

Einfluß einer Behandlung mit dem Steroid-Implantat Synovex-S auf das natürliche Steroidhormonmuster des Muskel- und Fettgewebes von Ochsen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg

aus dem Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
Abteilung Lebensmittelchemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von **Gabi Schmidt** aus Hamburg

Hamburg 2001

Diese Arbeit wurde in der Zeit von April 1998 bis Juni 2001 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. H. Steinhart

Prof. Dr. B. Bisping

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2001

Meinen Eltern

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. B. Bisping danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Besonderer Dank sei Prof. Dr. T. S. Rumsey und dem Agricultural Research Service für die Durchführung des Tierversuchs und die Bereitstellung des Probenmaterials ausgesprochen.

Prof. Dr. R. Claus danke ich für die Einweisung in den Radioimmunoassay und für die nette Aufnahme in Stuttgart. Ebenso danke ich Herrn Dr. Markus Lacorn für sein Interesse an dieser Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft. Elgin Führmann und Sibylle Knöllinger sei für Ihre praktische Anleitung für den RIA gedankt.

Ein besondere Dank gilt Antje Frickenschmidt, Matthias Denker und Patrick Nelson für die Unterstützung.

Bei Kerstin Fleischer möchte ich mich für die nette und konstruktive Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Dr. Mirko Bunzel, Frau Angelika Lahrssen danke ich recht herzlich für die Durchsicht des Skripts.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. Sonja Fritsche für Kritik und Anregungen .

Herrn Dr. Mathias Hartwig danke ich für die Hilfe bei der GC-MS-Wartung sowie die Hilfestellung bei auftretenden Problemen.

Der H. Wilhelm Schaumann-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung meines USA-Aufenthaltes.

Ein besondere Dank gilt meinen Eltern, ohne die diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1 Hintergrund	1
2 Grundlagen	3
2.1 Steroide	3
2.1.1 Struktur	3
2.1.2 Biosynthese und Einteilung	3
2.1.3 Transport, Wirkung, Abbau	5
2.1.4 Steroidfettsäureester	7
2.2 Steroide in Rindergeweben	9
2.2.1 Muskelgewebe	9
2.2.2 Fettgewebe	10
2.3 Anabolika in der Rindermast	11
2.3.1 Einsatz von Anabolika	11
2.3.2 Synovex-S	12
2.3.3 Risikobewertung	14
2.3.4 Nachweis einer Anabolikabehandlung in Geweben	15
3 Material	17
3.1 Tierversuch – Probenmaterial	17
3.2 Auswahl der Steroide	19
4 Methodik	20
4.1 Auswahl der Methode zur Bestimmung von Steroiden in Muskelgewebe	20
4.2 Analysenverfahren zur Bestimmung der Sexualhormone und Corticoide in Muskelgewebe	21
4.2.1 Probenvorbereitung	21
4.2.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie	22
4.3 Bestimmung des Fettgehaltes von Muskelgewebe	23
4.4 Statistische Auswertung	24
5 Zielsetzung und Versuchsplanung	25
6 Methodenentwicklung: Durchführung, Ergebnisse und Diskussion	26
6.1 Freisetzung von Steroiden aus ihren Fettsäureestern	26
6.1.1 Enzymatische Hydrolyse der Steroidfettsäureester	26
6.1.2 Chemische Hydrolyse der Steroidfettsäureester - Umesterung	28
6.1.3 Chemische Hydrolyse der Steroidfettsäureester - Verseifung	30
6.1.4 Auswahl der geeigneten Methode zur Freisetzung von Steroiden aus Fettsäureestern	31

6.2 Nachweis von Steroiden und deren Fettsäureestern im unpolaren Extrakt des Muskelgewebes	31
6.2.1 Unpolare Extraktion	31
6.2.2 Behandlung des polaren Extraktes (Methanol/Wasser)	32
6.2.3 Behandlung des unpolaren Extraktes (Ethylacetat/ <i>n</i> -Hexan)	32
6.2.3.1 Freisetzung der Steroide aus Steroidfettsäureestern	32
6.2.3.2 Clean-up des unpolaren Extraktes	33
6.2.4 Untersuchung von Proben	35
6.2.4.1 Nachweis von Fettsäureestern im Muskelgewebe	35
6.2.4.2 Vergleich der Steroidgehalte des unpolaren und polaren Extraktes von Muskelgewebe	36
6.3 Bestimmung von Steroiden in Fettgewebe	39
6.3.1 Wahl der Probenmenge und Extraktion der Steroide aus Fettgewebe	40
6.3.1.1 Wahl der Probenmenge	40
6.3.1.2 Extraktion der Steroide	40
6.3.2 Säulenchromatographie	41
6.3.3 Reinigung der Fraktion der freien Steroide	42
6.3.4 Umesterung und Reinigung der Fraktion der Steroidfettsäureester	42
6.3.5 Ermittlung von Methodenparametern für die Bestimmung freier Steroide in Fettgewebe	42
6.3.5.1 Linearitätsbereich	43
6.3.5.2 Bestimmung von Wiederfindungsraten und Verfahrensvariationskoeffizienten	44
6.3.5.3 Grenze des praktischen Arbeitsbereiches	46
6.3.6 Nachweis von Steroidfettsäureestern in Fettgewebe	47

7 Untersuchung des Tierversuchs - Ergebnisse und Diskussion	49
7.1 Muskelgewebe	49
7.1.1 Muskelgewebe - Fettgehalt	49
7.1.2 Muskelgewebe - polarer Extrakt	51
7.1.3 Muskelgewebe - unpolarer Extrakt	63
7.1.4 Muskelgewebe - Gesamtsteroid	65
7.1.5 Statistische Betrachtung - Unterscheidung von unbehandelten und mit Synovex-S behandelten Ochsen durch Untersuchung des Muskelgewebes	66
7.1.6 Statistische Betrachtung - Korrelationen zwischen Steroidgehalten, Fettgehalt und Schlachtgewicht	68
7.2 Auf dem MLD aufliegendes Fettgewebe	71
7.2.1 Statistische Betrachtung - Unterscheidung von behandelten und unbehandelten Ochsen durch Untersuchung des Fettgewebes	77
7.2.2 Statistische Betrachtung - Korrelationen zwischen Steroidgehaltendes Fettgewebes und Schlachtgewicht	79
7.3 Vergleich der Steroidgehalte von Muskel- und Fettgewebe	80
7.4 Einfluß der Synovex-S Behandlung auf die Steroidhormonmuster und -gehalte von Muskel- und Fettgewebe	84

8 Zusammenfassung	86
8.1 Zusammenfassung	86
8.2 Summary	87
9 Anhang	89
9.1 Schlachtgewichte der Ochsen	89
9.1.1 Lebendgewicht am Anfang des Versuchs und am Schlachttag	89
9.1.2 Ausschlachtgewichte	89
9.2 Standardlösungen	90
9.2.1 Standardsubstanzen Steroide	90
9.2.2 Standardsubstanzen Steroidfettsäureester	90
9.2.3 Standardlösungen für Messungen am GC-FID	91
9.2.4 Standardlösungen für die Versuche zur Hydrolyse von Steroidfettsäureestern	91
9.2.5 Standardlösungen für GC-MS im SIM-Mode	91
9.2.6 Erstellung der Kalibriergeraden	92
9.2.6.1 Durchführung	92
9.2.6.2 Konzentrationen	93
9.2.6.3 Dotierung und Ermittlung von Wiederfindungsraten	94
9.2.6.4 Linearer Meßbereich im Muskelgewebe	95
9.2.6.5 Grenzen des praktischen Arbeitsbereiches für die Steroidbestimmung im Muskelgewebe	95
9.3 Validierung der Methode für die Bestimmung von Steroidhormonmustern im Fettgewebe	95
9.4 Geräte und Meßbedingungen	96
9.4.1 GC-FID	96
9.4.2 GC-MSD	96
9.5 SIM-Massen der Steroid-Enolether	97
9.6 Chromatogramme der Standardlösungen	99
9.7 Methode zur Bestimmung von Steroidhormonen (Corticoide, Androgene, Estrogene, Gestagene) in Muskelgewebe	100
9.7.1 Chemikalien	100
9.7.2 Geräte	100
9.7.3 Durchführung	101
9.7.3.1 Probenvorbereitung	101
9.7.3.2 Extraktion der Steroide aus dem Gewebe	101
9.7.3.3 Entfettung	101
9.7.3.4 Fraktionierung über RP-8 Fertigkartusche	101
9.7.3.5 Extraktion der Estrogene	102
9.7.3.6 Reinigung der Androgen/Gestagen-Fraktion mittels Si-Fertigkartuschen	102
9.7.3.7 Reinigung der Estrogen-Fraktion mittels Amino-Fertigkartuschen	102
9.7.3.8 Reinigung der Corticoid-Fraktion mittels Si-Fertigkartuschen	102
9.8 Methode zur Bestimmung von Steroidhormonen und deren Fettsäureestern in Muskelgewebe	103
9.8.1 Chemikalien	103

9.8.2	Geräte	103
9.8.3	Durchführung	103
9.8.3.1	Extraktion der Steroidfettsäureester und der unpolaren Steroide	103
9.8.3.2	Freisetzung der Steroide aus den Fettsäureestern	103
9.8.3.3	Entfettung der freigesetzten Steroide mit Hilfe einer Si-Kartusche	104
9.8.3.4	Weitere Reinigung des Extraktes	104
9.9	Methode zur Bestimmung von Steroidhormonen (Corticoide, Androgene, Estrogene, Gestagene) in Fettgewebe	104
9.9.1	Chemikalien	104
9.9.2	Geräte	104
9.9.3	Durchführung	104
9.9.3.1	Probenvorbereitung	104
9.9.3.2	Extraktion der Steroidhormone und deren Fettsäureester aus dem Gewebe	104
9.9.3.3	Entfettung mittels Kieselgelsäule	105
9.9.3.4	Entfettung mittels flüssig-flüssig Extraktion	105
9.9.3.5	Freisetzung der Steroide aus deren Fettsäureestern	105
9.10	Derivatisierung zu Silylenolethern	106
9.11	Hydrolyse von Steroidfettsäureestern	106
9.11.1	Eingesetzte Chemikalien	106
9.11.2	Durchführung	107
9.11.2.1	Enzymatische Hydrolyse	107
9.11.2.2	Umesterung	107
9.11.2.3	Verseifung	107
9.11.3	Derivatisierung und Auswertung	107
9.11.4	Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Matrixumsetzung	107
9.12	Steroidgehalte der untersuchten Gewebe	108
9.12.1	Steroidgehalte der unpolaren Extrakte Muskelgewebes-umgeestert und nicht umgeestert	108
9.12.2	Steroidgehalte der polaren Extrakte des Muskelgewebes (MLD)	109
9.12.3	Steroidgehalte der unpolaren Extrakte des Muskelgewebes (MLD)	111
9.12.4	Gesamtsteroidgehalte des Muskelgewebes (MLD)	113
9.12.5	Steroidgehalte des Fettgewebes (MLD)	115
9.13	Chemikalien	117
10	Literatur	118

1 Hintergrund

Steroidhormone sind sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich weit verbreitet. Sie werden endogen gebildet, um bestimmte Stoffwechselfvorgänge zu kontrollieren. Einige Steroidhormone weisen eine anabole Wirkung auf. Dies bedeutet, daß durch diese Steroidhormone Stoffwechselfunktionen angeregt werden, die in den meisten Fällen zu einer verstärkten Proteinbildung einher gehend mit einem verstärkten Muskelaufbau führen (LONE, 1997). Aus diesem Grund werden Steroidhormone seit langem zur Steigerung der Mastleistung in der Tiermast eingesetzt.

In den letzten Jahren ist speziell der Einsatz von Anabolika in der Rindermast im Gespräch. Insbesondere der darauf basierende Handelsstreit zwischen Europäischer Union (EU) und USA machte Schlagzeilen. In den USA ist der Einsatz von Anabolika zugelassen, während die Anabolikabehandlung von Rindern sowie die Einfuhr von Fleisch behandelte Rinder von der EU nicht gebilligt wird. Seit 1981 ist durch die von der Europäischen Kommission erlassene Direktive 81/602 der Einsatz von Hormonen in der Rindermast mit Ausnahme von therapeutischen Zwecken verboten. 1984 wurde in Betracht gezogen, die Direktive 81/602 zugunsten der Zulassung von Hormonen zu ändern. Kurz darauf wurden sogar trotz des Verbotes für fünf Substanzen Grenzwerte für Fleisch erlassen.

