0	101.36	1.4	100.0	102.76	2.8



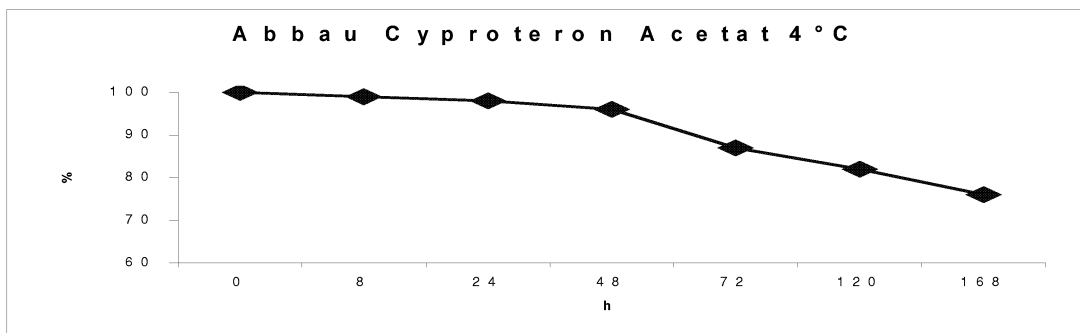
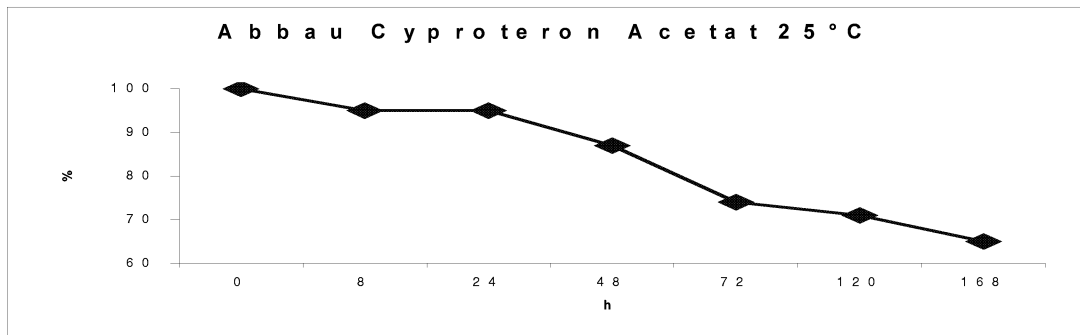


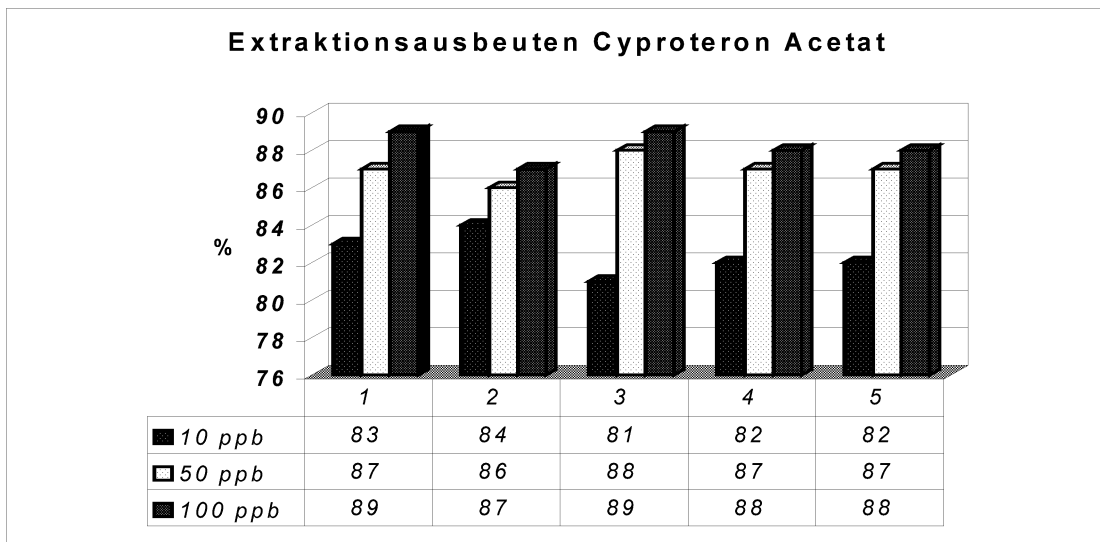
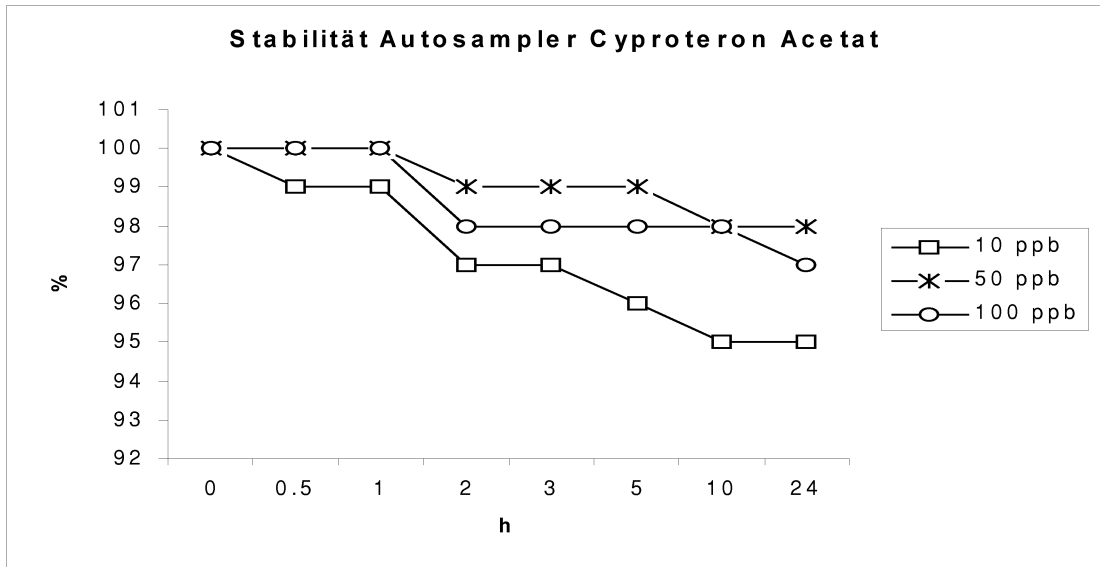
Quantifizierungslimit(LOQ) Zeranol		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	9.20	11
10 ppb	9.77	13
10 ppb	9.11	10
10 ppb	10.37	12
10 ppb	10.01	13
10 ppb	11.59	14
10 ppb	8.75	11
10 ppb	10.33	11
10 ppb	8.73	10
10 ppb	10.49	10
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.83536399	-1.64636099	9.219756623



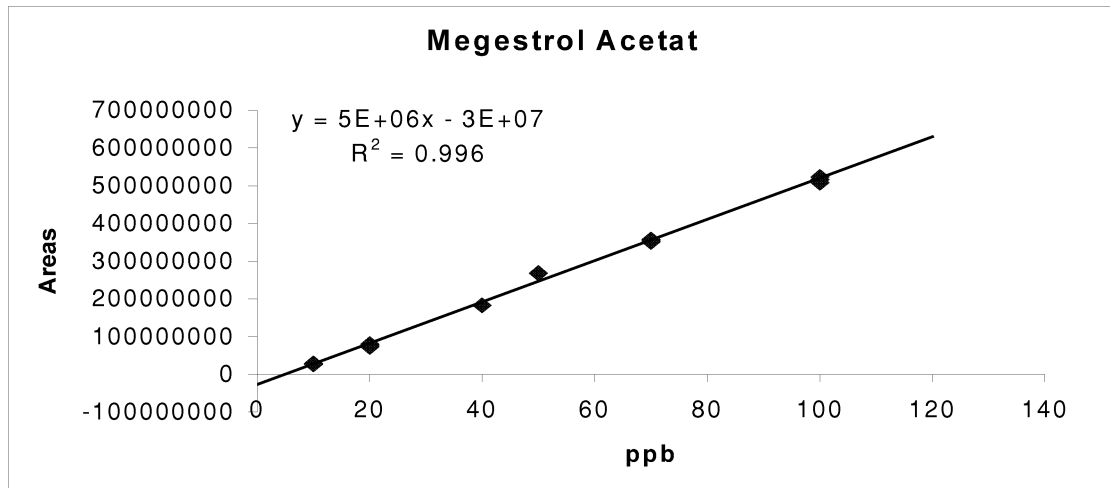
Cyproteron Acetat					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	46368979	8.06	8.15	-18.49	2.76
10	48437265	8.41			
10	45903122	7.98			
20	106566190	18.09	18.18	-9.11	0.46
20	107568448	18.26			
20	107067319	18.18			
40	225465083	37.91	38.21	-4.48	0.77
40	229013273	38.50			
40	227239178	38.21			
50	325851729	54.64	53.93	7.86	1.32
50	317330518	53.22			
50	321591124	53.93			
70	451690686	75.62	75.56	7.94	0.08
70	450970972	75.50			
70	451330829	75.56			
100	568551430	95.09	94.09	-5.91	1.07
100	556505464	93.08			
100	562528447	94.09			

Cyproteron Acetat Qualifier Set 1			Cyproteron Acetat Qualifier Set 1			Cyproteron Acetat Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	9.16	-8.4	10.0	8.99	-10.1	10.0	9.45	-5.5
50.0	48.33	-3.3	50.0	51.05	2.1	50.0	48.56	-2.9
100.0	101.10	1.1	100.0	100.17	0.2	100.0	101.59	1.6
10.0	10.02	0.2	10.0	9.78	-2.2	10.0	9.45	-5.5
50.0	50.03	0.1	50.0	51.49	3.0	50.0	50.20	0.4
100.0	102.20	2.2	100.0	100.91	0.9	100.0	99.67	-0.3
10.0	9.37	-6.3	10.0	9.44	-5.6	10.0	10.04	0.4
50.0	49.33	-1.3	50.0	50.73	1.5	50.0	51.23	2.5
100.0	99.16	-0.8	100.0	102	2.0	100.0	102.15	2.2