1985 änderte die EU ihren Kurs und verbot den Einsatz von Hormonen in der Rindermast generell. Es wurde ein Importverbot für Fleisch behandelte Tiere erlassen. Dieses wurde 1988 durch ein allgemeines Importverbot für Fleisch aus den USA verschärft. Die USA klagten dagegen vor der Welthandelsorganisation (WTO) in Genf und bekamen Recht. Der EU wurde eine Frist gesetzt, um das Importverbot aufzuheben. Diese lief am 13.5.1999 ab, ohne daß die EU Schritte in diese Richtung unternommen hätte (FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE (FAS), 1999a).

Die EU begründet ihre Weigerung, den Import von Fleisch aus den USA zuzulassen mit der gesundheitlichen Bedenklichkeit des Verzehrs von Fleisch hormonbehandelte Rinder. Die USA führen gegenteilige Gutachten für ihre Argumentation an. Als Argument für die gesundheitliche Unbedenklichkeit von Fleisch behandelte Rinder wird von den USA die Abhängigkeit der gesundheitsschädlichen Wirkung von der aufgenommenen Menge angeführt.

Für den Einsatz in der Rindermast sind in den USA sechs anabol wirksame Substanzen zugelassen. Es handelt sich dabei um drei synthetische und drei körpereigene Stoffe. Bei den drei natürlichen handelt es sich um die Steroidhormone 17 β -Estradiol, Progesteron und Testosteron, bei den synthetischen um Zeranol, Melengestrol und Trenbolon. 17 β -Estradiol wirkt carcinogen und steht im Verdacht, genotoxisch zu wirken, während Testosteron und Progesteron eher als unbedenklich angesehen werden. Für die synthetischen Anabolika liegen noch zu wenig Daten für eine abschließende Risikoabschätzung vor (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA), 1999).

Da ein Importverbot für Fleisch anabolikabehandelte Rinder besteht, muß eine Kontrolle des Nahrungsmittels Fleisch möglich sein. Der Nachweis der drei körperfremden Substanzen ist relativ einfach. Der Nachweis der drei natürlichen Steroide gestaltet sich

schwierig, da applizierte Steroide nicht von endogenen differenziert werden können. Ein Nachweis anhand von Grenzwerten einzelner Steroide ist nicht möglich, da sich die individuellen Steroid-Syntheseraten der Tiere stark unterscheiden. Einen Ansatzpunkt für den Nachweis des Einsatzes natürlicher Steroide liefert die Bestimmung von Steroidhormonmustern. Steroidhormonmuster umfassen dabei Vorstufen der eingesetzten Steroide, die eingesetzten Steroide selbst sowie deren Metaboliten.

Ziel dieser Arbeit war es, Steroidhormonmuster von Geweben von Ochsen zu ermitteln, die mit Synovex-S behandelt wurden und diese den Steroidhormonmustern unbehandelter Ochsen gegenüber zu stellen. Bei Synovex-S handelt es sich um ein Präparat, bestehend aus den natürlichen Steroiden Estradiol und Progesteron. Anhand dieser Daten sollten Einblicke in den Metabolismus und die Verteilung der eingesetzten Steroide in die Gewebe gewonnen und Aussagen über die Bedenklichkeit des Verzehrs dieser Gewebe getroffen werden.

2 Grundlagen

2.1 Steroide

2.1.1 Struktur

Steroide bestehen aus einem Ringsystem, in dem drei sechsgliedrige und ein fünfgliedriger Kohlenstoffring miteinander kondensiert sind. Die Benennung der Ringe sowie die Nummerierung der Kohlenstoffatome sind in **Abbildung 1** am Beispiel des Cholesterins als Vorstufe aller Steroide dargestellt. Cholesterin wird sowohl vom Körper produziert als auch über die Nahrung aufgenommen.

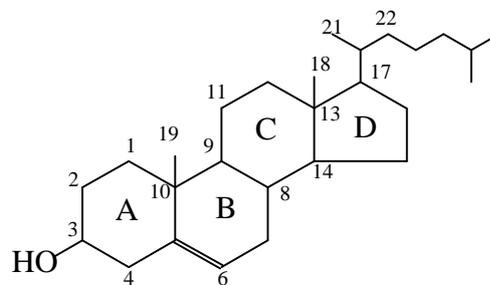


Abbildung 1 – Benennung der Ringe und Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Cholesterin

Bei den Steroidhormonen liegt in Position 3 immer eine Hydroxy- oder eine Ketogruppe vor. Die Seitenkette in Position 17 kann fehlen. In diesem Fall ist dort ebenfalls eine Hydroxy- oder Ketogruppe lokalisiert. Auch an der Seitenkette können funktionelle Sauerstoffgruppen auftreten ebenso wie eine zusätzliche Hydroxygruppe an Position 17 beim Vorliegen einer Seitenkette.

Doppelbindungen treten bei den natürlichen Steroiden zwischen den Kohlenstoffatomen 3 und 4 oder 5 und 6 auf. Bei den Estrogenen liegt Ring A als phenolisches System vor.

Steroide treten sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Organismen auf. In tierischen Organismen kommen sie hauptsächlich als Gallensäuren, Sexualhormone, Glucocorticoide und Mineralcorticoide vor.

2.1.2 Biosynthese und Einteilung

Steroidhormone werden bei höheren Wirbeltieren ausschließlich aus Cholesterin gebildet. Das für die Sexualhormonproduktion benötigte Cholesterin stammt größtenteils aus dem Blutplasma, wird zum Teil aber auch in den endokrinen Organen direkt synthetisiert. Die aus Cholesterin gebildete Vorstufe ist Pregnenolon. Es entsteht durch oxidative Kürzung der Seitenkette des Cholesterins um 6 Kohlenstoffatome. Aus Pregnenolon wird Progesteron, das einzige natürliche Gestagen, gebildet. Aus diesen Vorstufen werden

sowohl die Corticoide, die ebenfalls 21 Kohlenstoffatome umfassen, als auch die Androgene gebildet. Bei den Androgenen handelt es sich um Steroide mit einem Grundgerüst bestehend aus 19 Kohlenstoffatomen, aus denen durch Aromatisierung des A-Ringes die Gruppe der Estrogene gebildet wird. Sie werden aus Pregnenolon über den sogenannten Δ^4 -Weg oder den Δ^5 -Weg gebildet. Der Δ^4 -Weg verläuft über Progesteron, 17α -Hydroxyprogesteron und Androstendion zu Testosteron, der Δ^5 -Weg über Pregnenolon, 17α -Hydroxypregnenolon und Dehydroepiandrosteron (DHEA) zu Testosteron (FORTH et al., 1977).

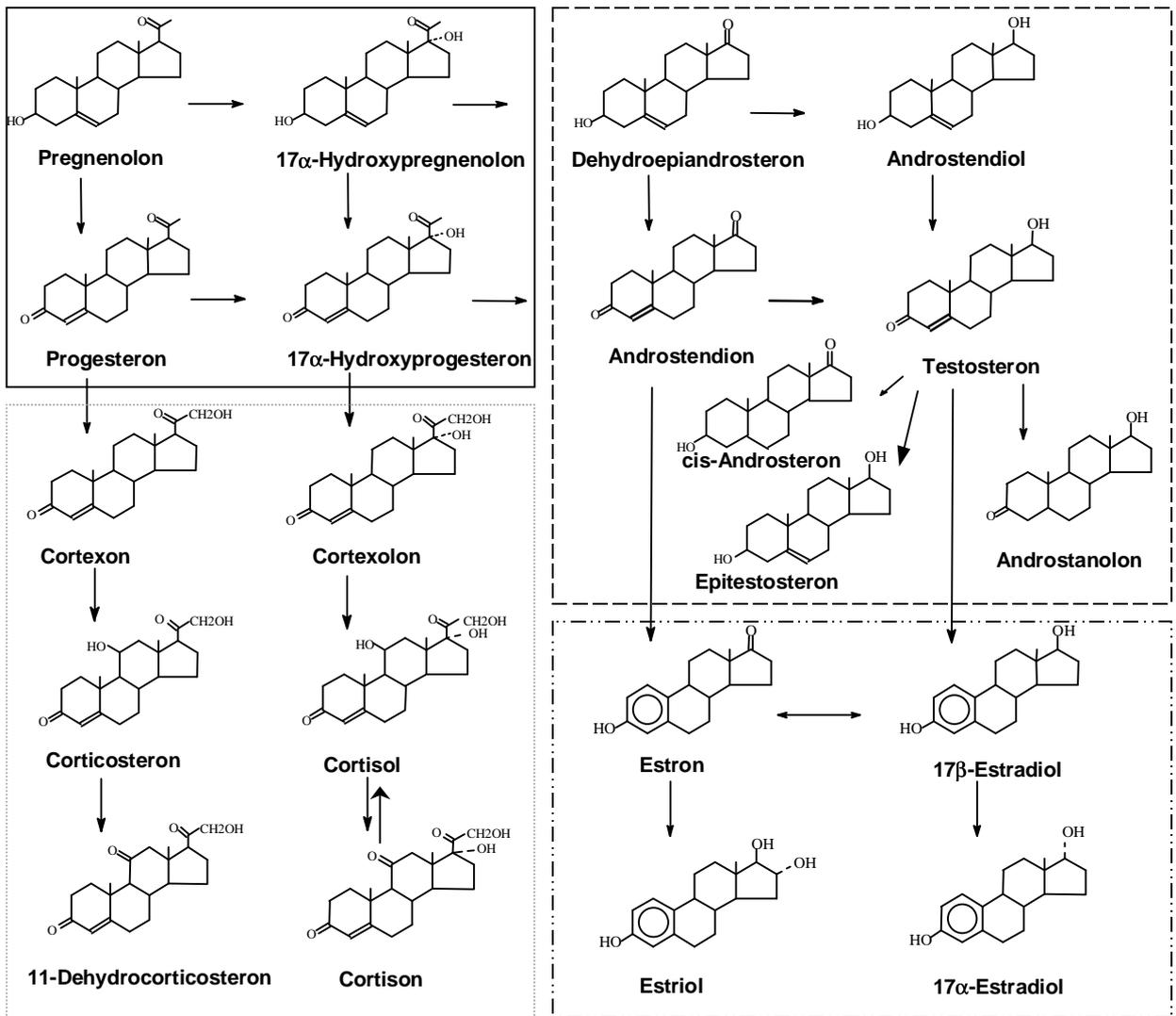
Die Corticoide enthalten im Gegensatz zu den Gestagenen eine weitere Hydroxygruppe an der Seitenkette und Hydroxy- bzw. Ketogruppen am Ringsystem. Eine detaillierte Darstellung der biosynthetischen Zusammenhänge erfolgt in **Abbildung 2**.

Die Steroide lassen sich nach ihrer Wirkung, ihrem Bildungsort und, wie oben schon dargestellt, nach der Anzahl ihrer Kohlenstoffatome einteilen. Die Einteilung nach Wirkung erfolgt in weibliche Sexualhormone, zu denen die Estrogene und die Gestagene gehören, männliche Sexualhormone und Corticoide. Bei den männlichen Sexualhormonen handelt es sich um die Androgene. Die Geschlechter unterscheiden sich nicht durch die gebildeten Steroide sondern nur durch deren Quantität (STRYER, 1990). **Tabelle 1** gibt Aufschluß über die Steroidhormongruppen, die Anzahl der Kohlenstoffatome ihrer Vertreter und ihre Bildungsorte bei höheren Wirbeltieren.

Tabelle 1 – Steroidhormongruppen und ihre Bildungsorte

Steroidhormongruppe	Anzahl der C-Atome	Bildungsort
Gestagene	21	Corpus luteum Plazenta
Corticoide	21	Nebennierenrinde
Androgene	19	Testes Nebennierenrinde Ovar
Estrogene	18	Ovar Plazenta Testes

Steuerungszentrum für die Ausschüttung der Steroidhormone ist das Hypothalamus-Hypophysen-System. Die Sekretion der Hormone wird durch das follicelstimulierende Hormon (FSH) und das luteinisierende Hormon kontrolliert. Bei beiden handelt es sich um Peptidhormone, die Gonadotropine genannt werden. Sie werden von der Hypophyse ausgeschüttet. Die Hypophyse wird durch den Hypothalamus mittels eines weiteren Peptidhormons, dem Gonadotropin-Releasinghormon (GRH), reguliert. Die Produktion wird über ein negatives Rückkopplungssystem zwischen Hypothalamus, Hypophyse und endokrinen Drüsen gesteuert (LÖFFLER & PETRIDIS, 1988).