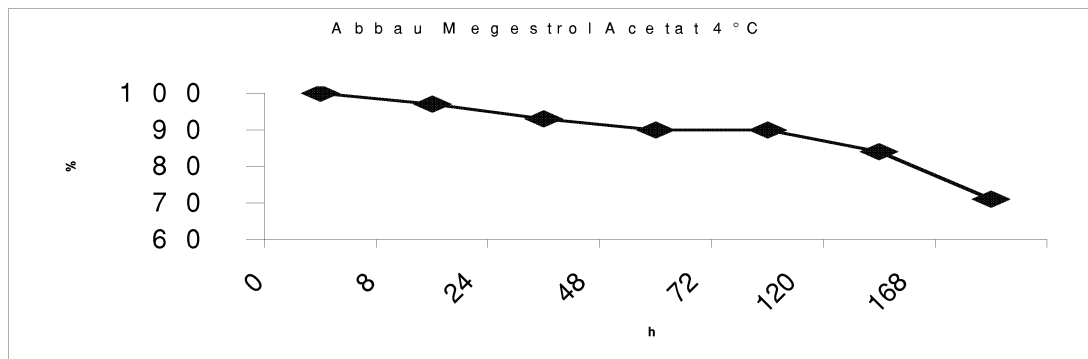
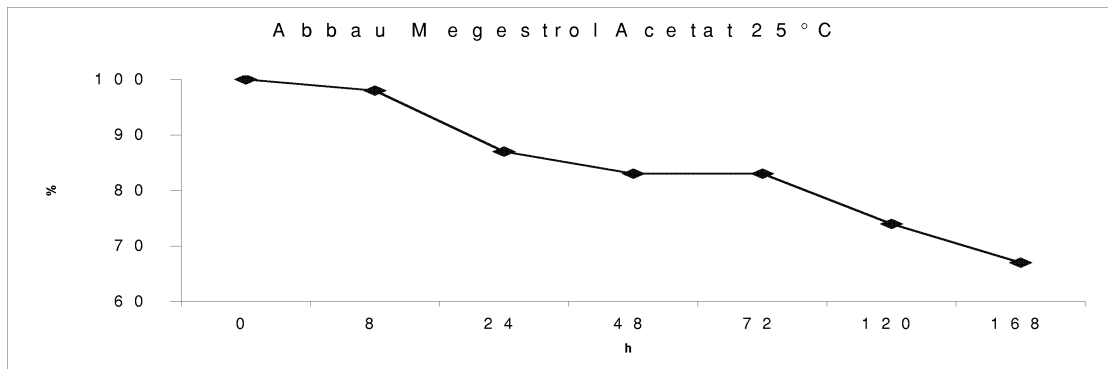


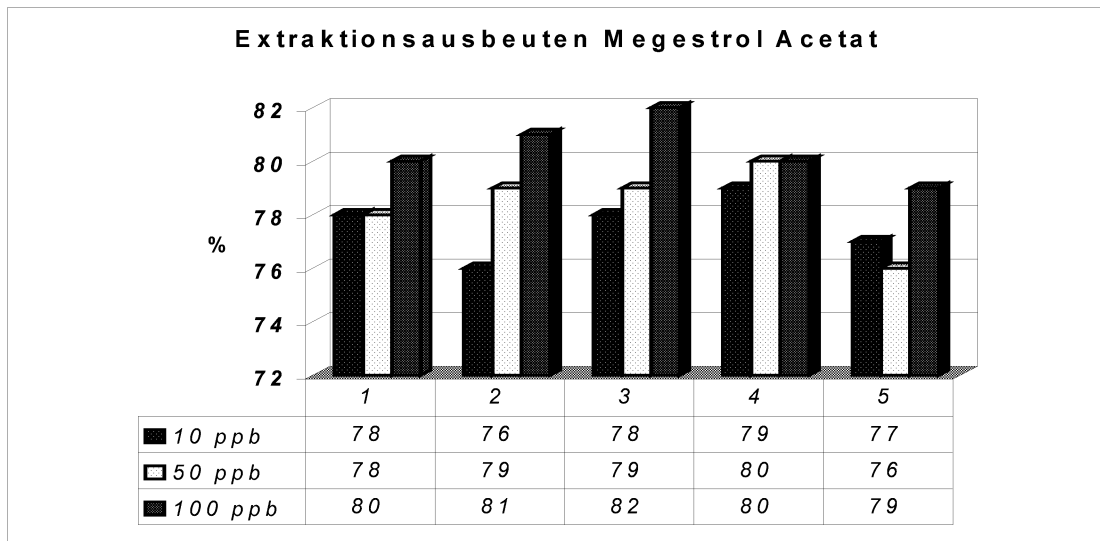
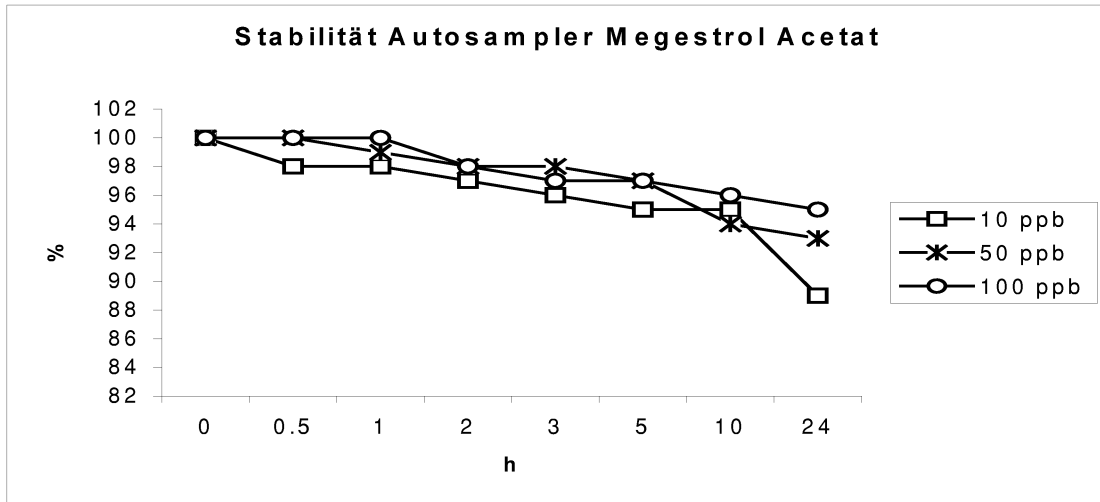
Quantifizierungslimit(LOQ)Cyproteron Acetat		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	8.81256	12
10 ppb	9.27532	13
10 ppb	9.4564	14
10 ppb	9.48658	13
10 ppb	9.68778	15
10 ppb	9.71796	12
10 ppb	9.88898	10
10 ppb	9.98958	14
10 ppb	10.10024	15
10 ppb	10.15054	17
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.656594	-3.43406	4.279725506



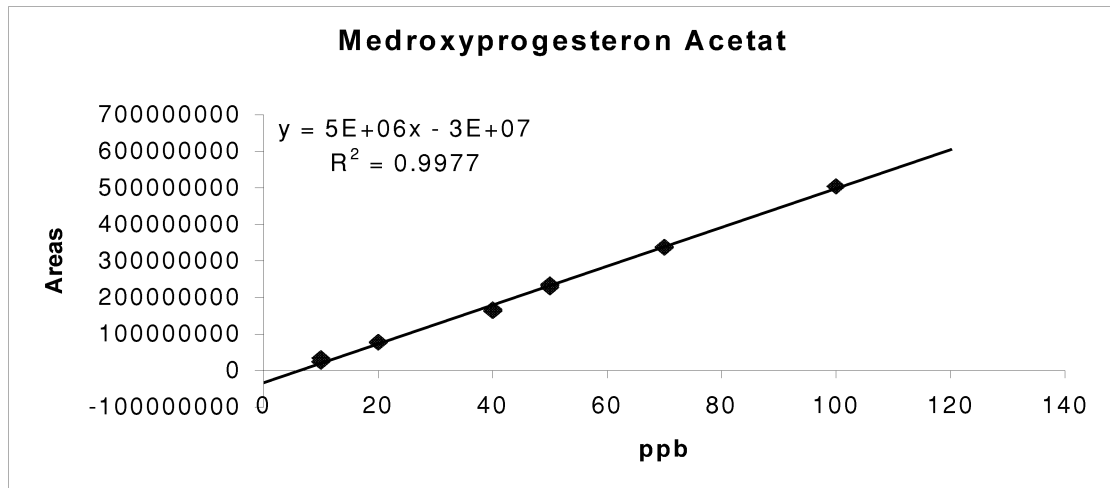
Megestrol Acetat					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	26875461	11.38	11.54	15.41	1.44
10	28536800	11.71			
10	27706130	11.54			
20	73165368	20.63	21.29	6.46	3.09
20	79753389	21.95			
20	76459378	21.29			
40	182672352	42.53	42.55	6.39	0.05
40	182873777	42.57			
40	182773065	42.55			
50	268880170	59.78	59.63	19.27	0.24
50	267449380	59.49			
50	268164775	59.63			
70	357024174	77.40	76.83	9.76	0.74
70	351314399	76.26			
70	354169286	76.83			
100	523002400	110.60	109.15	9.15	1.33
100	508517010	107.70			
100	515759705	109.15			

Megestrol Acetat Qualifier Set 1			Megestrol Acetat Qualifier Set 1			Megestrol Acetat Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	8.97	-10.3	10.0	9.34	-6.6	10.0	10.05	0.5
50.0	50.21	0.4	50.0	49.44	-1.1	50.0	50.22	0.4
100.0	99.23	-0.8	100.0	97.30	-2.7	100.0	100.53	0.5
10.0	9.21	-7.9	10.0	8.99	-10.1	10.0	8.68	-13.2
50.0	48.77	-2.5	50.0	52.00	4.0	50.0	47.93	-4.1
100.0	98.65	-1.3	100.0	100.28	0.3	100.0	95.16	-4.8
10.0	11.01	10.1	10.0	8.94	-10.6	10.0	9.10	-9.0
50.0	51.65	3.3	50.0	48.82	-2.4	50.0	48.48	-3.0
100.0	102.82	2.8	100.0	98.39	-1.6	100.0	96.76	-3.2



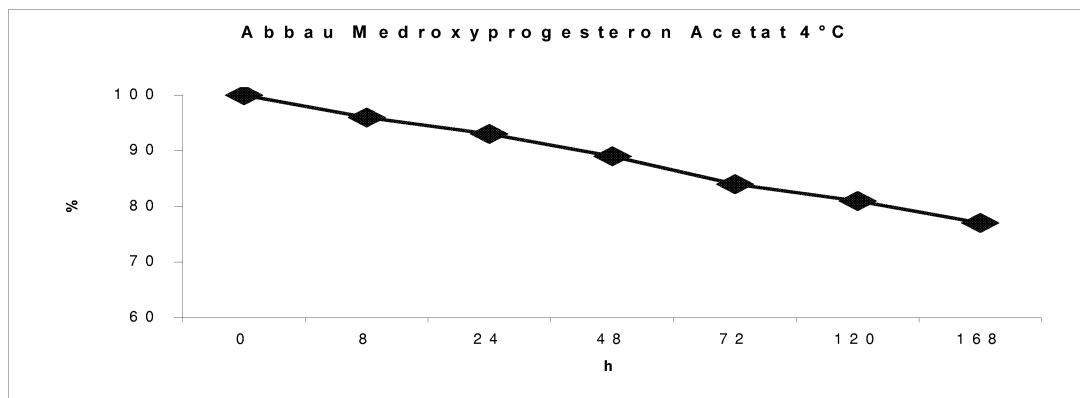
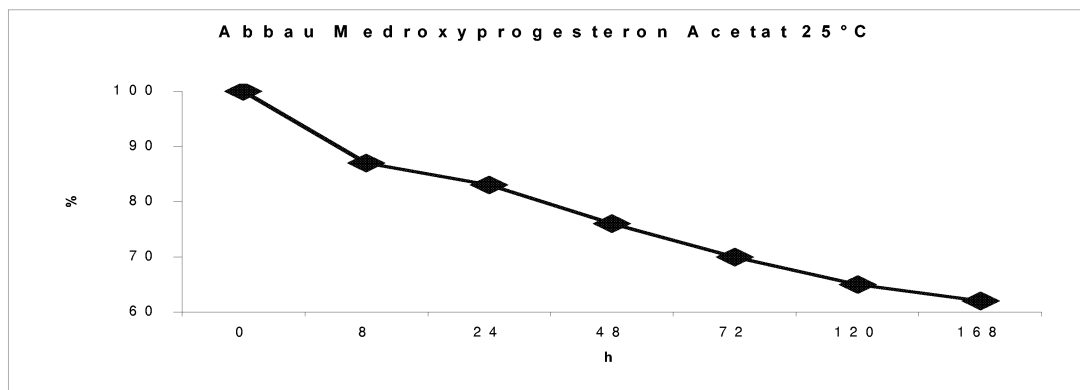


Quantifizierungslimit(LOQ)Megestrol Acetat		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	8.918627972	11
10 ppb	9.331055398	13
10 ppb	9.83843856	12
10 ppb	9.677260258	12
10 ppb	9.494993178	13
10 ppb	9.874069309	10
10 ppb	10.06778265	11
10 ppb	11.01351195	12
10 ppb	11.34862966	13
10 ppb	10.17085123	12
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.973522017	-0.264779833	7.391279337

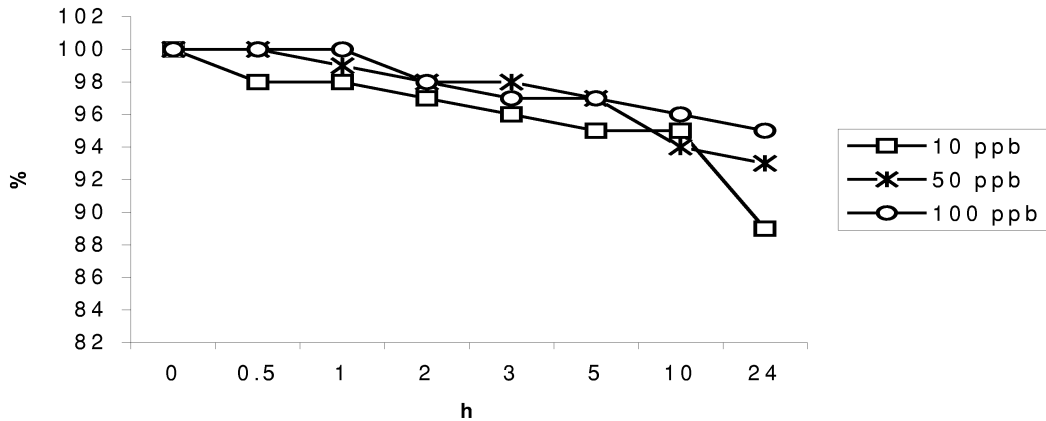


Medroxyprogesteron Acetat					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	24196628	10.84	11.41	14.10	10.16
10	23236427	10.65			
10	33716528	12.74			
20	75935306	21.19	21.44	7.18	1.16
20	78427521	21.69			
20	77181413	21.44			
40	161829214	38.37	38.96	-2.59	1.53
40	167793972	39.56			
40	164811593	38.96			
50	226984678	51.40	52.29	4.58	1.70
50	235898336	53.18			
50	231441507	52.29			
70	335994389	73.20	73.46	4.94	0.36
70	338617784	73.72			
70	337306086	73.46			
100	504614729	106.92	106.85	6.85	0.07
100	503890683	106.78			
100	504252706	106.85			

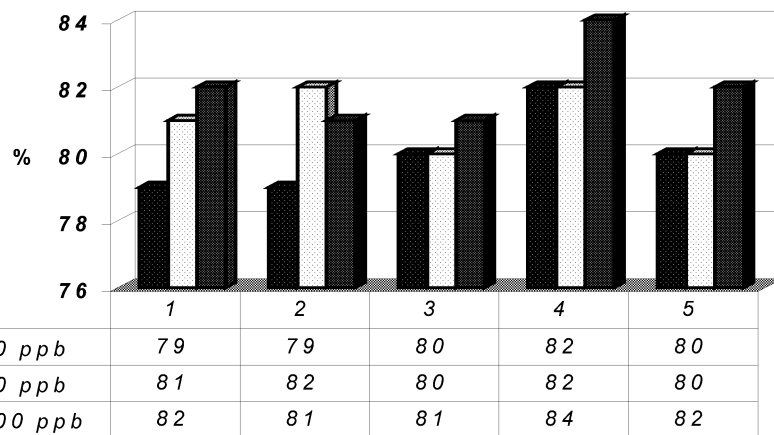
Medroxyprogesteron Acetat Qualifier Set 1			Medroxyprogesteron Acetat Qualifier Set 1			Medroxyprogesteron Acetat Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	9.87	-1.3	10.0	10.88	8.8	10.0	11.34	13.4
50.0	48.56	-2.9	50.0	51.27	2.5	50.0	49.10	-1.8
100.0	104.17	4.2	100.0	99.34	-0.7	100.0	99.19	-0.8
10.0	8.96	-10.4	10.0	11.32	13.2	10.0	8.78	-12.2
50.0	47.97	-4.1	50.0	50.21	0.4	50.0	50.20	0.4
100.0	103.25	3.3	100.0	103.17	3.2	100.0	101.67	1.7
10.0	8.93	-10.7	10.0	9.54	-4.6	10.0	10.88	8.8
50.0	50.34	0.7	50.0	53.71	7.4	50.0	48.24	-3.5
100.0	105.27	5.3	100.0	101.23	1.2	100.0	98.98	-1.0



Stabilität Autosampler Medroxyprogesteron Acetat

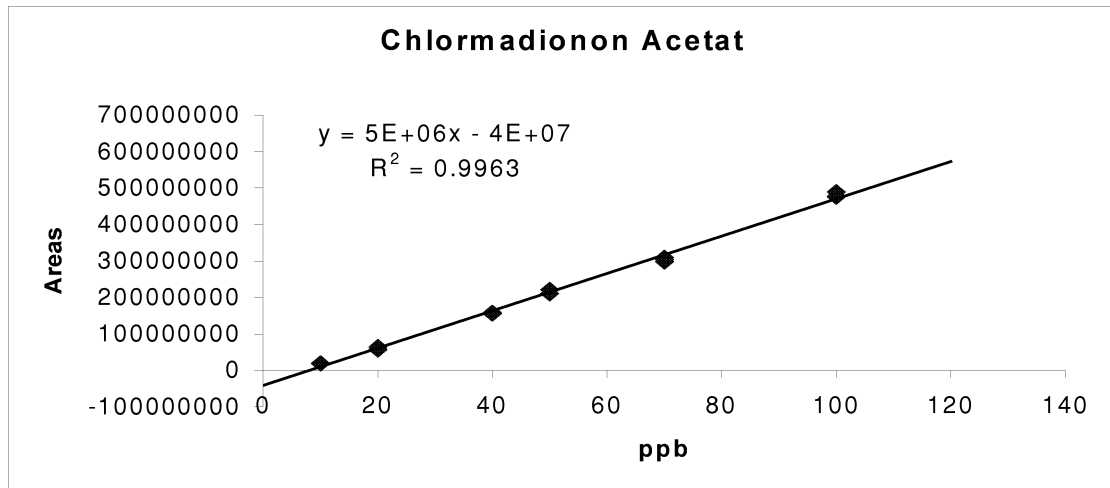


Extraktionsausbeuten Medroxyprogesteron Acetat



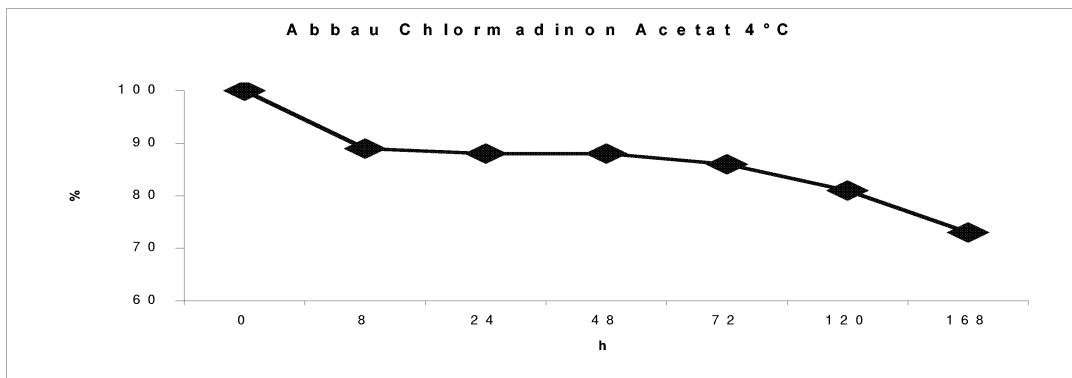
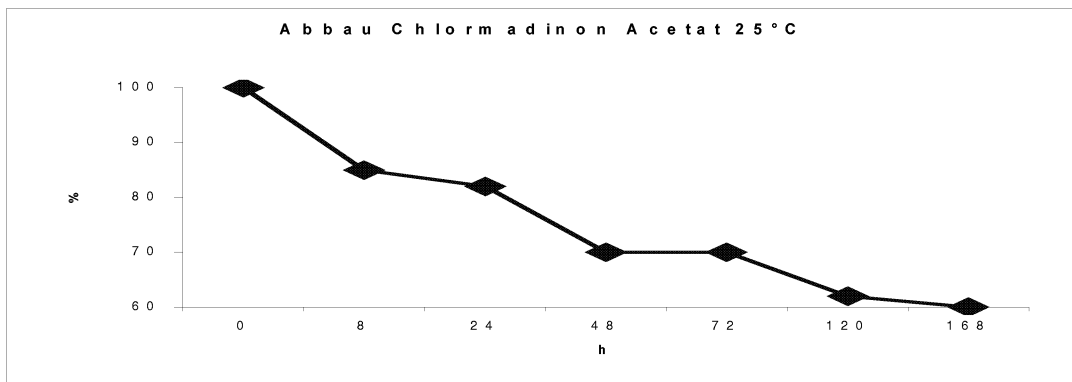
Quantifizierungslimit(LOQ) Medroxyprogesteron Acetat