- Vorstufen und Gestagene
- Glucocorticoide
- Androgene
- .-.-.- Estrogene

Abbildung 2 – Stoffwechszusammenhänge zwischen den Steroiden

2.1.3 Transport, Wirkung, Abbau

Der Transport der Steroidhormone vom Bildungsort zum Zielorgan erfolgt über den Blutkreislauf. Hierzu werden sie an die Plasmarezeptoren gebunden. Es handelt sich zum größten Teil um Globuline, zu geringem Anteil auch um Albumine (BUDDEKE, 1985; LÖFFLER & PETRIDIS, 1988). Nur ein geringer Teil der Steroidhormone liegt im Blutplasma ungebunden vor. Die gebundenen Steroidhormone sind biologisch inaktiv. Da im Zielgewebe ein Gleichgewicht zwischen an Plasmarezeptoren gebundenen Steroiden, ungebundenen Steroiden und an intrazelluläre Rezeptoren gebundenen Steroiden vorliegt, wird die Aktivität bzw. die Konzentration der Steroide durch die

Plasmarezeptormenge gesteuert. Die Steroid-Plasmarezeptor-Bindung ist wenig spezifisch.

Die Steroidhormone entfalten im Gegensatz zu einigen anderen Hormonen ihre Wirkung erst innerhalb der Zelle. Im Cytosol werden die Steroide an spezifische, intrazelluläre Rezeptoren gebunden. Auch bei diesen handelt es sich um Proteine. Vermutlich bewirkt die Bildung eines Hormon-Rezeptor-Komplexes eine Konformationsänderung des Rezeptors. Dadurch wird es dem Hormon-Rezeptor-Komplex möglich, in den Zellkern einzudringen und an die DNA zu binden. Es erfolgt ein Eingriff in die Proteinbiosynthese durch Beeinflussung der DNA-Synthese, der Transkription, der Translation oder der RNA-Verwertung.

Durch unterschiedliche Mengen an steroidspezifischen Rezeptoren in den unterschiedlichen Organen ist eine gewisse Organspezifität der einzelnen Steroide gegeben. Dasselbe gilt für die Muskulatur. So werden z.B. in der Muskulatur des Vorder Viertels von Rindern vermehrt Steroidhormonrezeptoren gefunden (SAUERWEIN, 1988). Die einzelnen Steroidgruppen entfalten unterschiedliche Wirkungen:

- Androgene

Als eigentlich wirksame Androgene gelten Testosteron und Androstanolon. Androstanolon wird aus Testosteron erst im Zielgewebe gebildet und besitzt eine 2,5fach höhere biologische Aktivität als Testosteron. Weitere schwach androgen wirksame Steroide sind Androstendiol, Androstendion, DHEA und die α -Konformere cis-Androsteron und Androstandiol. Dabei handelt es sich bei cis-Androsteron und Androstandiol um Abbauprodukte des Testosterons. Ein weiteres, nicht wirksames Androgenabbauprodukt ist das Epitestosteron.

Die Androgene bewirken die Ausbildung der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale. Sie fördern das Wachstum und die Differenzierungsvorgänge der männlichen Fortpflanzungsorgane und die Spermio-genese. Sie besitzen eine starke proteinanabole Wirkung und sind der Grund für die Ausbildung der typisch männlichen Muskulatur.

- Gestagene

Das einzige natürliche Gestagen ist Progesteron. Es besitzt vorwiegend im weiblichen Organismus eine Funktion. Dort wird es während der Sekretionsphase des Geschlechtszyklus im Corpus luteum gebildet. Nachdem durch 17β -Estradiol das Endometrium entwickelt wurde, startet Progesteron dessen Umwandlung. Progesteron ist für die Weiterentwicklung des Eis und dessen Einnistung verantwortlich.

Nach der Befruchtung bewirkt Progesteron den Erhalt der Schwangerschaft durch Unterdrückung der Ovulation und der Menstruation. Vorstufe des Progesterons ist Pregnenolon. Metabolit des Progesterons ist 17α -Hydroxyprogesteron. 17α -Hydroxyprogesteron bildet eine Vorstufe der Corticoide und der Androgene. 17α -Hydroxyprogesteron kann auch aus 17α -Hydroxypregnenolon, einem Metaboliten des Pregnenolons, gebildet werden. Der Abbau des Progesterons erfolgt hauptsächlich über Pregnandiol.

- Estrogene

Estrogene Wirkung besitzen 17α -Estradiol, 17β -Estradiol, Estron und Estriol. Die physiologisch wichtigsten Estrogene sind 17β -Estradiol und Estron. 17β -Estradiol steuert zusammen mit Progesteron den weiblichen Zyklus und ist für den Aufbau der Uterusschleimhaut notwendig. Estriol wird während der Schwangerschaft in der Plazenta gebildet. 17α -Estradiol gilt als Abbauprodukt.

Die Estrogene bewirken die Ausbildung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale und beim Tier den Eintritt der Brunst. Die Estrogene wirken schwach protein- und stark fettanabol.

Bei Pferden treten noch zwei weitere, den Estrogenen ähnliche Steroide, Equilin und Equilenin, auf.

- Corticoide

Die Corticoide lassen sich in Gluco- und Mineralcorticoide unterteilen. Die Mineralcorticoide sind für die Regulation des Mineralstoffhaushaltes verantwortlich.

Desoxycorticosteron, 11-Dehydrocorticosteron, Cortisol, Cortison und Corticosteron gehören zur Gruppe der Glucocorticoide. Sie wirken insbesondere auf den Zuckerstoffwechsel. Die Aufnahme von Glucose aus dem Blut wird gehemmt und die Glykolyse vermindert. Dadurch steigt der Blutzuckerspiegel. Weiterhin üben sie eine katabole Wirkung auf den Fett- und Proteinstoffwechsel aus. Die Abbauprodukte werden der Gluconeogenese in der Leber zugeführt. Die katabole Wirkung übertrifft die anabole in Leber und Niere. Corticoide hemmen direkt in den Testes die Androgensynthese.

Bei hoher Dosierung ist eine entzündungshemmende Wirkung der Corticoide bekannt. Sie beruht auf der Hemmung der Abwehrreaktionen der Zelle.

Der Abbau der Corticoide findet durch eine Reduktion am Ring A statt, die das Entstehen einer Hydroxygruppe und die Spaltung der Doppelbindung zur Folge hat. Im weiteren findet eine Abspaltung der Seitenkette statt.

Steroidhormone werden im Organismus schnell umgesetzt. Ihre Halbwertszeiten betragen nur etwa 10-90 Minuten. Der biologische Abbau der Steroide erfolgt über eine Inaktivierung, wobei die Konjugat-Bildung (Glucuronidierung, Sulfatierung) im Vordergrund steht. Sie ist notwendig, um die schlecht wasserlöslichen Steroide in eine wasserlösliche Form zu überführen und so eine Ausscheidung über die Niere zu ermöglichen. Ebenso werden Hydroxygruppen eingeführt und Ketogruppen zu Hydroxygruppen reduziert. Die Doppelbindung im A-Ring wird hydrogeniert. Dies geschieht nicht bei aromatischen Systemen.

2.1.4 Steroidfettsäureester

Das Vorkommen von Steroiden als Steroidhormonfettsäureester ist seit langem bekannt. Diese Form der Steroidkonjugate wurde von HOCHBERG et al. (1977) entdeckt und in Unkenntnis ihrer genauen Zusammensetzung zunächst als „lipoidale Derivate“ bezeichnet. Sie zeichnen sich durch ihre hydrophoben Eigenschaften und durch die Eigenschaft, bei einer Behandlung mit Laugen Steroide freizusetzen, aus.

Heute sind von jeder Steroidklasse Vorkommen in Form von Fettsäureestern bekannt. Steroidfettsäureester wurden in verschiedenen Geweben sowie in Blut nachgewiesen. So konnten unter anderem in der Nebennierenrinde von Rindern Pregnenolon (HOCHBERG et al., 1977, 1979), 17α -Hydroxypregnenolon und DHEA (HOCHBERG et al., 1979) in Form ihrer Fettsäureester nachgewiesen werden. BORG et al. (1995) beschrieb das Vorkommen von Testosteronfettsäureestern in Fett und Hoden männlicher Ratten. Es wurde gezeigt, daß von Brustdrüsen weiblicher Ratten ein Fettsäureester des Corticosterons gebildet wird (HAMPEL et al., 1978). Cortisol und Corticosteron kommen als Acetate im menschlichen Blut vor (MARGRAF et al., 1963).

Die Veresterung der Steroide wird enzymatisch gesteuert und kann mit verschiedensten Fettsäuren geschehen. So beschreiben LARNER et al. (1993) eine Veresterung von Estradiol in menschlicher Follikelflüssigkeit mit Linolsäure zu 43 %, mit Palmitinsäure zu 20 %, mit Arachidonsäure zu 19 %, mit Ölsäure zu 14 % und mit Stearinsäure zu 4 %.

Die Veresterung tritt bei 17β -Estradiolfettsäureestern an C17 auf (SCHATZ & HOCHBERG, 1981). Bei Corticoidestern ist die Esterbindung an C21 lokalisiert (HOCHBERG et al., 1991a).

Im Gegensatz zu Steroiden, die zu Glucuroniden oder Sulfaten umgesetzt werden, tritt bei der Veresterung von Steroiden mit Fettsäuren keine Inaktivierung ein. Schon 1930 wurde beobachtet, daß die biologische Aktivität der Steroide durch Veresterung verlängert werden kann. Synthetische Steroidhormonester werden daher schon seit Jahrzehnten zur pharmazeutischen Hormonbehandlung eingesetzt (HOCHBERG et al., 1990). Die Veresterung ist ein Schutz vor Metabolisierung, wodurch die längere Wirksamkeit der Steroide erklärt werden kann. Die Metabolisierungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Fettsäuren ab. Die biologische Funktion der Steroidfettsäureester wird immer noch diskutiert. Wahrscheinlich ist, daß Steroidfettsäureester eine Art Speicherform darstellen (LAVALLÉE et al., 1996). Dabei scheint eine Akkumulation der Steroidfettsäureester in Fettgeweben aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften möglich.

Die Wirkung der Steroidfettsäureester tritt häufig erst nach Hydrolyse der Esterbindung ein. So zeigten JANOCKO et al. (1984), daß eine Bindung von 17β -Estradiol an den Rezeptor bei allen Fettsäureestern mit einer Fettsäurekettenlänge von C2 bis zu den langkettigen Fettsäuren erst nach Hydrolyse auftritt. Für die Bindung von 17β -Estradiol an dessen Rezeptor ist eine freie Hydroxy-Gruppe am D-Ring des Steroids notwendig. Jedoch zeigen Corticosteronester, die an C21 verestert sind, noch eine Rezeptorbindung (HOCHBERG et al., 1991a).

Für die physiologische Aktivität der Steroidfettsäureester ist die Hydrolyse der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Hydrolyse der Steroidfettsäureester findet enzymatisch statt.

2.2 Steroide in Rindergewebe

Verschiedene Rindergewebe, -gewebsflüssigkeiten sowie Blut, Urin und Kot dienten bisher als Untersuchungsmaterial für die Bestimmung von Steroiden. Dabei ist die Intention für diese Untersuchungen je nach gewähltem Untersuchungsmaterial unterschiedlich. So wurden für den Nachweis eines illegalen Einsatzes von Anabolika in

der Rindermast bislang meistens Blut, Kot und Urin herangezogen (MEYER et al., 1985a, DUBOIS et al., 1998, HAMOIR et al., 1998). Diese Matrices haben den Vorteil, daß nach dem Nachweis einer illegalen Behandlung das Tier aus dem Schlachtprozeß genommen werden kann. Problematisch ist dabei, daß die Untersuchung nur am lebenden Tier erfolgt. Für den Verbraucherschutz im Sinne der Lebensmittelüberwachung ebenso wie für eine Überwachung des Importverbotes muß eine Kontrolle anhand des Endproduktes Fleisch möglich sein.

2.2.1 Muskelgewebe

Bei dem Lebensmittel Rindfleisch handelt es sich um Muskelgewebe. Die Lage des Muskels im Schlachtkörper ist dabei unter anderem für die Qualität des Fleisches verantwortlich. Sehr hochwertiges Fleisch liefert der *Musculus longissimus dorsi* (MLD), aus dem unter anderem Roastbeef und Filet hergestellt wird. Eher minderwertig ist das Fleisch, das aus den Muskeln der Gliedmaßen gewonnen wird. Es ist stark von Sehnen durchzogen und wird deswegen für minderwertige Produkte wie Gulasch eingesetzt oder in Wurst verarbeitet.