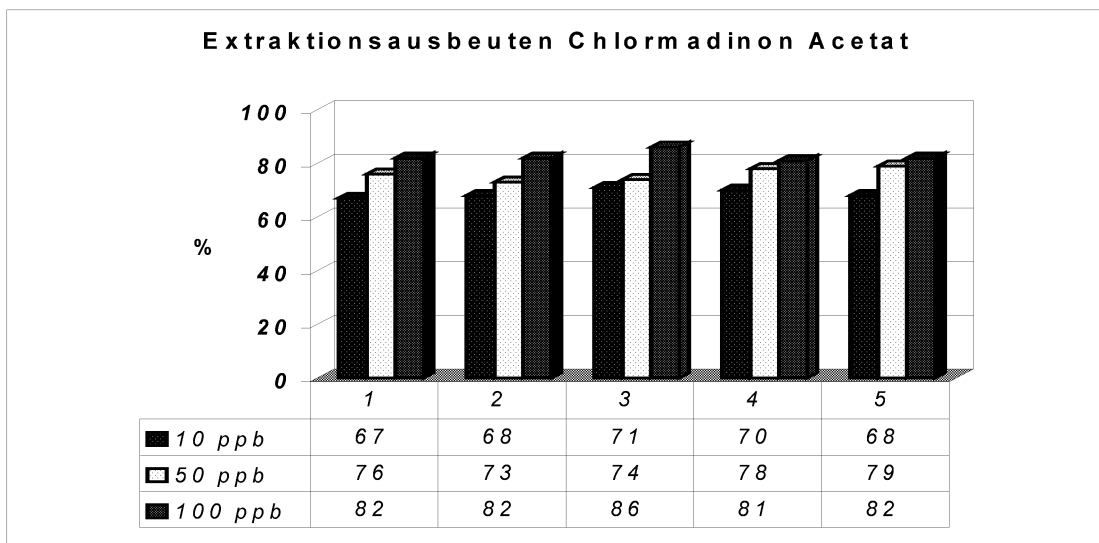
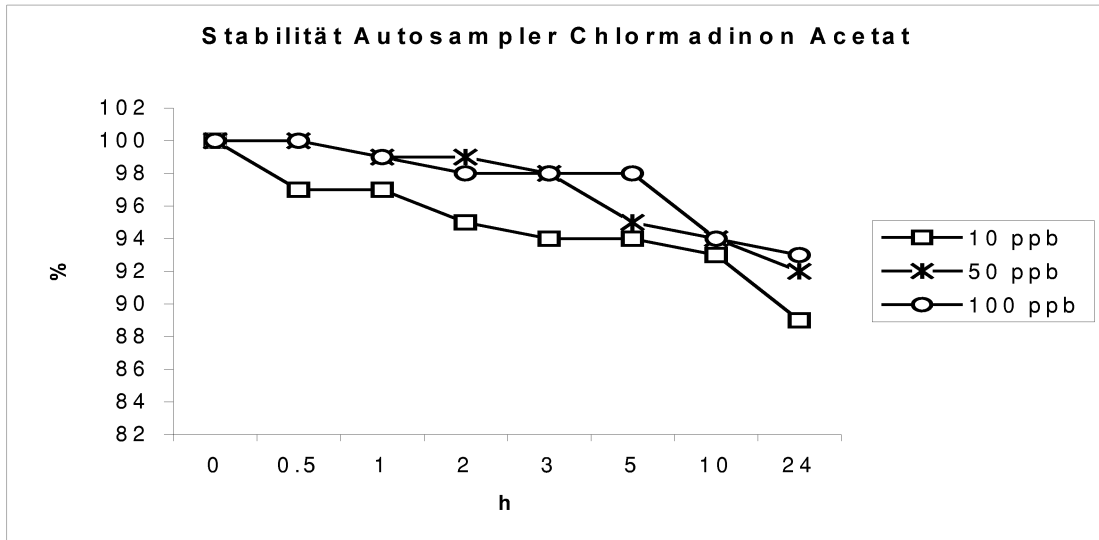
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	11.25551734	13
10 ppb	10.94486517	12
10 ppb	10.52860075	13
10 ppb	10.12413807	15
10 ppb	9.637300976	16
10 ppb	9.777115966	14
10 ppb	9.636023517	15
10 ppb	9.828970068	14
10 ppb	9.751258949	12
10 ppb	8.801489642	11
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10.02852804	0.285280443	7.12657356



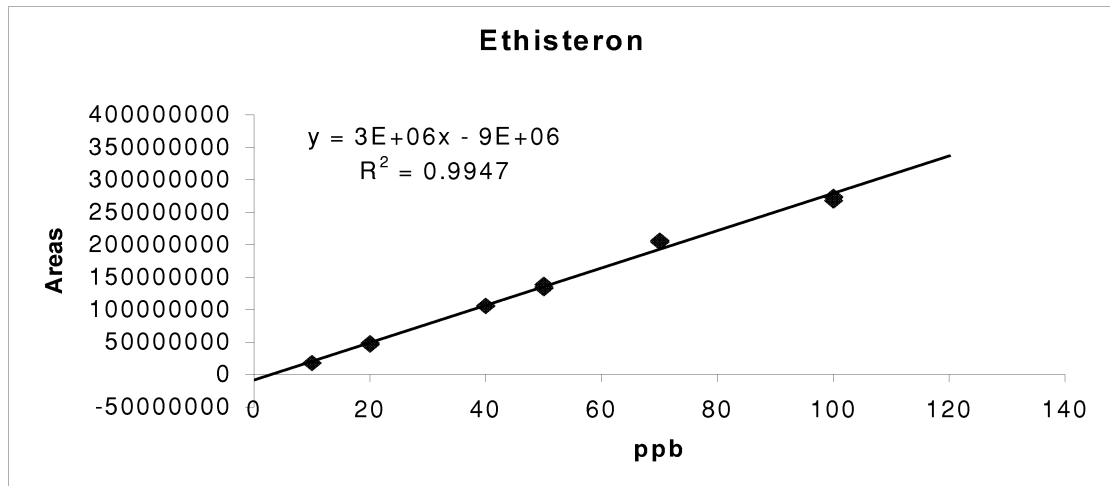
Chlormadinon Acetat					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	19955049	11.99	11.89	18.90	1.96
10	20274597	12.05			
10	18114823	11.62			
20	64328980	20.87	19.93	-0.37	4.20
20	58259947	19.65			
20	56294464	19.26			
40	156472233	39.29	39.36	-1.59	0.94
40	155147812	39.03			
40	158810023	39.76			
50	221523866	52.30	51.53	3.05	2.43
50	210413973	50.08			
50	220968920	52.19			
70	309399684	69.88	68.72	-1.83	1.69
70	297817671	67.56			
70	303608678	68.72			
100	489831597	105.97	104.19	4.19	1.49
100	475403005	103.08			
100	477617301	103.52			

Chlormadinon Acetat Qualifier Set 1			Chlormadinon Acetat Qualifier Set 1			Chlormadinon Acetat Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	11.03	10.3	10.0	11.02	10.2	10.0	11.29	12.9
50.0	56.00	12.0	50.0	53.00	6.0	50.0	49.99	0.0
100.0	106.22	6.2	100.0	102.18	2.2	100.0	103.20	3.2
10.0	10.72	7.2	10.0	10.97	9.7	10.0	10.86	8.6
50.0	52.56	5.1	50.0	54.19	8.4	50.0	52.50	5.0
100.0	103.00	3.0	100.0	103.29	3.3	100.0	106.00	6.0
10.0	11.00	10.0	10.0	11.20	12.0	10.0	11.20	12.0
50.0	51.65	3.3	50.0	52.87	5.7	50.0	54.00	8.0
100.0	103.28	3.3	100.0	103.22	3.2	100.0	103.28	3.3



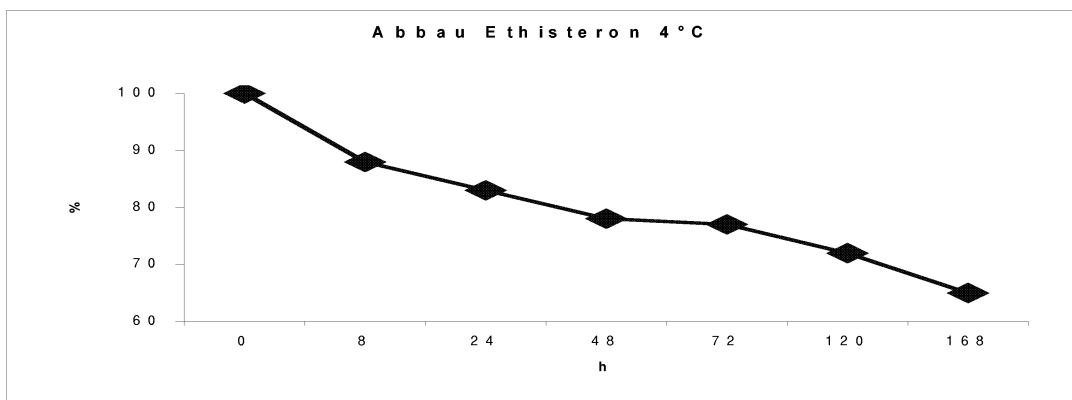
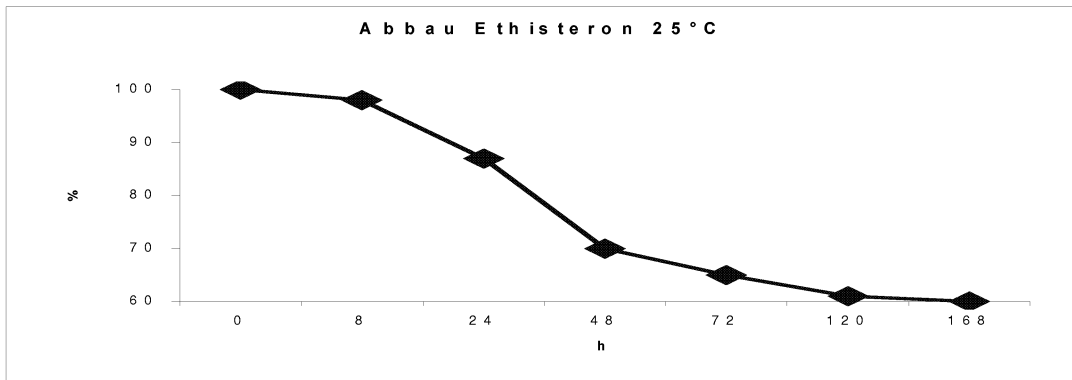


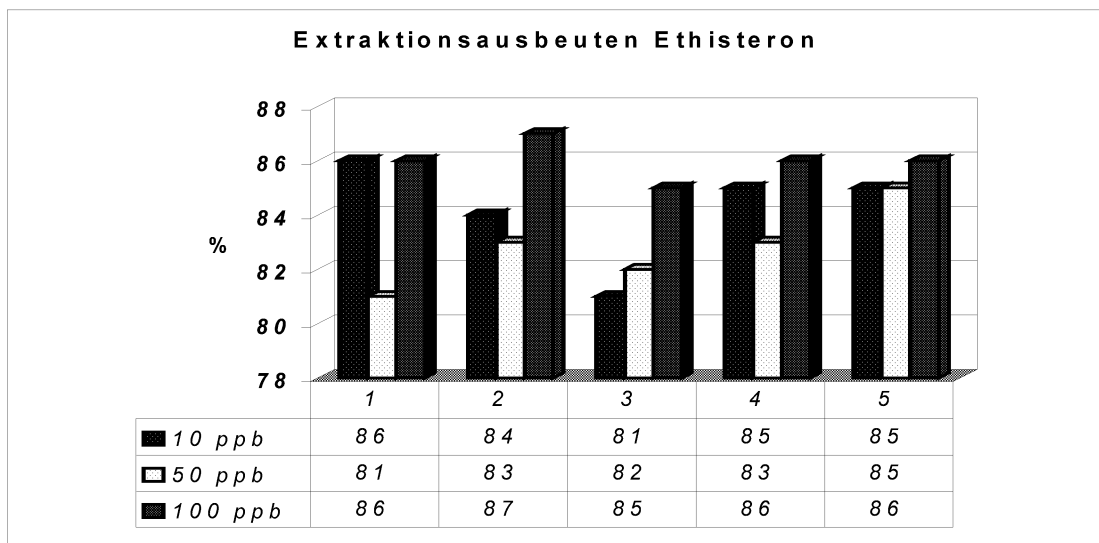
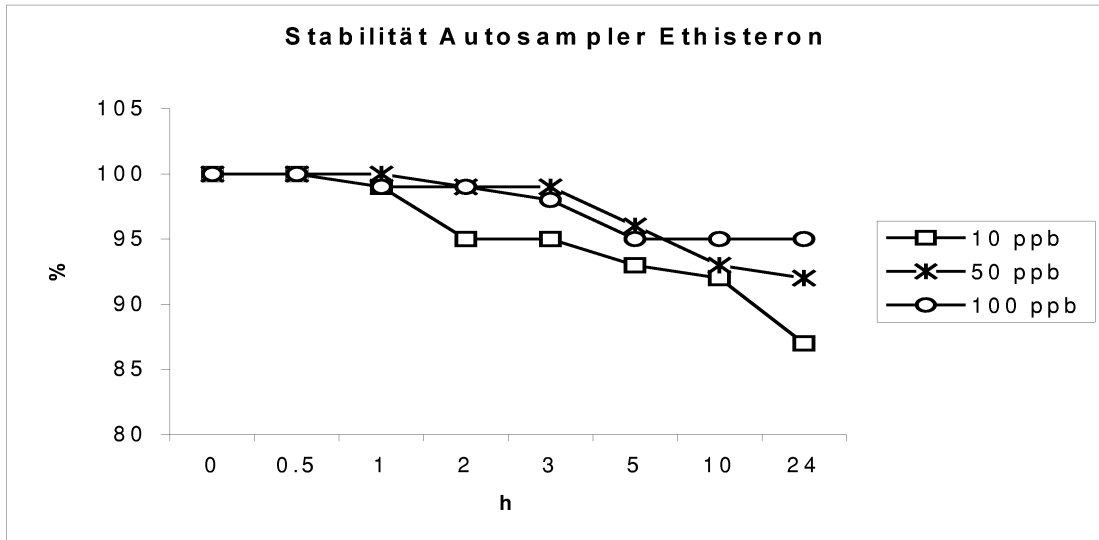
Quantifizierungslimit(LOQ) Chlormadinon Acetat		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	8.344076837	13
10 ppb	8.871850778	12
10 ppb	9.501874844	15
10 ppb	8.982265363	14
10 ppb	9.1727694	16
10 ppb	9.201345006	15
10 ppb	8.503380979	14
10 ppb	9.670859701	15
10 ppb	9.563302677	14
10 ppb	9.610928686	13
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.142265427	-8.57734573	5.096771682



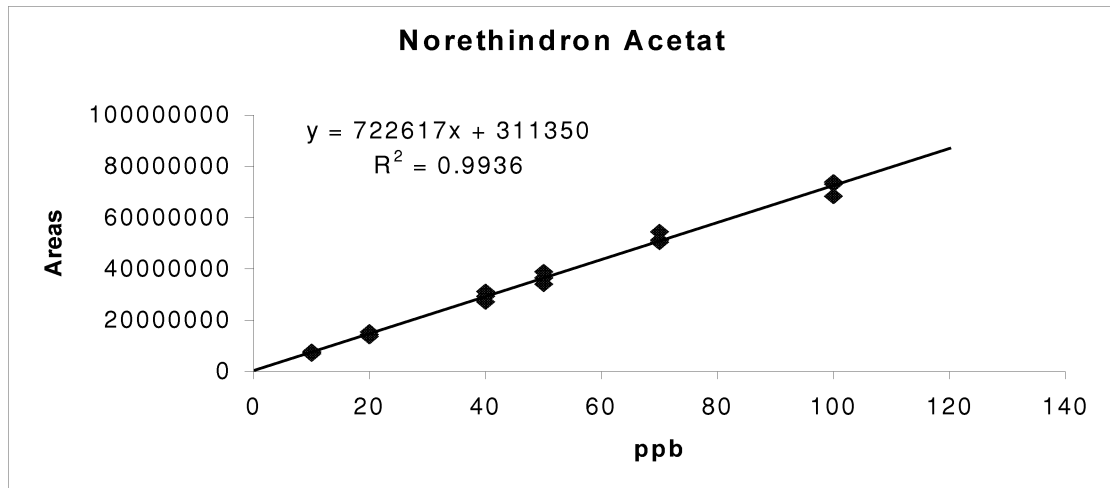
Ethisteron					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	18185306	9.06	8.95	-10.45	1.20
10	17542205	8.85			
10	17863756	8.95			
20	48520056	19.17	18.76	-6.20	2.21
20	46034273	18.34			
20	47277165	18.76			
40	105337851	38.11	38.27	-4.32	0.42
40	106305116	38.44			
40	105821483	38.27			
50	132383895	47.13	48.11	-3.78	2.19
50	134954423	47.98			
50	138669159	49.22			
70	206622107	71.87	71.42	2.03	0.63
70	203914961	70.97			
70	205268534	71.42			
100	273815256	94.27	93.43	-6.57	1.21
100	267425467	92.14			
100	272620362	93.87			

Ethisteron Acetat Qualifier Set 1			Ethisteron Acetat Qualifier Set 1			Ethisteron Acetat Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	9.23	-7.7	10.0	8.95	-10.5	10.0	8.88	-11.2
50.0	47.88	-4.2	50.0	50.22	0.4	50.0	51.43	2.9
100.0	98.70	-1.3	100.0	102.16	2.2	100.0	99.23	-0.8
10.0	8.90	-11.0	10.0	8.87	-11.3	10.0	11.03	10.3
50.0	46.24	-7.5	50.0	48.40	-3.2	50.0	53.00	6.0
100.0	99.27	-0.7	100.0	99.23	-0.8	100.0	99.17	-0.8
10.0	8.98	-10.2	10.0	8.78	-12.2	10.0	11.00	10.0
50.0	46.90	-6.2	50.0	51.04	2.1	50.0	54.22	8.4
100.0	100	0.0	100.0	101.29	1.3	100.0	101.24	1.2



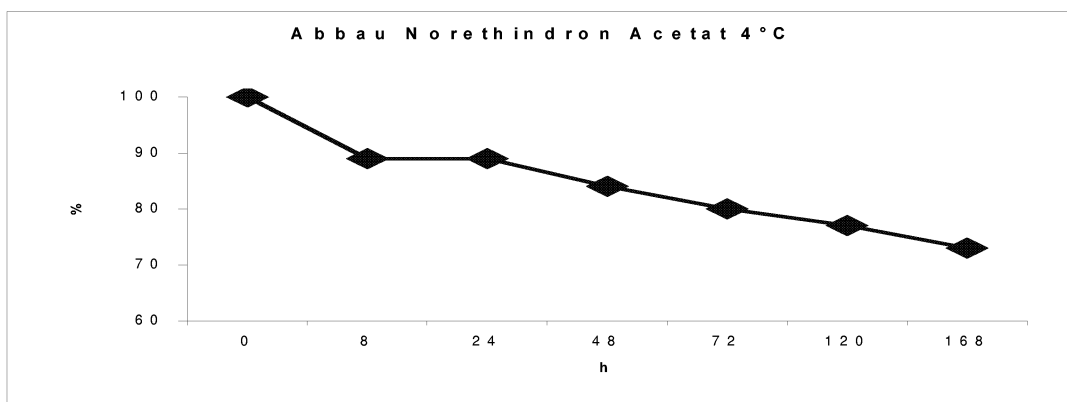
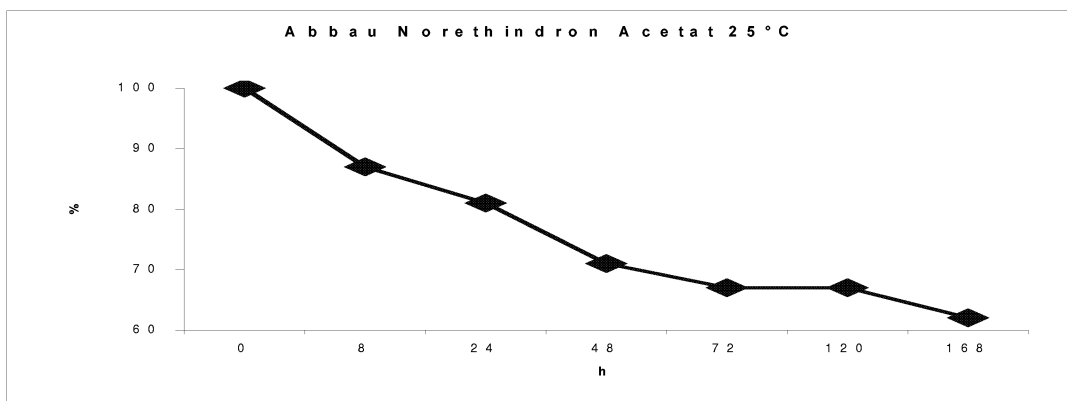