Bei Muskelgewebe handelt es sich um ein Zielorgan der Steroide. Die Muskeln der verschiedenen Körperpartien unterscheiden sich nicht in ihren Steroidhormonmustern (FRITSCHKE et al., 1998b). Die unterschiedliche Ausprägung der Muskeln, die über Steroide gesteuert wird, ist von den Rezeptorgehalten in den jeweiligen Teilstücken abhängig. So stellten SAUERWEIN & MEYER (1989) fest, daß die Androgen-Rezeptorkonzentration beim Rind in der Reihenfolge Hals, Keule, Schulter, Bauch abnimmt.

Die Fleischqualität ist außerdem abhängig von der Kategorie (Ochse/Bulle) bzw. dem Geschlecht und dem Alter der Tiere. Ochsenfleisch ist von sehr hoher Qualität. Es folgen Färsenfleisch (weibliches Rind, das noch nicht gekalbt hat), Jungbullenfleisch und Kuhfleisch (DLG, 1991). Dabei kann Fleischqualität durch die subjektiven Merkmale Marmorierung, Saftigkeit und Zartheit sowie die objektiven Merkmale Fettgehalt, Farbe, Kollagengehalt und -löslichkeit, Muskelfaserzahl und -fläche sowie Festigkeit beschrieben werden. Zwischen Steroidhormongehalt und Fleischqualität bestehen Zusammenhänge. Bestimmte Steroidgruppen wirken differenziert auf die Schlachtkörperentwicklung ein und sind für Fleisch- und Fettansatz verantwortlich (GETTYS et al., 1988). So werden Testosteron- und Kollagengehalt in Verbindung gebracht (CROSS et al., 1984).

Rinder verschiedener Kategorien weisen unterschiedliche Steroidhormonmuster im Muskelgewebe auf, da unterschiedliche physiologische Ausgangsbedingungen vorliegen. Nicht alle in den endokrinen Drüsen gebildeten Steroide können im Muskel nachgewiesen werden. Bei Bullen treten bedingt durch die verstärkte Produktion in den Hoden größere Mengen an Androgenen im Muskelgewebe auf. Ochsen bilden geringere Mengen Androgene, da die Nebennierenrinde die gesamte Androgen-Produktion aufgrund der fehlenden Testes übernimmt (FRITSCHKE & STEINHART, 1998). So treten Testosteron und Androstanolon nur vereinzelt und in geringeren Gehalten (10 ng/kg bis 150 ng/kg) in Ochsenmuskulatur als in Bullenmuskulatur auf (FRITSCHKE et al., 1998a; FRITSCHKE & STEINHART, 1998). Ebenso verhalten sich die anderen Androgene. Ochsen unterscheiden sich in den Pregnenolonegehalten ihrer Muskeln kaum von Bullen, allerdings treten höhere Progesterongehalte auf (bis 3070 ng/kg).

Sowohl Ochsen als auch Bullen weisen keine nennenswerten Estrogengehalte in der Muskulatur auf (bis 10 ng/kg) (FRITSCHKE et al., 1999).

Das Fleisch weiblicher Tiere zeichnet sich im allgemeinen durch hohe Progesterongehalte aus. Aber auch sie zeigen nur geringe Estrogengehalte in der Muskulatur (HARTWIG, 1993).

Anhand der Steroidhormonmuster des Muskelgewebes von Rindern lassen sich einige charakteristische Kennzahlen bestimmen, die Rückschlüsse auf Qualitätsparameter für Rindfleisch, wie z.B. die Kategorie des Fleisch liefernden Tieres, zuläßt. So ist eine Unterscheidung von männlichen und weiblichen Rindern anhand des Pregnenolon/Progesteron-Quotienten möglich. Dieser liegt für weibliche Rinder $< 1,3$, für männliche Rinder $> 3,0$ (HARTWIG, 1993). Auch die Unterscheidung von Ochsen und Bullen ist anhand des sogenannten Masculinity Index (MI) möglich (FRITSCHKE & STEINHART, 1998). In die Berechnung des MI gehen Testosteron, Epitestosteron und Pregnenolon ein. Liegt der MI < 25 kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem fleischliefernden Tier um einen Ochsen handelte. Bei einem MI > 25 handelte es sich höchstwahrscheinlich um einen Bullen. Ebenso ist aufgrund des Hormonmusters eine Eingrenzung des Alters der Tiere auf 10 Wochen möglich (FRITSCHKE et al., 1998a).

Neben den Einflüssen von Alter und Geschlecht der Tiere scheint auch zumindest der Steroidgehalt des Blutes von der Rasse der Tiere abhängig zu sein (CROSS et al., 1984). Abhängig vom Fettgehalt ist das Verhältnis von polaren zu unpolaren Steroiden in Fleisch (FRITSCHKE et al., 1998b).

Das Vorkommen von Steroidhormonfettsäureestern wurde in Muskelgewebe noch nicht untersucht.

2.2.2 Fettgewebe

Fettgewebe ist eine Form des tierischen Bindegewebes. Es besteht aus Adipozyten mit einem Durchmesser von 50 – 100 μm . Die Fettzellen sind mit Fetttropfchen gefüllt und besitzen einen schmalen Plasmasaum an der Zellwand.

Man unterscheidet zwischen subcutanem (unter der Haut), intermuskulärem (zwischen den Muskeln) und intramuskulärem (innerhalb des Muskels) Fettgewebe sowie Fett der Körperhöhle (Organfett, z.B. Nierenfett).

Funktionell wird Fettgewebe in Organ- und Depotfett unterteilt. Das Depotfett dient, ebenso wie das Organfett, als Energiespeicher und Druckpolster. Zusätzlich hat das Depotfett isolierende Wirkung. Beide Fettarten sind für den Fettstoffwechsel und die Speicherung von fettlöslichen Substanzen verantwortlich (BOGENRIEDER et al., 1985).

Stofflicher Hauptbestandteil des Fettgewebes sind Triglyceride. Die veresterten Fettsäuren sind überwiegend langkettig (C 14-C 18). Daneben liegen geringe Anteile an Wasser und Proteinen vor. Bei den Proteinen handelt es sich überwiegend um Kollagen und Elastin.

Fettgewebe tritt beim Rind an Bug, Nacken, Darm und als Kapsel um die Niere auf. Es liegt dabei inter-, intramuskulär, subcutan und als Organfett vor.

Für den MLD werden intramuskuläre Fettgehalte von 1,0-8,2 % für Ochsen der Rasse Deutsches Fleckvieh bei Gewichten zwischen 200 kg und 650 kg beschrieben (OTTO et

al., 1993). In den USA gemästete Ochsen im Alter zwischen 12 und 20 Monaten zeigten Fettgehalte zwischen 1,9 % und 6,2 % im MLD (SWEETEN et al., 1990).

Subcutanes Rinderfettgewebe und Organfett wird nicht verzehrt und auch keiner anderen Verwendung zugeführt. Intra- und intermuskuläres Fettgewebe sind nicht vom Muskelfaseranteil zu trennen und werden somit verzehrt.

Dem Fettgewebe wird eine Bedeutung für den Steroidhaushalt zugesprochen (TWOMBLEY et al., 1967). Es soll unter anderem eine Depotfunktion für Steroide ausüben. Zahlreiche Untersuchungen bestätigen dies für das Fettgewebe von Schweinen (HILLBRAND & ELSAESSER, 1983; KIRKWOOD & AHERNE, 1985; ELIASSON & RHYDMER, 1988; CLAUS et al., 1989; ENGELHARDT, 1992; WÄHNER et al., 1993). Das für den sogenannten Ebergeruch verantwortliche Androstenon tritt bei Schweinen ausschließlich im Fettgewebe auf (EDELHÄUSER, 1989).

Auch beim Menschen ist die Funktion des Fettgewebes als Steroidspeicher bekannt (FEHÉR & BODROGI, 1982). Im Fettgewebe wurde gegenüber Serum eine bis um den Faktor 13 erhöhte Konzentration an DHEA bei einem gemischten Probandenpool festgestellt. Es konnte keine Akkumulation bei Cortisol beobachtet werden, das mit einem Faktor von 0,4 zwischen Fettgewebe und Serum vorlag (FEHÉR & BODROGI, 1982). Ebenfalls bekannt ist, daß dem Fettgewebe eine Aufgabe im Steroidmetabolismus zukommt (BLEAU et al., 1974). Dabei spielt das Fettgewebe bei der Metabolisierung von Androgenen über Androstendion zu den Estrogenen eine zentrale Rolle (SCHINDLER et al., 1972; KILLINGER et al., 1990).

Bei Rindern wurden stark erhöhte Steroidgehalte im Fettgewebe gegenüber dem Muskelgewebe festgestellt. So wurde eine Akkumulation von Testosteron, Androstendion und Estrogenen nachgewiesen (HOFFMANN & RATTENBERGER, 1977; MEYER et al., 1985b; GAIANI & CHIESA, 1986; HOFFMANN & EVERS, 1986).

Das Vorliegen von Steroidfettsäureestern in Rinderfettgewebe erscheint aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften möglich. Tatsächlich wurden Steroidfettsäureester ebenso wie die freien Steroide im Fettgewebe nachgewiesen. Dabei wird hauptsächlich von Estrogen-Fettsäureestern im Fettgewebe berichtet (HOCHBERG et al., 1991a, 1991b). 17 β -Estradiol-Fettsäureester wurden im Nierenfettgewebe von Kälbern nachgewiesen (PARIS et al., 1994).

2.3 Anabolika in der Rindermast

2.3.1 Einsatz von Anabolika

Lange Zeit war der Einsatz von Anabolika in der Rindermast üblich. Durch den Einsatz von Anabolika konnten die in der Rindermast erzielten Leistungen wesentlich erhöht werden. Behandelte Rinder nehmen in gleicher Zeit mehr an Gewicht durch Aufbau von Muskel- und Fettgewebe zu als unbehandelte. Die zu erwartende Steigerung des Lebendgewichtes der Tiere beträgt dabei 15 bis 20 % (LONE, 1997). Die Steigerung der Mastleistung ist dabei größtenteils auf eine verstärkte Proteinbildung zurückzuführen, wodurch der prozentuale Körperfettanteil der Tiere sinkt (PATTERSON & SLATER, 1985). Für den Rindfleischherzeuger ist der Einsatz von Anabolika also von wirtschaftlichem Interesse.

In den USA werden verschiedene Präparate in der Rindermast eingesetzt. Da dort, im Gegensatz zur Bundesrepublik Deutschland, hauptsächlich Ochsen zum einen aufgrund der besseren sensorischen Eigenschaften des Fleisches zum anderen aufgrund der einfacheren Haltung gemästet werden, ist der Anabolikaeinsatz besonders wirtschaftlich. Ochsen produzieren aufgrund ihrer physiologischen Ausgangssituation weniger körpereigene Steroide und sprechen deshalb besonders gut auf Anabolikagaben an. Ähnlich ist die Situation bei Mastkälbern, deren Steroidproduktion aufgrund ihres Alters relativ gering ist. Ochsen machten 1997 in der BRD nur 0,9 % und Mastkälber nur 10 % der geschlachteten Rinder aus (STATISTISCHES BUNDESAMT, 1997).

In den USA sind sechs anabol wirksame Substanzen durch die Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Davon werden 17 β -Estradiol, Testosteron und Progesteron im Körper der Rinder auch natürlich produziert. Bei Zeranol, Trenbolon und Melengestrol handelt es sich um körperfremde Substanzen. Diese sechs Wirkstoffe werden in unterschiedlicher Kombination und Konzentration eingesetzt. Dabei richten sich sowohl Kombination als auch Konzentration nach Geschlecht und Alter der Tiere. Der Effekt der Implantate scheint auch von der Rasse der Tiere abhängig zu sein (LONE, 1997). Der Einsatz des Präparates erfolgt meist in Form eines Silikongummi-Implantats, das den Tieren am Ohrgrund appliziert wird. Dieses setzt die Substanzen über einen längeren Zeitraum hinweg frei. Um die Wirkung zu verlängern, werden die Ester einiger Substanzen eingesetzt. So erfolgt der Einsatz von 17 β -Estradiol als Benzoat, Testosteron als Propionat und Melengestrol und Trenbolon als Acetat. In **Tabelle 2** sind die durch die FDA zugelassenen Präparate aufgeführt.

Vom jeweiligen Hersteller werden Zeiträume angegeben, in denen eine Nachimplantation, also die Verabreichung eines weiteren Präparates, erfolgen sollte. Ebenfalls werden Zeiträume angegeben, nach denen die maximale Wirkung der Präparate erreicht wird.