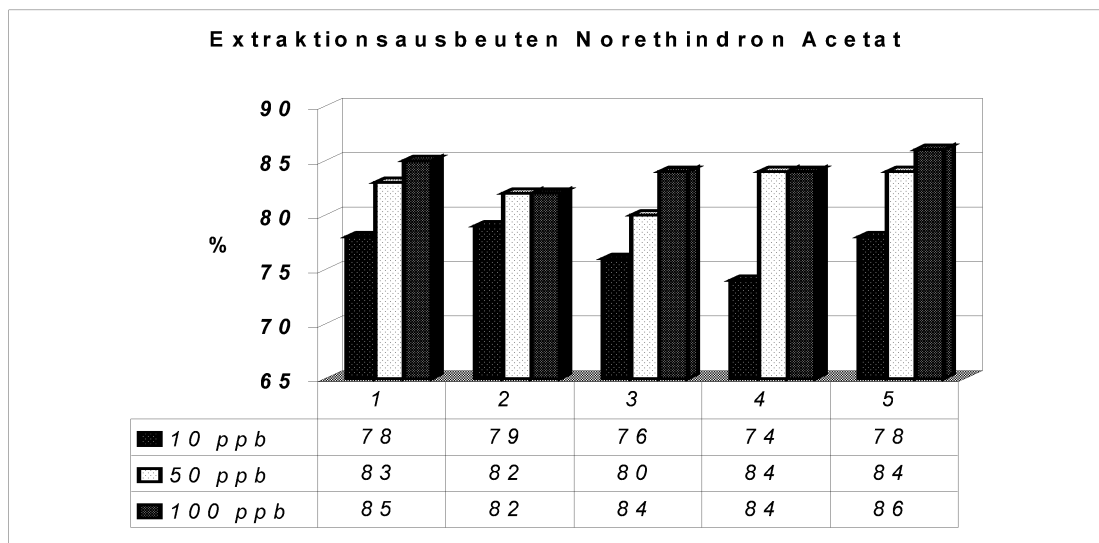
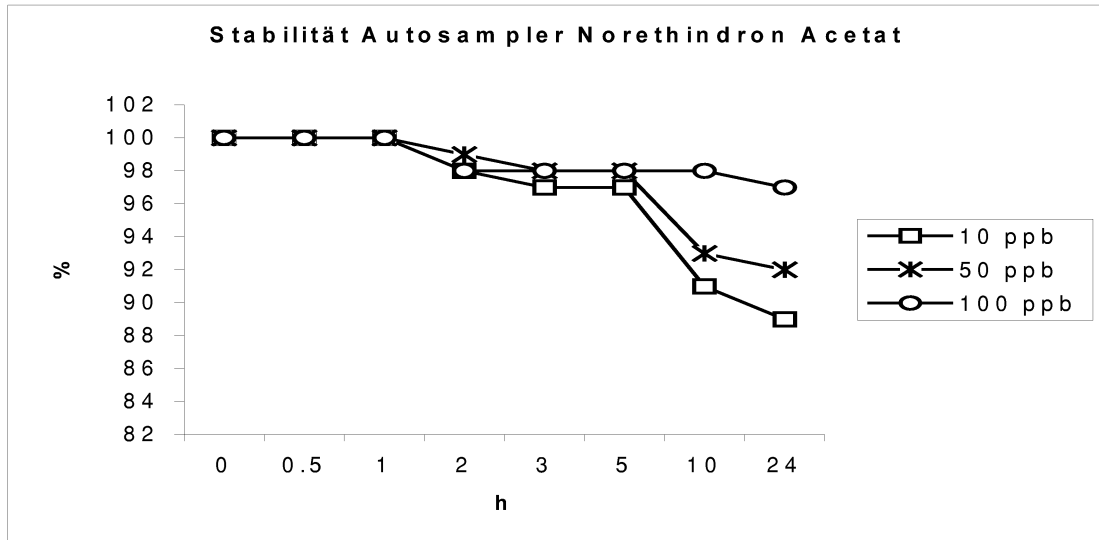
Quantifizierungslimit(LOQ) Ethisteron		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	9.899256547	13
10 ppb	9.372036623	14
10 ppb	9.515276609	12
10 ppb	9.176007969	15
10 ppb	9.017318105	15
10 ppb	9.081041706	14
10 ppb	8.802620055	16
10 ppb	9.849058733	14
10 ppb	10.53868335	15
10 ppb	8.177195301	16
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.342849499	-6.571505005	7.027176809



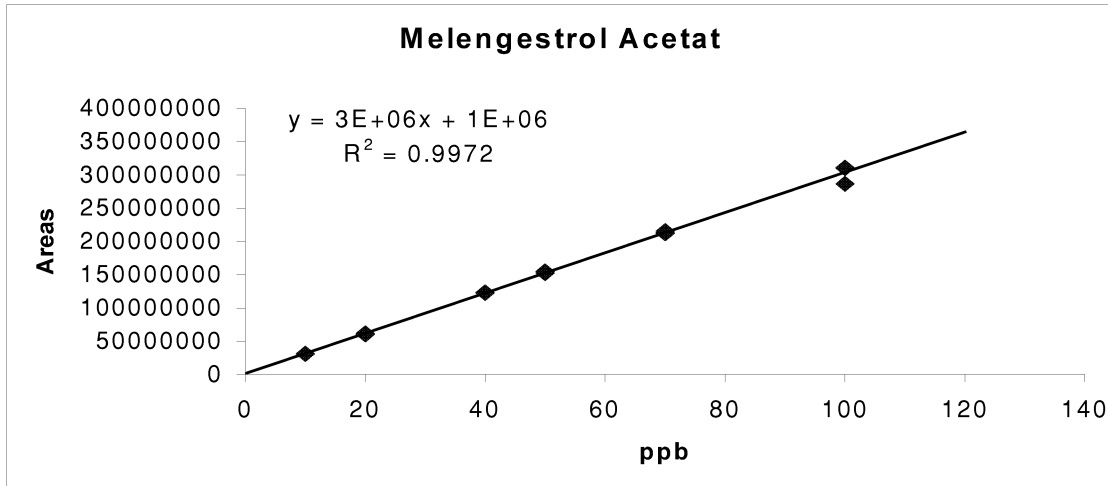
Norethindron Acetat					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	6827573	9.02	9.70	-3.04	7.00
10	7807899	10.37			
10	7317736	9.70			
20	13661973	18.48	19.62	-1.91	6.40
20	15459641	20.96			
20	14342763	19.42			
40	31231598	42.79	40.05	0.12	7.02
40	27173740	37.17			
40	29344122	40.18			
50	34158347	46.84	50.14	0.28	6.52
50	38883339	53.38			
50	36588681	50.20			
70	51238788	70.48	71.60	2.29	4.17
70	54499138	74.99			
70	50419202	69.34			
100	68316694	94.11	98.90	-1.10	4.23
100	73100677	100.73			
100	73909135	101.85			

Norethindron Acetat Qualifier Set 1			Norethindron Acetat Qualifier Set 1			Norethindron Acetat Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	12.00	20.0	10.0	9.99	-0.1	10.0	10.48	4.8
50.0	52.66	5.3	50.0	49.40	-1.2	50.0	48.34	-3.3
100.0	101.00	1.0	100.0	99.22	-0.8	100.0	99.37	-0.6
10.0	9.35	-6.5	10.0	9.36	-6.4	10.0	11.10	11.0
50.0	54.10	8.2	50.0	53.00	6.0	50.0	52.94	5.9
100.0	101.28	1.3	100.0	101.33	1.3	100.0	100.30	0.3
10.0	9.22	-7.8	10.0	9.27	-7.3	10.0	10.39	3.9
50.0	51.37	2.7	50.0	52.74	5.5	50.0	51.95	3.9
100.0	102.33	2.3	100.0	103.36	3.4	100.0	106.31	6.3



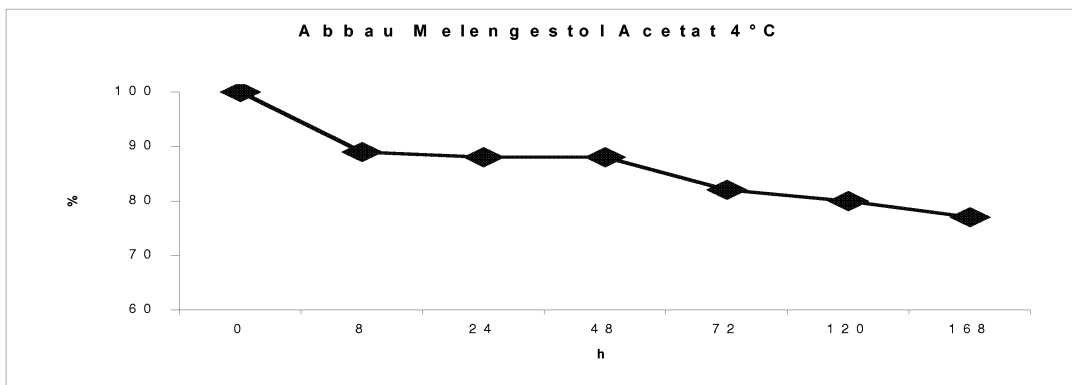
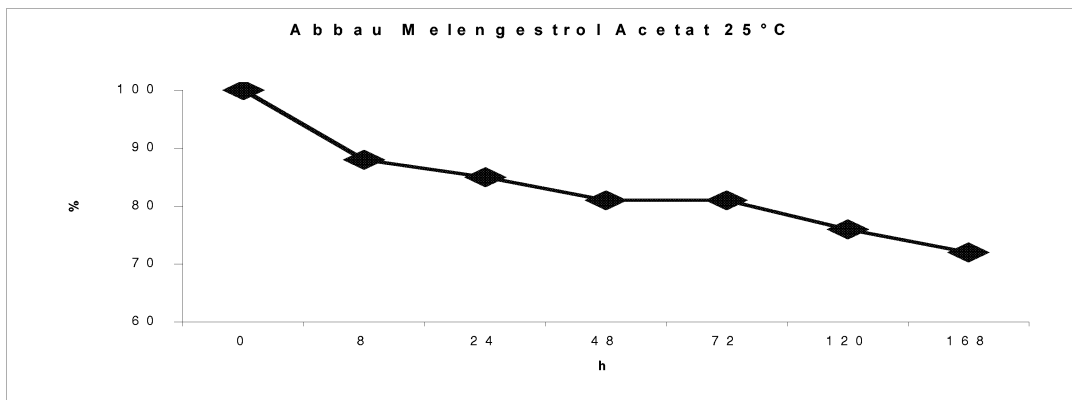