Bei keinem der zugelassenen Präparate ist eine Frist vorgeschrieben, die zwischen Implantation und Schlachtung eingehalten werden muß (JECFA, 1999).

2.3.2 Synovex-S

Synovex-S ist für die Anwendung bei Ochsen vorgesehen. Ein Implantat besteht aus 20 mg 17 β -Estradiolbenzoat und 200 mg Progesteron. 17 β -Estradiol und Progesteron werden selten allein zur Wachstumsförderung eingesetzt. Nur in dem Präparat „Compudose“ wird 17 β -Estradiol allein angewendet. Besser wirksam sind die Substanzen in Kombination. Beim Menschen und bei vielen anderen Spezies wird das Wachstum durch Estrogene unterdrückt, während Wiederkäuer eine Gewichtszunahme unter Estrogeneinfluß zeigen (DEBACKERE, 1989; HANCOCK et al., 1991).

Dieser Effekt kann sowohl auf direkte als auch auf indirekte Wirkung der Estrogene zurückgeführt werden. Direkt wirken Estrogene, indem sie durch Genexpression die Chromatin-Transkription anregen (LONE, 1997). Estrogen-Rezeptoren wurden im Muskel nachgewiesen. Ebenso binden Estrogene an Androgen-Rezeptoren, allerdings mit geringerer Affinität als Androgene. Indirekt bewirkt die Estrogengabe eine Sekretion von Growth Hormone und Insulin.

2 Grundlagen

Tabelle 2 – In den USA zugelassene Anabolika-Präparate; Quelle: MEYER & KARG, 1999

Präparat	Kategorie	Wirkstoff Dosis pro Tier	Jahr der Zulassung durch die FDA
Synovex-S	Ochsen	200 mg Progesteron 20 mg Estradiolbenzoat	1956
Synovex-H	Färsen	200 mg Testosteronpropionat 20 mg Estradiolbenzoat	1958
MAG	Färsen	0,25-0,50 mg/Tag	1968
Ralgro	Kälber Ochsen Färsen	36 mg Zeranol	1969
Compudose	Kälber Ochsen Färsen	24 mg Estradiol	1982
Steer-oid	Ochsen	200 mg Progesteron 20 mg Estradiolbenzoat	1982
Synovex-C	Kälber	100 mg Progesteron 10 mg Estradiol	1984
Heifer-oid	Färsen	200 mg Testosteronpropionat 20 mg Estradiolbenzoat	1984
Finaplix-S	Ochsen	140 mg Trenbolonacetat	1986
Finaplix-H	Färsen	200 mg Trenbolonacetat	1986
Calfoid	Kälber	100 mg Progesteron 10 mg Estradiolbenzoat	1990
Revalor	Ochsen Färsen	140 mg Trenbolonacetat 28 mg Estradiol	1994
Revalor H	Färsen	140 mg Trenbolonacetat 14 mg Estradiol	1994
Magnum	Ochsen	72 mg Zeranol	1995
Revalor G	Ochsen* Färsen*	40 mg Trenbolonacetat 8 mg Estradiol	1996
Component MTE-S	Ochsen	120 mg Trenbolonacetat 24 mg Estradiolbenzoat	1997
Synovex Plus	Ochsen Färsen	200 mg Trenbolonacetat 28 mg Estradiolbenzoat	1998

* für Weidehaltung

Estradiol immer als 17 β -Estradiol

Der Mechanismus der Progesteron-Wirkung ist nicht so gut bekannt wie der der Estrogen-Wirkung. Synthetische Gestagene sollen eine Reduktion des Plasma-Titers von Cortison und Cortisol bewirken (LAUDERDALE, 1983). Ebenso werden eine gesteigerte Thyreotropin- und Insulin-Sekretion vermutet (LONE, 1997). Gestagene bewirken im allgemeinen eine Zunahme des Körperfettanteils.

Eine alleinige Behandlung mit Progesteron zeigt keinen Effekt bei Rindern (LONE, 1997). In Kombination mit 17 β -Estradiolbenzoat in Form des Präparates Synovex-S wird eine verstärkte Gewichtszunahme während der Mast bewirkt. So zeigten Ochsen, die bei einem Lebendgewicht von 320 kg ein Synovex-S Implantat erhielten, ein stärkeres Wachstum innerhalb von 120 Tagen. Sie nahmen im Gegensatz zu den nicht behandelten Ochsen 1,96 kg/Tag gegenüber 1,65 kg/Tag bis zum Tag 60 zu. Von Tag 60 bis 121 betrug die Zunahme 1,61 kg/Tag gegenüber 0,89 kg/Tag. Die behandelten Tiere nahmen

mehr Futter auf als die unbehandelten (10,5 kg/Tag gegenüber 9,3 kg/Tag) und verwerteten dieses effizienter (7,9 kg Futter/kg Gewichtszunahme gegenüber 8,7 kg Futter/kg Gewichtszunahme) (RUMSEY et al., 1974; KAHL et al., 1978; RUMSEY, 1982; LONE, 1997).

Die gleichzeitige Behandlung mit Steroiden und Thyreotropin oder deren Releasing-Faktoren ergänzen ihre Wirkung, beeinflussen einander aber nicht (PRESTON et al., 1995).

2.3.3 Risikobewertung

Die USA sehen den Einsatz der zugelassenen Hormonpräparate in der Rindermast als unbedenklich an. Als Argumente werden der jahrelange Einsatz der Präparate ohne bekannt gewordene negative Auswirkungen auf den Verbraucher angeführt, ebenso wie die geringe Aufnahme von Hormonen durch das Nahrungsmittel Rindfleisch (FAS, 1999b).

Der Bericht des Gemeinsamen FAO/WTO-Sachverständigenausschusses für Lebensmittelzusatzstoffe (JECFA, 1999) kommt in seiner Risikoeinschätzung zu dem gleichen Schluß wie die USA. Die Risiken, die die natürlichen Steroide in der Rindermast für den Verbraucher darstellen, werden in diesem Bericht ausführlich erläutert.

Die Toxizität der drei natürlichen Steroide wird vom JECFA folgendermaßen eingeschätzt:

- 17 β -Estradiol

Diese Substanz besitzt bei oraler Gabe eine sehr geringe Toxizität. Es tritt eine gastrointestinale und hepatische Inaktivierung ein. Die Bioverfügbarkeit bei oraler Verabreichung liegt im Gegensatz zur intravenösen Gabe bei 5 %. 17 β -Estradiol besitzt genotoxisches Potential. Es ist ebenfalls als carcinogen anzusehen. Ein Acceptable Daily Intake (ADI)-Wert von 0-30 ng/kg wird festgelegt.

Aufgrund der Rückstandsdaten aus Tierversuchen zur Anabolikabehandlung wurde eine Aufnahme vom 20-50 ng pro Person pro Tag berechnet. Dabei wurden die höchsten ermittelten Gehalte bei behandelten Tieren veranschlagt. Die Aufnahme von bis zu 1800 ng pro Tag sind aufgrund des ADI-Wertes bei einem Körpergewicht von 60 kg zu tolerieren. Die Aufnahme von 17 β -Estradiol aus dem Fleisch behandelte Rinder entspricht also bei einem Körpergewicht von 60 kg 2,8 % der tolerierbaren Aufnahme.

- Progesteron

Oral verabreicht wirkt Progesteron nur sehr schwach toxisch. Dies liegt an der geringen Bioverfügbarkeit bei oraler Gabe. Sie beträgt weniger als 10 % im Gegensatz zur intravenösen Gabe. Progesteron wirkt nicht genotoxisch. Es wird ein ADI-Wert von 0-30 μ g/kg festgesetzt.

Aufgrund der Rückstandsdaten aus Tierversuchen zur Anabolikabehandlung wurde eine Aufnahme von 500 ng pro Person pro Tag berechnet. Dabei wurden die höchsten ermittelten Gehalte bei behandelten Tieren veranschlagt. Bei einem Körpergewicht von 60 kg ist aufgrund des angegebenen ADI-Wertes eine Aufnahme bis zu 1800 μ g pro Tag tolerierbar. Die täglich aufgenommene Menge durch den Verzehr von aus dem Tierversuch stammenden Fleisch entspricht also bei einem Körpergewicht von 60 kg 0,03 % der tolerierbaren Aufnahme.

- Testosteron

Die Toxizität von Testosteron nach oraler Gabe ist sehr gering. Oral verabreichtes Testosteron ist nur zu 4 % verfügbar im Gegensatz zu intravenös verabreichtem Testosteron. Testosteron erhöht das Prostatakrebs-Risiko. Es wird ein ADI-Wert von 0-2 µg/kg festgesetzt.

Aufgrund der Rückstandsdaten aus Tierversuchen zur Anabolikabehandlung wurde eine Aufnahme von 60 ng/pro Person pro Tag durch Fleisch behandelte Tiere berechnet. Dabei wurden die höchsten ermittelten Gehalte bei behandelten Tieren veranschlagt. Bei einem Körpergewicht von 60 kg liegt die aufgrund des ADI-Wertes tolerierbare Aufnahme bei 120 µg pro Tag. Die berechnete aufgenommene Menge aus dem Fleisch behandelte Rinder entspricht bei einem Körpergewicht von 60 kg 0,05 % der tolerierbaren Aufnahme.

Das JECFA kommt zu dem Schluß, daß aufgrund dieser Abschätzung keine maximalen Rückstandsgehalte festgelegt werden müssen.

Der Standpunkt der Europäischen Kommission hinsichtlich dieser Sachverhalte ist gegensätzlich. In dem Bericht des Scientific Committee on Veterinary Measure Relating to Public Health (SCVPH) vom 30. April 1999 werden aus den zugrundeliegenden Daten andere Schlußfolgerungen gezogen (EUROPEAN COMMISSION, 1999):

- Es wird ein grundsätzliches Risiko für den Verbraucher durch Anabolika in der Rindermast gesehen.
- 17β-Estradiol wird als carcinogen angesehen.
- Für die fünf anderen in der Rindermast eingesetzten Substanzen wird angegeben, daß der derzeitige Stand der Forschung keine endgültige Risikoabschätzung zuläßt.
- Für alle sechs Substanzen können endokrine, immunologische, neurobiologische, immunotoxische, genotoxische und carcinogene Effekte auf die Entwicklung beobachtet werden. Vorpubertäre Kinder sind besonders gefährdet.

Die Kommission führt an, daß diesen Aussagen neueste wissenschaftliche Erkenntnisse zugrunde liegen. Das SCVPH wurde beauftragt, aktuelle wissenschaftliche Berichte zu prüfen und festzustellen, ob neue Erkenntnisse eine Überarbeitung der Stellungnahme vom 30. April 1999 notwendig machen. Berichte des britischen Tierarzneimittelausschusses sowie des europäischen Tierarzneimittelausschusses zur Beurteilung von Arzneimitteln, die den Einsatz von Anabolika als weitgehend unbedenklich ansehen, wurden berücksichtigt, aber nicht als relevant für eine Änderung der Stellungnahme befunden (EUROPEAN COMMISSION, 2000).

2.3.4 Nachweis einer Anabolikabehandlung in Geweben

Ungeachtet der strittigen Einschätzungen bezüglich des Risikos eines Anabolikaeinsatzes in der Rindermast für den Verbraucher ist der Einsatz von Anabolika und die Einfuhr von Fleisch behandelte Rinder in die EU verboten. Diese Tatsache macht eine Kontrolle notwendig. Im Falle der körperfremden Anabolika ist ein Nachweis im Gewebe relativ einfach, da diese Substanzen von den körpereigenen unterschieden werden können. Dies

ist bei den körpereigenen Substanzen nicht der Fall. Die im Körper produzierten Steroide können nicht von den applizierten unterschieden werden.

Der Nachweis einer Anabolikabehandlung von Rindern kann anhand unterschiedlicher Matrices erfolgen. Dabei ist es entscheidend, daß anhand des Endproduktes Fleisch eine Kontrolle vorgenommen werden kann. Die Kontrolle erfolgt dabei analytisch mit Hilfe immunochemischer oder chromatographischer Methoden (siehe Kapitel 4). Eine Unterscheidung von Fleisch behandelter und unbehalteter Tiere ist im Normalfall nicht anhand von Grenzwerten möglich, da die Steroidgehalte in Geweben von Tieren unterschiedlichen Geschlechts, Alters und Rasse stark schwanken. 1989 veröffentlichte die Europäische Kommission Gehalte natürlicher Steroide in Geweben von Rindern, um Anhaltspunkte für den Nachweis einer Behandlung bieten zu können (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1989). Diese Werte wurden immunologisch ermittelt und setzen sich aus Gehalten aus verschiedenen Literaturstellen zusammen. Angaben werden über Muskel-, Leber-, Fett- und Nierengewebe von Rindern gemacht. Es werden Gehalte für die Steroide Estron, 17β -Estradiol, Progesteron und Testosteron angegeben. Die Kategorie der Tiere (Kälber, Ochsen, Bullen, Färsen, trächtige Kühe) wird genannt, nicht aber das Alter. Die Angaben beruhen für jedes Steroid auf maximal zehn ermittelten Werten. Aus diesen Gründen sind die angegebenen Gehalte wenig aussagekräftig. Behandelte Tiere können aufgrund dieser Werte nur bei besonders stark erhöhten Gehalten erkannt werden.

Von vielen Autoren werden Steroidgehalte von Geweben behalteter Tiere angegeben. Eine Unterscheidung von behalteten und unbehalteten Tieren ist aufgrund dieser Daten aber nur im direkten Vergleich zu Kontrolltieren möglich (LONE, 1997).

3 Material

3.1 Tierversuch – Probenmaterial

Der Tierversuch, der diesen Untersuchungen zugrunde liegt, wurde vom Agricultural Research Service (ARS) des United States Department of Agriculture (USDA) in Beltsville, Maryland, unter Leitung von Dr. T. S. Rumsey durchgeführt. Bei den untersuchten Rindern handelte es sich um 32 Ochsen der Rasse Charolais. Diese wurden so jung wie möglich mit einem Gewicht von etwa 180 kg gekauft. Dabei wurde Wert auf eine möglichst große Ähnlichkeit zwischen den Tieren bezüglich Alter, Gewicht und Herkunft gelegt. Die Ochsen wurden über das gesamte Experiment mit Silage und Krafffutter gefüttert. Dabei entsprach die Zusammensetzung einer Aufnahme von 30 % Silage und 70 % Krafffutter. Die Silage bestand zu je 50 % aus Maissilage und Grassilage. Das Krafffutter setzte sich aus Mais, Sojamehl, Baumwollsamenschalen, Weizenstroh, Melasse, Salz und Mineralstoffen zusammen (RUMSEY et al., 1996). Gefüttert wurde ad libitum.

Im Alter von 8 Monaten bei einem Gewicht von etwa 300 kg wurden die Ochsen in vier Gruppen mit je acht Tieren aufgeteilt. Aus diesen vier Gruppen bildeten jeweils vier Tiere Kontrollen, die keiner Hormonbehandlung unterzogen wurden. Die zur Behandlung vorgesehenen Ochsen aus allen vier Gruppen erhielten am Tag 0 des Experiments ein Synovex-S Implantat am Ohrgrund. An den Tagen 36 bis 37 wurden die vier behandelten Ochsen der Gruppe eins einer Behandlung mit Growth Hormone Releasing-Hormone (GHRH) und Thyreotropin-Releasing Hormone (TRH) unterzogen und anschließend nach 41 bis 43 Tagen geschlachtet, ebenso wie die unbehandelten Tiere der Gruppe eins. Die behandelten Ochsen der zweiten, dritten und vierten Gruppe wurden am sechzigsten Tag einer Nachimplantation unterzogen. Die behandelten Ochsen der zweiten Gruppe erhielten an den Tagen 96 bis 98 GHRH und TRH und wurden an den Tagen 101 bis 103 ebenso wie die unbehandelten Tiere geschlachtet. Die behandelten Tiere der dritten und vierten Gruppe erhielten am Tag 120 ein weiteres Synovex-S Implantat. Die Tiere der Gruppe drei wurden an den Tagen 156 bis 158 mit TRH und GHRH behandelt und am 161. bis 163. Tag ebenso wie die unbehandelten Tiere dieser Gruppe geschlachtet. Die vierte Gruppe wurde ohne weitere Behandlung am Tag 175 geschlachtet. **Abbildung 3** verdeutlicht das Design Tierversuch.

Als Probenmaterial standen Teile des MLD sowie Teile des Fettes, das diesem Muskel aufliegt, zur Verfügung. Von den Muskelproben lagen 70 g bis 150 g vor, von den Fettproben etwa 50 g. Die Proben wurden bis zur Untersuchung bei -18°C gelagert. Die Schlachtgewichte der einzelnen Tiere sind nicht bekannt, nur die Mittelwerte der Gruppen. Diese sind im Anhang 9.1.1 angegeben. Von den einzelnen Ochsen sind die Ausschlachtgewichte bekannt. Hierbei handelt es sich um das Gewicht des Schlachtkörpers nach Entfernung der Haut, des Kopfes, der Innereien und Klauen. Diese Gewichte sind im Anhang 9.1.2 angegeben.

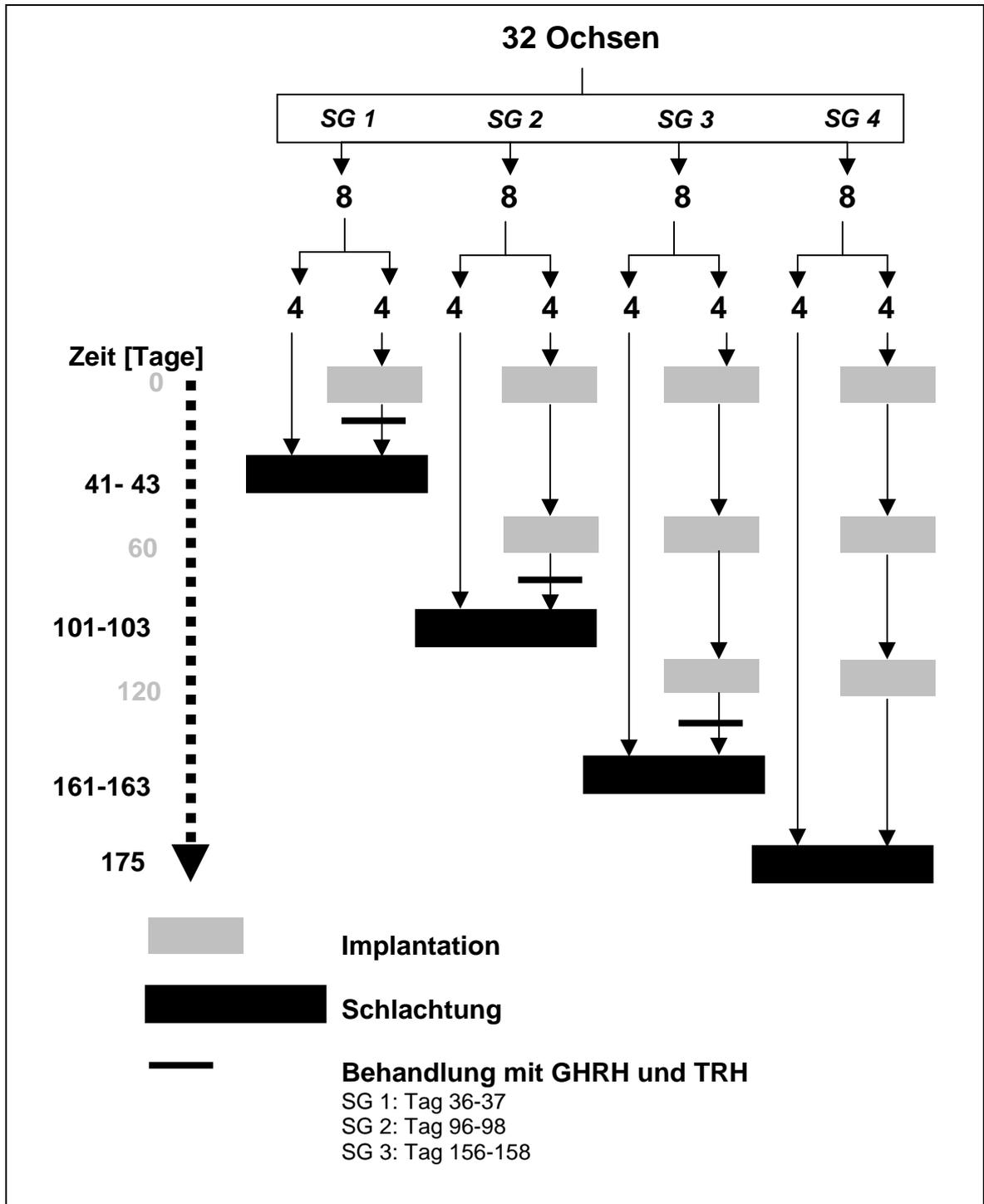


Abbildung 3 – Design des Tierversuchs

3.2 Auswahl der Steroide

Da die Ochsen des Tierversuchs mit Progesteron und 17 β -Estradiol behandelt wurden, sollten diese Steroide in die Untersuchungen einbezogen werden. Jedes Implantat enthält 200 mg Progesteron und 20 mg 17 β -Estradiolbenzoat. Progesteron wird also in zehnmal so großer Menge zugeführt wie 17 β -Estradiolbenzoat. Auch ist Progesteron in Muskelgewebe von Ochsen häufig nachweisbar (FRITSCH & STEINHART, 1998). Da Progesteron eine zentrale Stellung im Steroidmetabolismus einnimmt, sollten sowohl die Androgene als auch die Glucocorticoide als Folgeprodukte in die Untersuchungen einbezogen werden. Für beide Gruppen bildet Progesteron eine Vorstufe (siehe **Abbildung 2**). Dabei wurden die Steroide ausgewählt, die in Muskelgewebe von Ochsen in nennenswerten Mengen (unterer $\mu\text{g}/\text{kg}$ Bereich) nachweisbar sind. Es sollten sowohl die Wirkformen als auch die Vorstufen und Metaboliten einbezogen werden. Zugrunde gelegt wurden dabei die Untersuchungen von FRITSCH & STEINHART (1998) sowie von HARTWIG et al. (1995). Einbezogen wurden Pregnenolon als direkte Vorstufe von Progesteron, DHEA und Androstendion als androgene Vorstufen, Testosteron und Androstanolon als androgene Wirkformen sowie cis-Androsteron und Epitestosteron als Metaboliten. Weiterhin wurden die Glucocorticoide Cortisol und Cortison untersucht.

Zunächst sollten auch die Estrogene in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Da 17 β -Estradiol als Wirkstoff in dem eingesetzten Implantat vorliegt, wäre eine Verfolgung der Akkumulation und der Metabolisierung von Interesse. Dabei stellten sich die sehr geringen Estrogengehalte in der Ochsenmuskulatur als Problem heraus. Mit Gehalten im unteren ng/kg Bereich liegt diese Steroidklasse unterhalb der Nachweisgrenze der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GS-MS). Aus diesem Grund wurden Versuche durchgeführt, um eine immunochemische Bestimmung mittels Radioimmunoassay (RIA) durchzuführen. Dabei wurde festgestellt, daß die Extraktion der Estrogene und die weitere Probenreinigung zu Problemen bei der Messung mittels RIA führt. Die eingesetzten Chemikalien führen zu Blindwerten, die die Meßwerte bei weitem übersteigen können. Da bei sehr geringen Gehalten, großen individuellen Schwankungen zwischen den Tieren und v.a. durch die Methodik verursachte Schwankungen (Blindwertproblematik) keine Ergebnisse zu erwarten sind, die eine Differenzierung zwischen behandelten und unbehandelten Tieren zulassen sowie vermutlich auch keine Trends aufzeigen können, wird auf die Bestimmung der Estrogene im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

In **Tabelle 3** sind alle Steroide aufgeführt, die in die Untersuchungen mit einbezogen wurden. Die systematischen Bezeichnungen der ausgewählten Steroide sind im Anhang 9.2.1 angegeben.