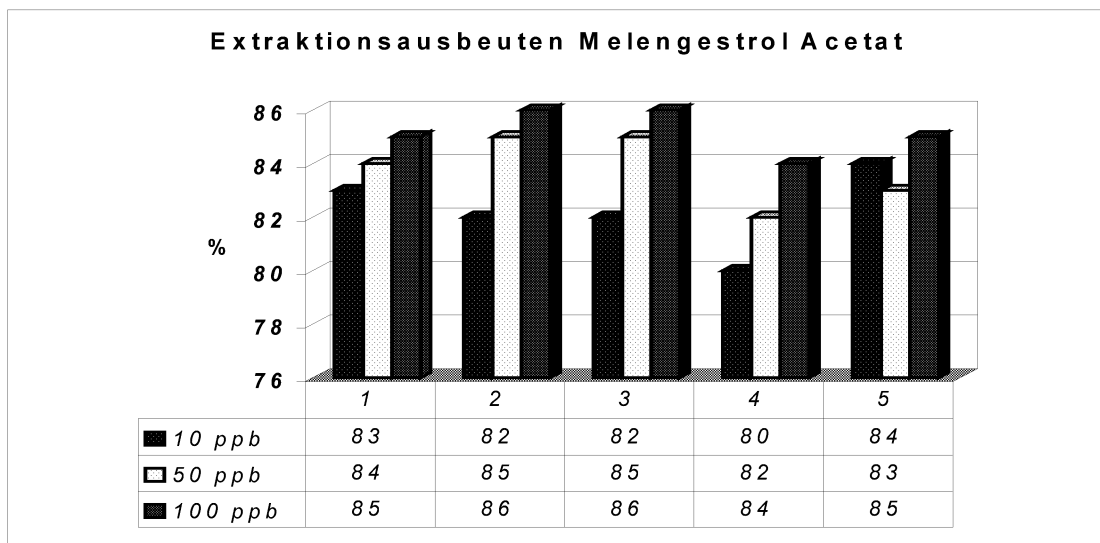
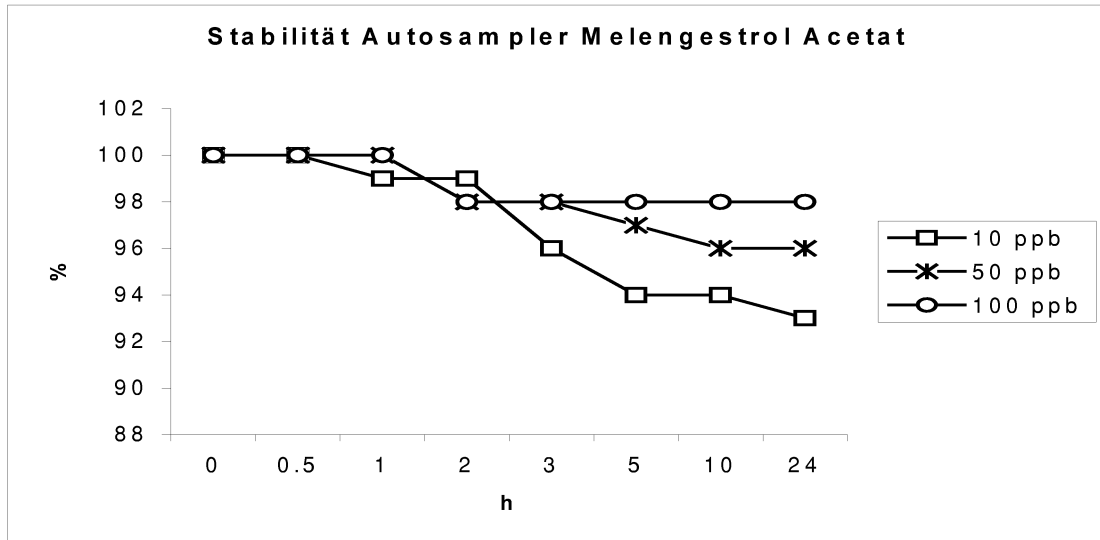
Quantifizierungslimit(LOQ) Norethindron Acetat		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	9.812634361	11
10 ppb	9.381184627	12
10 ppb	8.686869802	10
10 ppb	8.626567654	10
10 ppb	8.809527732	12
10 ppb	9.919049916	13
10 ppb	8.992487809	12
10 ppb	9.083967848	13
10 ppb	9.559477356	16
10 ppb	9.23033591	13
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.210210301	-7.897896985	4.92979008



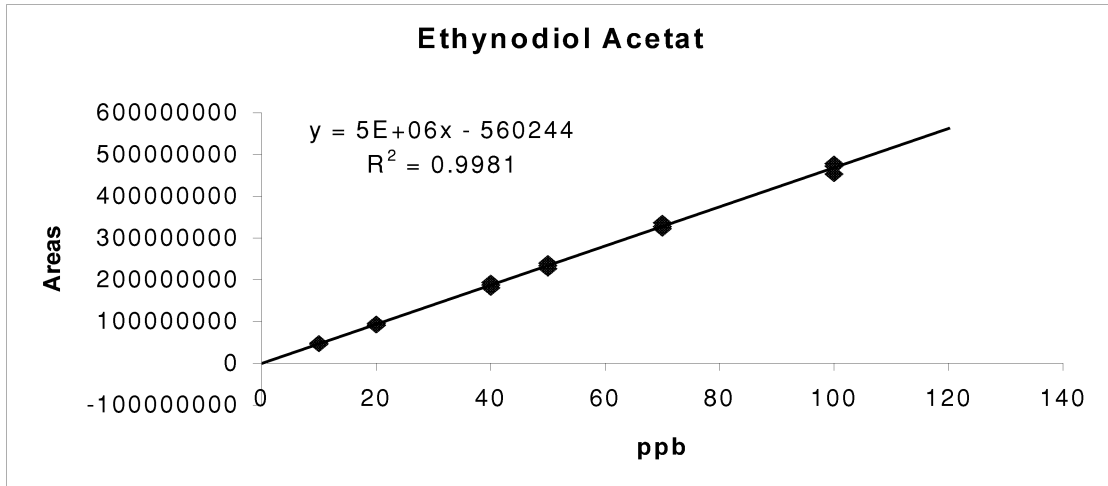
Melengestrol Acetat					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	30997131	10.00	9.93	-0.69	0.68
10	30589370	9.86			
10	30793251	9.93			
20	62025260	20.34	19.99	-0.03	1.52
20	60566952	19.86			
20	60354771	19.78			
40	122357479	40.45	40.69	1.72	0.51
40	123368582	40.79			
40	123480935	40.83			
50	155078648	51.36	50.93	1.86	0.90
50	152335061	50.45			
50	153966253	50.99			
70	215614340	71.54	70.92	1.32	0.82
70	213513801	70.84			
70	212165496	70.39			
100	310157296	103.05	100.51	0.51	4.63
100	286389915	95.13			
100	311011830	103.34			

Melengestrol Acetat Qualifier Set 1			Melengestrol Acetat Qualifier Set 1			Melengestrol Acetat Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
ppb								
10.0	11.65	16.5	10.0	10.34	3.4	10.0	12.00	20.0
50.0	48.76	-2.5	50.0	51.49	3.0	50.0	47.90	-4.2
100.0	98.31	-1.7	100.0	98.72	-1.3	100.0	107.54	7.5
10.0	10.65	6.5	10.0	11.36	13.6	10.0	9.45	-5.5
50.0	51.35	2.7	50.0	53.21	6.4	50.0	54.00	8.0
100.0	99.43	-0.6	100.0	104.86	4.9	100.0	99.35	-0.7
10.0	8.99	-10.1	10.0	8.67	-13.3	10.0	9.54	-4.6
50.0	50.20	0.4	50.0	48.79	-2.4	50.0	46.00	-8.0
100.0	101.98	2.0	100.0	101	1.0	100.0	93.87	-6.1



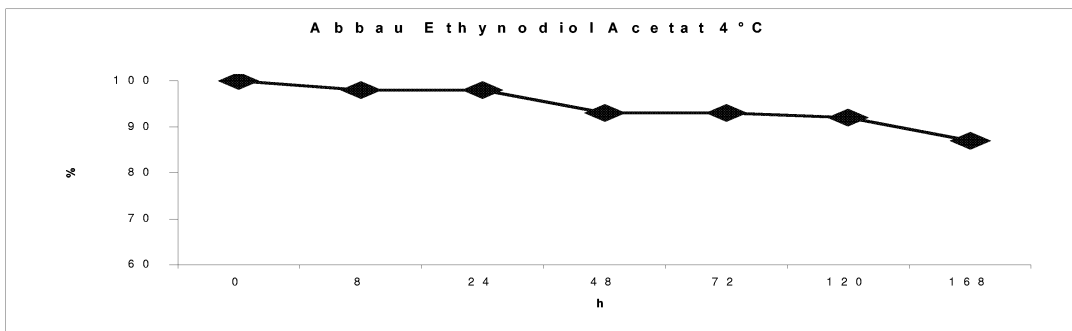
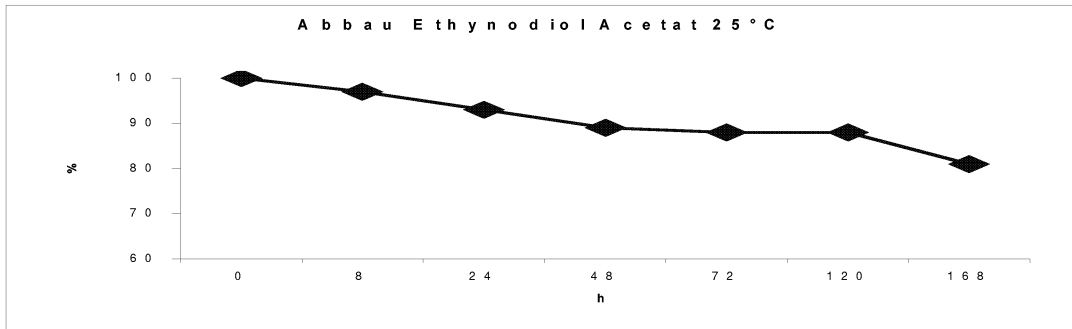


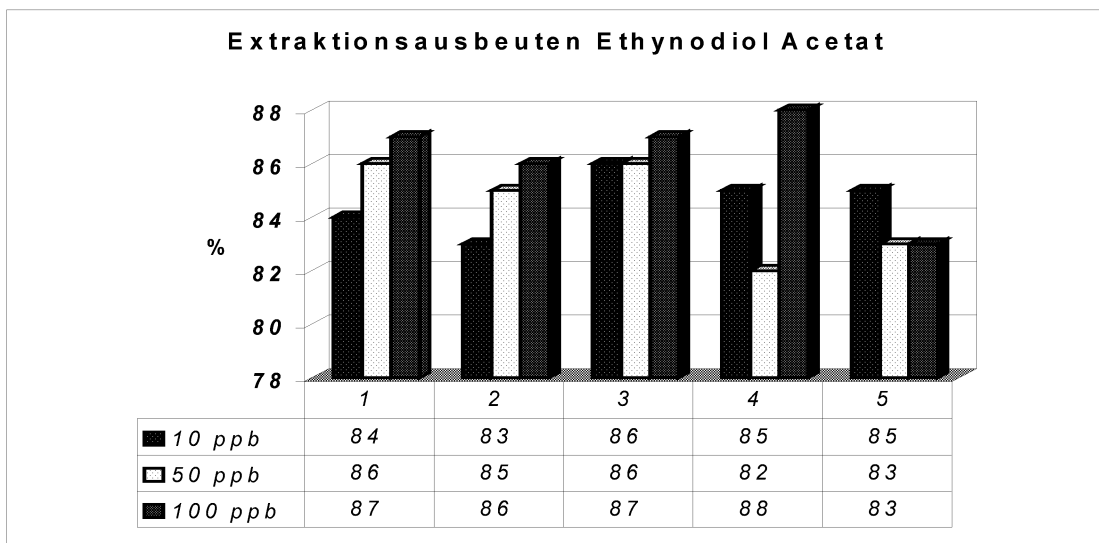
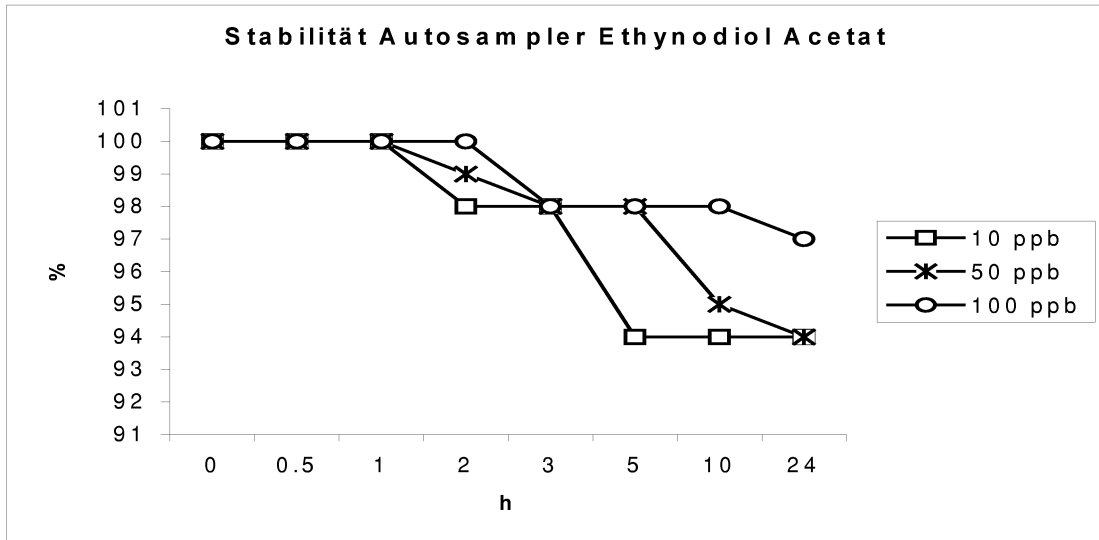
Quantifizierungslimit(LOQ)Melengestrol Acetat		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	9.045729192	14
10 ppb	10.37859336	13
10 ppb	8.902288491	14
10 ppb	10.43128586	15
10 ppb	8.660232308	14
10 ppb	8.633337177	13
10 ppb	9.834287126	16
10 ppb	8.42714117	15
10 ppb	8.265770381	17
10 ppb	7.853378367	16
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
9.043204343	-9.567956573	9.800897597



Ethynodiol Diacetat					
soll(ppb)	Area gemessen	kalkuliert	Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
10	45256064	9.16	9.46	-5.35	3.19
10	48272649	9.77			
10	46764357	9.46			
20	90557385	18.22	18.63	-6.84	2.83
20	95579845	19.23			
20	91658139	18.44			
40	193090595	38.73	37.49	-6.26	3.47
40	180119136	36.14			
40	187525070	37.62			
50	226416089	45.40	46.82	-6.36	2.99
50	240397791	48.19			
50	233821783	46.88			
70	327444024	65.60	65.88	-5.88	2.27
70	336943089	67.50			
70	322206417	64.55			
100	452832179	90.68	93.68	-6.32	2.85
100	478391605	95.79			
100	472320001	94.58			

Ethinodiol Diacetat Qualifier Set 1			Ethinodiol Diacetat Qualifier Set 1			Ethinodiol Diacetat Qualifier Set 1		
Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit	Soll	kalkuliert	Richtigkeit
ppb	ppb		ppb	ppb		ppb	ppb	
10.0	9.35	-6.5	10.0	9.34	-6.6	10.0	11.50	15.0
50.0	47.45	-5.1	50.0	47.88	-4.2	50.0	48.89	-2.2
100.0	102.32	2.3	100.0	98.49	-1.5	100.0	99.45	-0.5
10.0	9.49	-5.1	10.0	8.95	-10.5	10.0	9.19	-8.1
50.0	50.15	0.3	50.0	52.20	4.4	50.0	51.94	3.9
100.0	102.40	2.4	100.0	102.31	2.3	100.0	100.61	0.6
10.0	10.33	3.3	10.0	8.90	-11.0	10.0	10.54	5.4
50.0	50.48	1.0	50.0	50.30	0.6	50.0	51.87	3.7
100.0	102.3	2.3	100.0	103.23	3.2	100.0	99.64	-0.4





Quantifizierungslimit(LOQ) Ethynodiol Diacetat		
Zielkonzentration	gerechnete Konzentration	S/N
10 ppb	8.9552719	12
10 ppb	8.730876854	13
10 ppb	8.902288491	16
10 ppb	9.165143575	16
10 ppb	9.526255539	15
10 ppb	8.460670434	16
10 ppb	8.284955575	17
10 ppb	10.1125694	15
10 ppb	8.100454974	16
10 ppb	7.696310799	14
Mittelwert	Richtigkeit	Präzision
8.793479754	-12.06520246	8.050592857

31. Literatur

- 1 Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften eine Entscheidung der Kommission zur Festlegung der Analysenverfahren zum Nachweis von Rückständen von Stoffen mit hormonaler Wirkung und von Stoffen mit thyreostatischer Wirkung vom 18. Juli 1987 (87/410/EWG).
- 2 STARCEVIC, B.; CATLIN, F.; Di stefano, E.; Quantitative determination of anabolic steroid conjugates in human urine by LC/MS/MS, The 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1.-5.Juni, 1997, Palm Springs (CA).
- 3 RULE, G. S.; HENION, J., High-throughput sample analysis using a 96-well SPE system with LC/MS/MS, The 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1.-5.Juni, 1997, Palm Springs (CA).
- 4 YANG, E.; ZWEIGENBAUM, J.; HENION, J., Isolation, detection and identification of steroidal components in human urine by affinity ultrafiltration coupled with LC/MS, The 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1.-5.Juni, 1997, Palm Springs (CA).
- 5 DRAISCI, R.; GIANETTI, L.; LUCENTINI, L.; PALLESCI, L.; PURIFICATO, I.; MORETTI, G., Confirmation of anabolic hormone residues in bovine blood by micro-HPLC-Ion Spray-tandem mass spectrometry, J. High Res. Chromatogr. 1997, 20, 421-426.
- 6 SCHAFF, J. E.; BOWERS, L. D.; Structure Function Relationships in the ESI-MS-MS fragmentation of free and conjugated steroids: a tool for qualitative steroids analysis, The 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 31.Mai-4.Juni, 1998, Orlando (FL).
- 7 FISCHER, S. M.; MILLER, C. A., Development of LC/MS analyses for prednisone and its metabolites, The 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 31.Mai-4.Juni, 1998, Orlando (FL).
- 8 ZHANG, H.; HENION, J.; Quantitative determination of estrogen sulfates by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using 96-well technology, The 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 31.Mai-4.Juni, 1998, Orlando (FL).
- 9 FRITSCHES, S.; et. al., Natural hormone patterns of meat from steers and bulls depending on slaughter age, Z Lebensm Unters Forsch A (1998) 207:183-188
- 10 GINKEL, van L.A.; et.al., Liquid chromatographic purification and detection of anabolic compounds, Journal of Chromatography, 624 (1992) 389-401, Review
- 11 VANOOSTHUYZE, K.; et.al., Survey of Hormones Used in Cattle Fattening Based on the Analysis of Belgian Injection Sites, Analyst, December 1994, Vol 119, 2655-2658
- 12 DAESELEIRE, E.; et.al., Applikation of high-performance thin-layer chromatography and gas chromatography-mass spectrometry to the detection of new anabolic steroids used as growth promoters in cattle fattening, Journal of Chromatography A, 674 (1994) 247-253
- 13 ANDRESEN, M.; FESSER, A.C.E., Liquid Chromatographic Determination of Progesterons in Animal Fat, Journal of AOAC International, Vol. 79, No.5, 1996, 1037-1042
- 14 SAVU, S.R.; et.al., A Confirmatory HPLC-MS/MS Method for Ten Synthetic Corticosteroids in Bovine Urines, Journal of Mass Spectrometry, Vol. 31, 1351-1363 (1996)
- 15 WILLIAMS, T.M.; et.al., Electrispray Collision-induced Dissociation of Testosterone and Testosterone Hydroxy Analogs, Journal of Mass Spectrometry 34, 206-216 (1999)
- 16 LOPEZ, L.L.; et.al., Automated Strategies for Obtaining Standardized Collisionally Induced Dissociation Spectra on a Benchtop Ion Trap Mass Spectrometer, Rapid Commun. Mass Spectrom. 13, 663-668 (1999)
- 17 Seifert, M.; et.al., A new concept for the bioeffects-related analysis of xenoestrogens: Hyphenation of receptor assays with LC-MS, Fresenius J Anal Chem (1999) 363:767-770
- 18 PARIS, A.; et.al., Analysis of 3H-Estradiol-17beta Metabolites in Calf Perirenal Fat, Analyst, December 1994, Vol 119, 2623-2626
- 19 CUNNIFF, J.; et.al., Quantitative Analysis of Steroids in Complex Matrices by LC/MS/MS on an Ion Trap, Finnigan MAT, San Jose, CA
- 20 WELZ, W.; PITTENAUER, E., Analysis of estrogens by NI-ESI-MS, LE-CID, HE-CID and LC/MS, The 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 13.-17.Juni, 1999, Dallas (TX)