Tabelle 3 – Für die Untersuchungen ausgewählte Steroide

Gestagene	Androgene	Corticoide
Pregnenolon <i>V</i>	DHEA <i>V</i>	Cortison <i>W</i>
Progesteron <i>W</i>	Androstendion <i>V</i>	Cortisol <i>W</i>
	Testosteron <i>W</i>	
	Androstanolon <i>W</i>	
	cis-Androsteron <i>M</i>	
	Epitestosteron <i>M</i>	
<i>V</i> Vorstufe	<i>M</i> Metabolit	<i>W</i> Wirkform

4 Methodik

4.1 Auswahl der Methode zur Bestimmung von Steroiden in Muskelgewebe

Die für die Steroidhormonanalytik eingesetzten Methoden lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die eine Gruppe bilden die immunologischen Verfahren, die andere die physikalisch-chemischen Verfahren. Beide Gruppen weisen Vorteile aber auch Nachteile auf. So ist die immunologische Bestimmung mit Hilfe spezifischer Antikörper meist sehr empfindlich und selektiv. Weiterhin ist nur eine geringe Probenreinigung notwendig, was die schnelle Durchführung dieser Verfahren möglich macht. Heutzutage wird häufig der Enzyme linked-Immunosorbent Assay (ELISA) eingesetzt, aber auch der RIA findet noch Verwendung. Eine Messung der Steroide im pg/kg Bereich ist möglich. Problematisch können Kreuzreaktionen der Antikörper mit Substanzen sein, die den Steroiden strukturell ähnlich sind. Weiterhin ist bei diesen Verfahren nur die Bestimmung eines Steroids in einem Analysengang möglich. Ebenfalls müssen für das zu bestimmende Steroid Antikörper zur Verfügung stehen. Im Falle der Wirkformen sind diese kommerziell erhältlich. Probleme stellen sich bei Antikörpern gegen Vorstufen und Metaboliten, da diese nicht für den Verkauf produziert werden. Die immunologischen Methoden werden bei weitem am häufigsten, gerade zur Routinebestimmung von Steroiden, eingesetzt (HOFFMANN et al., 1975; HENRICKS, 1980; HOFFMANN & BLIETZ, 1983; MEYER, 1990; SIMONTACCHI et al., 1999).

Bei den physikalisch-chemischen Verfahren bieten sich unterschiedliche Möglichkeiten an. Diese Verfahren beruhen hauptsächlich auf chromatographischen Trennverfahren mit unterschiedlicher Detektion. Möglich ist die Bestimmung von Steroiden mittels Dünnschichtchromatographie (SMETS & VANDERWALLE, 1982; VAN LOOK et al., 1989). Diese Methode läßt sich zum Nachweis von Steroiden einsetzen. Weiterhin wird die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) eingesetzt. Als Detektionsverfahren kann die UV-Detektion und in einigen Fällen die Fluoreszenzdetektion gewählt werden (STAN & HOHLS, 1979; DONIKE et al., 1984; TAYLOR et al., 1987). Hohe Empfindlichkeit sowie eine sehr spezifische Detektion bietet die Massenspektrometrie (MS). Diese wird als Detektionsverfahren nach chromatographischer Trennung mittels HPLC oder Gaschromatographie (GC) eingesetzt. Am häufigsten wird in Kombination mit der MS die GC als Trennverfahren angewendet. Das Massenspektrometer dient dann als massenspektrometrischer Detektor (MSD). Der MSD wird bei der Steroidanalytik vorwiegend im selected ion monitoring-Mode (SIM) betrieben. Das bedeutet, daß nur Ionen erfaßt werden, die für die zu analysierende Substanz spezifisch sind. Dieses Verfahren ist sehr empfindlich und wird von zahlreichen Autoren beschrieben (AXELSON & SJÖVALL, 1974; STAN & ABRAHAM, 1980; BERGNER-LANG & KÄCHELE, 1981; DASELEIRE et al., 1992; PETZ, 1991; HARTMANN & STEINHART, 1997a; DUBOIS et al., 1998). Nachteil der chromatographischen Verfahren ist eine geringere Empfindlichkeit gegenüber den immunologischen.

Da in die Bestimmungen mehrere Steroide einbezogen werden sollen, bietet sich der Einsatz immunologischer Verfahren weniger an als der chromatographischer. Bei der Anwendung immunologischer Verfahren müßte für jedes Steroid eine separate

Bestimmung durchgeführt werden. Im Falle der chromatographischen Verfahren ist dies nicht der Fall. Ausgewählt wurde die GC-MSD, da sie die Möglichkeit zur simultanen Bestimmung mehrerer Steroide bietet und Störungen durch Matrixeinflüsse bei Messung in der SIM-Technik weitestgehend ausgeschlossen werden. Als Grundlage wurde das Verfahren von HARTMANN & STEINHART (1997a) gewählt, das im folgenden kurz beschrieben werden soll.

4.2 Analysenverfahren zur Bestimmung der Sexualhormone und Corticoide in Muskelgewebe

4.2.1 Probenvorbereitung

Das ausgewählte Verfahren nach HARTMANN & STEINHART (1997a) basiert auf der offiziellen BGA-Methode (BUNDESGESUNDHEITSAMT, 1989) und wurde in mehreren Schritten weiterentwickelt.

Für die Bestimmung wurden 20 g Muskelgewebe eingesetzt. Zunächst fand eine Extraktion der Steroide aus dem homogenisierten Gewebe mit einem Methanol/Wasser-Gemisch statt. Nach Denaturierung der Proteine durch Erhitzung für 15 Minuten bei 60 °C wurde der Extrakt durch Zentrifugation vom Geweberückstand getrennt. Es wurde keine enzymatische Hydrolyse durchgeführt, um Glucuronide und Sulfate der Steroide zu erfassen, da in Muskelgewebe kaum Steroide aus diesen Konjugaten freigesetzt werden und zudem noch unerwünschte Aktivitäten des Enzymgemisches auftreten (HARTMANN & STEINHART, 1997b).

Der Extrakt wurde mittels flüssig-flüssig-Extraktion mit *n*-Hexan entfettet. Anschließend wurde das Methanol aus der Methanol/Wasser-Phase mit Hilfe eines Vakuumrotationsverdampfers entfernt.

Die zurückbleibende wässrige Phase wurde mit einer C8-Kartusche zur Festphasenextraktion in polare Steroide (Corticoide) und unpolare Steroide (Androgene/Estrogene/Gestagene) fraktioniert. Die unpolaren Steroide wurden mittels Flüssig-flüssig-Extraktion mit Kalilauge gegen *n*-Hexan in phenolische Steroide (Estrogene) und andere neutrale Steroide (Androgene/Gestagene) getrennt.

Die phenolischen Steroide wurden nach dem Ansäuern der wässrigen Phase mit Diethylether extrahiert. Der Extrakt wurde durch Festphasenextraktion (SPE) mit einer Aminopropyl-Kartusche gereinigt. Die Corticoid-Fraktion wurde ebenso wie die Androgen/Gestagen-Fraktion mittels Festphasenextraktion an einer Kieselgel-Kartusche gereinigt. Alle Eluate der Festphasenextraktionen wurden zur Trockene gebracht und bis zur Derivatisierung bei -18 °C gelagert. An jedem Analysentag wurde eine mit allen untersuchten Steroiden dotierte Probe zur Methodenkontrolle mitbestimmt. Sie diente der Bestimmung der Wiederfindungsraten.

Abbildung 4 zeigt ein Schema der Methode. Die Arbeitsvorschrift für die geschilderte Probenvorbereitung findet sich im Anhang 9.7.

4.2.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Derivatisierung

Die Derivatisierung wurde, wie von HARTMANN & STEINHART (1997a) beschrieben, nach SMETS et al. (1993) durchgeführt. Es wurde *n*-Methyl-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA) eingesetzt, das sowohl als Silylierungsreagenz als auch als Lösungsmittel diente. Als Katalysator wurde Trimethyliodosilan eingesetzt. Stabilisiert wurde die Mischung durch Zugabe von Dithioerythrit. Dieses Reagenz bietet den Vorteil, nicht nur Hydroxy-Gruppen sondern ebenso Keto-Gruppen unter der Bildung von Trimethylsilyl- und Trimethylsilylenolethern umzusetzen.

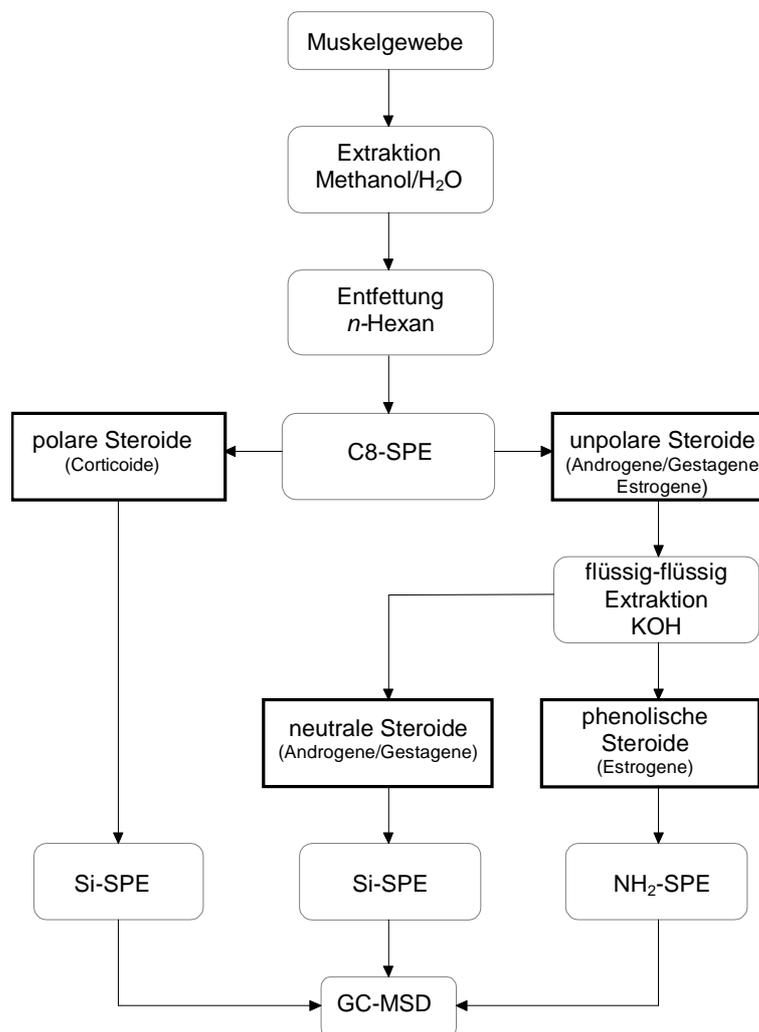


Abbildung 4 – Schema der Methode zur Bestimmung von Steroiden in Muskelgewebe

Vorteile dieser Derivatisierungstechnik sind die relativ hohen Massen der Derivate, die sich gut von Matrixbestandteilen abgrenzen, ebenso wie die Möglichkeit, Corticoide, Progesteron und Androstendion gaschromatographisch zu bestimmen. Bei alleiniger

Umsetzung der Hydroxy-Gruppen ist deren Bestimmung nicht möglich, da sie zur Überführung in flüchtige Derivate wenige oder keine Hydroxy-Gruppen aufweisen. Die Quantifizierung der Androgene und Gestagene wurde über Ihre Molekülmassen und über das nächst kleinere Fragmentation durchgeführt. Dabei handelt es sich hauptsächlich um M – CH₃.

Die Zusammensetzung des Derivatisierungsreagenzes sowie die Durchführung der Derivatisierung sind im Anhang 9.10 beschrieben.

Die zur Messung herangezogenen Massen der Steroide sind im Anhang 9.5 aufgelistet.

Gaschromatographie

Die chromatographische Trennung der Derivate erfolgte an einer 30 m langen DB-5 Kapillarsäule ohne Vorsäule. Die Probenaufgabe erfolgte durch ein Septum. Eingesetzt wurde die Hot-Needle- und die Solvent-Flush-Technik. Durch ein Splitless/Split-System wurde gewährleistet, daß ein großer Anteil der Analyten, nicht aber das gesamte Derivatisierungsmittel auf die Kapillarsäule gelangte. Vor der Derivatisierung wurde den Proben und Standardlösungen (Anhang 9.2) ein Injektionsstandard zugefügt. Die Konzentrationen der Standardlösungen und die linearen Meßbereiche für die jeweiligen Steroide bzw. die Konzentrationen der Kalibrierstandards sind in Anhang 9.2.5, 9.2.6 angegeben, die chromatographischen Bedingungen in Anhang 9.4.

Massenspektrometrie

Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines direkt über eine Transfer-Line an den GC gekoppelten Quadrupol-Massenspektrometers. Die Quantifizierung erfolgte im SIM-Mode anhand der ausgewählten Massen. Ausgewertet wurde mit Hilfe von Kalibriergeraden, die aus Standardlösungen erstellt wurden. Dabei wurde für jedes Steroid jeweils eine Kalibriergerade für die Masse des Molekülmassens und die kleinere ausgewählte Masse aufgenommen. Die Korrektur des Injektionsfehlers erfolgte über den Injektionsstandard.

Die Geräteparameter sowie die von HARTMANN & STEINHART (1997b) bestimmte „Grenze des praktischen Arbeitsbereiches“ (GdpA) nach HARTWIG (1993) sind in Anhang 9.4 und Anhang 9.2.6.5 angegeben.

4.3 Bestimmung des Fettgehaltes in Muskelgewebe

Die Bestimmung des Fettgehaltes der Muskelgewebe erfolgte in Anlehnung an die Methode aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetzes (LMBG) (BUNDESGESUNDHEITSAMT, 1989). Das Muskelgewebe wurde, wie zur Bestimmung der Steroidhormonmuster, mit einem Mixer homogenisiert. Von der homogenisierten Menge wurden 5-10 g für die Bestimmung des Fettgehaltes eingesetzt. Es wurde zunächst ein Säure-Aufschluß nach Weibull-Stoldt durchgeführt, die Probe filtriert und neutral gewaschen, getrocknet und mittels Soxhlet-Extraktion extrahiert. Der Fettgehalt wurde anschließend gravimetrisch ermittelt.

4.4 Statistische Auswertung

Die Meßwerte für die vier behandelten und die vier unbehandelten Ochsen einer Schlachtgruppe sollten miteinander mittels statistischer Verfahren verglichen werden.

Die Gehalte unterliegen in den Gruppen teilweise großen Schwankungen, die auf individuelle Unterschiede in der Steroidproduktion der Ochsen zurückzuführen sind. Einzelne stark abweichende Gehalte werden nicht als Ausreißer eliminiert, sondern in die Betrachtungen mit einbezogen. Aus diesem Grund werden die Mediane statt der Mittelwerte und die Schwankungsbreiten anstelle der Standardabweichungen angegeben.

Um festzustellen, welche statistischen Verfahren für den Vergleich dieser Gruppen herangezogen werden können, wird der W-Test auf Normalverteilung nach Shapiro & Wilk (SACHS, 1974), der auch für eine geringe Probenanzahl ($n > 2$) geeignet ist, angewendet. Es werden dabei jeweils die Gehalte eines Steroids in der behandelten bzw. unbehandelten Gruppe einer Schlachtgruppe untersucht. Es liegen jeweils vier ermittelte Gehalte pro Gruppe vor. Da nicht bei allen Steroiden Normalverteilung innerhalb der Gruppe mit 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit vorausgesetzt werden kann und die Probenanzahl mit vier sehr gering ist, wird für den Vergleich der behandelten und unbehandelten Ochsen ein nicht-parametrischer Test herangezogen.

Hierfür wird der H-Test nach Kruskal & Wallis eingesetzt (PETERSEN, 1991). Dieser nicht-parametrische Test für den Vergleich unabhängiger Stichproben überprüft die Hypothese, daß die acht Stichproben einer Schlachtgruppe aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Hierzu werden die Stichproben der Größe nach geordnet und mit Rangzahlen versehen. Die Prüfgröße H berechnet sich aus den Rangsummen der einzelnen Stichproben und wird mit den aus der χ^2 -Verteilung bestimmten Werten für bestimmte Signifikanzniveaus verglichen. Ist H größer als der χ^2 -Verteilung ermittelte Wert, so besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben. Die sich bei einem Freiheitsgrad von 1 ergebenden Werte sind $\chi^2_{1;0,900} = 2,7$ für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 %, $\chi^2_{1;0,950} = 3,8$ für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, $\chi^2_{1;0,975} = 5,2$ für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 2,5 % und $\chi^2_{1;0,99} = 6,6$ für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %.

Die ermittelten Steroidgehalte im Muskelgewebe werden unter anderem mit den Fettgehalten des Muskelgewebes korreliert. Die Korrelationsanalyse wurde mit Hilfe der Statistik-Software SPSS (BROSIUS, 2000) durchgeführt. Die Korrelation wurde mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho interpretiert, da dieser nicht an eine Normalverteilung der Variablen gebunden ist. Es handelt sich dabei um eine Rangkorrelation. Die Interpretation der Korrelationskoeffizienten erfolgt anhand des folgenden Schemas (Brosius, 2000):

Korrelationskoeffizient r	Deutung
0	keine Korrelation
0 - 0,2	sehr schwache Korrelation
0,2 - 0,4	schwache Korrelation
0,4 - 0,6	mittlere Korrelation
0,6 - 0,8	starke Korrelation
0,8 bis < 1	sehr starke Korrelation
1	perfekte Korrelation

5 Zielsetzung und Versuchsplanung

Wie im Kapitel 2 erläutert, gestaltet sich die Differenzierung von Rindfleisch von Tieren, die mit natürlichen Steroiden behandelten wurden, und von unbehandelten Tieren problematisch. Einen Ansatzpunkt liefert die Bestimmung von Steroidhormonmustern. Erste Bestimmungen von Steroidhormonmustern von Fleisch weniger Synovex-S behandelter Ochsen zeigten keine nennenswerten Unterschiede zu unbehandelten Tieren (FRITSCHKE et al., 1999).

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Untersuchungen anhand einer größeren Anzahl von Ochsen, die unterschiedlich lange mit einer unterschiedlichen Anzahl von Implantaten behandelt wurden, überprüft werden, ob Unterschiede in den Steroidhormonmustern von behandelten und unbehandelten Tieren festzustellen sind. Einbezogen werden sollten dabei auch die Steroidfettsäureester als Speicherformen der Steroide. Da diese lipophilen Derivate der Steroide vermutlich nicht mit polaren Lösungsmitteln aus dem Gewebe extrahiert werden können, sollte eine andere Extraktionsmethode entwickelt werden.

Da Fettgewebe eine Speicherfunktion für Steroide zugesprochen wird, sollte dieses ebenfalls untersucht werden. Auch hier sollten die Steroidfettsäureester in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

Es ergab sich folgende **methodische Vorgehensweise**:

- Es mußte eine geeignete **Methode zur Hydrolyse der Steroidfettsäureester** entwickelt werden. Dazu mußten diese hydrolysiert werden, um sie als freie Steroide zu bestimmen (siehe Kapitel 6.1).
- Eine geeignete **Methode zur Extraktion der Steroidfettsäureester aus dem Muskelgewebe** mußte entwickelt werden. Aufgrund der veränderten Extraktionsbedingungen mußte die weitere Reinigung in Anlehnung an die bestehende Methode abgewandelt werden (siehe Kapitel 6.2).
- Es sollte eine geeignete **Methode für die Bestimmung von freien Steroiden und Steroidfettsäureestern in Fettgewebe** entwickelt werden (siehe Kapitel 6.3).

Im Anschluß an diese Entwicklungsschritte sollten Muskel- und Fettgewebe aus dem zur Verfügung stehenden **Tierversuch** untersucht werden. Das Augenmerk bei der Auswertung der Daten des Tierversuches sollte auf folgende Punkte gerichtet werden:

- Die durch **unterschiedliche Extraktionsverfahren ermittelten Steroidhormonmuster von Muskelgewebe** sollten verglichen werden.
- Die **Steroidhormonmuster von Muskelgewebe der behandelten und unbehandelten Ochsen** sollten verglichen werden.
- Es sollte ein Vergleich **Steroidhormonmuster von Fettgewebe der behandelten und unbehandelten Tiere** stattfinden.
- Die **Steroidhormonmuster von Muskel- und Fettgewebe** sollen verglichen werden, um festzustellen, welche Steroide im Fettgewebe besonders stark angereichert werden.

6 Methodenentwicklung: Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

6.1 Freisetzung von Steroiden aus ihren Fettsäureestern

Für die Bestimmung von Steroidfettsäureestern boten sich zwei unterschiedliche Vorgehensweisen an. Zum einen bestand die Möglichkeit, Steroidfettsäureester direkt, ohne vorherige Hydrolyse des Esters in Steroid und Fettsäure, zu bestimmen. Diese Bestimmung kann mittels HPLC und UV-Detektion erfolgen (PARIS & RAO, 1989). Dieses Vorgehen setzt voraus, daß bekannt ist, welches Steroid mit welcher Fettsäure verestert ist. Von den zur Untersuchung ausgewählten Steroiden müssen zur Identifizierung Standardsubstanzen vorliegen.

Da weder bekannt war, welche Steroide in Muskel- und Fettgewebe von Rindern verestert vorliegen, noch mit welchen Fettsäuren diese Veresterung stattgefunden hat, wurde eine andere Vorgehensweise verfolgt. Diese sah eine Hydrolyse der Steroidfettsäureester und eine anschließende Bestimmung der freien Steroide vor. Dazu wurden Extrakte des zu untersuchenden Gewebes hergestellt. Diese wurden geteilt, woraufhin der eine Teil nach Hydrolyse der eventuell vorliegenden Steroidfettsäureester untersucht wurde und der andere Teil als Referenz ohne Hydrolyse. Durch dieses Vorgehen sollte in dem der Hydrolyse unterworfenen Teil die Summe der ungebunden vorliegenden Steroide und der aus Fettsäureestern freigesetzten Steroide ermittelt werden. In dem Teil des Extraktes, der keiner Hydrolyse unterworfen wird, werden nur ungebundene Steroide erfaßt. Durch quantitativen Vergleich der Steroidgehalte kann festgestellt werden, ob in dem Gewebe Steroide als Fettsäureester gebunden vorlagen. Dies ist der Fall, wenn in dem der Hydrolyse unterworfenen Teil ein erhöhter Steroidgehalt gegenüber dem nicht behandelten Teil auftritt.

Zur Freisetzung der Steroide aus ihren Fettsäureestern boten sich mehrere Hydrolyseverfahren an. Dabei war wichtig, daß das zur Hydrolyse eingesetzte Verfahren möglichst unselektiv in bezug auf die an der Esterbindung beteiligten Steroide und Fettsäuren ist. Es sollten möglichst keine Nebenreaktionen, die zu Veränderungen des Steroidhormonmusters führen, auftreten. Die Matrix sollte nach Möglichkeit wenig verändert werden, damit die bestehende Reinigungsmethode nur wenig abgewandelt werden muß.

6.1.1 Enzymatische Hydrolyse von Steroidfettsäureestern

Die enzymatische Hydrolyse von Steroidfettsäureestern bot sich in Hinblick auf geringe Veränderungen der Matrix an. Eingesetzt werden sollte ein Enzym, das möglichst unselektiv bezüglich der beteiligten Steroide und Fettsäuren ist.

BETTIN & FÜRST (1989) berichten über den Einsatz von speziell vorbehandeltem Kälberserum zur Hydrolyse von Steroidfettsäureestern. Da nicht bekannt ist, in welchem Maße noch andere, am Steroidmetabolismus beteiligte Enzyme im Serum vorhanden sind, wird diese Methode als nicht geeignet angesehen. Der Einsatz des Serums könnte

zu einer Veränderung des Steroidhormonmusters des Gewebeextraktes durch enzymatische Metabolisierung führen.

NOUROOZ-ZADEH (1990) setzte das Enzym Cholesterol-Esterase zur enzymatischen Hydrolyse von Cholesterolfettsäureestern ein. Die Cholesterol-Esterase wird auch als Sterol-Ester-Hydrolase bezeichnet (EC Nummer 3.1.1.13). Dieses Enzym kommt in vielen Säugetiergeweben vor. Seine Substratspezifität wird unterschiedlich beschrieben. So gehen BROCKERHOLT & JENSEN (1974) davon aus, daß das Enzym weder eine Fettsäure- noch eine Steroidspezifität aufweist. BARMAN (1969) hingegen beschreibt, daß einige Steroide als Substrat nicht geeignet sind.

Da die Sterol-Ester-Hydrolase die Bedingungen einer unselektiven Hydrolyse erfüllen könnte, wurde die Substratspezifität anhand von Standardsubstanzen unter Modellbedingungen überprüft und die optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt.

Als Standardsubstanzen wurden Testosteronenanthat, Testosteronbenzoat, Estradiolstearat, Cortisonacetat und Cholesterololeat eingesetzt. Diese Substanzen repräsentieren unterschiedliche Steroidgruppen und unterschiedliche Gruppen von Säuren. Dabei kommen Benzoate von Steroiden nicht natürlich vor, werden aber als Anabolika eingesetzt. Die Positionen der Veresterung unterscheiden sich bei den ausgewählten Substanzen. So tritt die Veresterung bei Cholesterol an C3 auf, während die anderen Steroide an C17 (Testosteronenanthat und –benzoat, Estradiolstearat) und an C21 (Cortisonacetat) verestert sind.

Um einen Kontakt des lipophilen Substrates mit dem Enzym in wäßriger Lösung zu gewährleisten wurden Emulgatoren eingesetzt. Es wurden sowohl Rinderserumalbumin als auch Taurocholat getestet. BARMAN (1969) und BROCKERHOLT & JENSEN (1974) beschreiben eine Steigerung der Aktivität der Esterase durch Taurocholat. Nach Zugabe des Emulgators zu den gelösten Standardsubstanzen wurde das Enzym in einer Pufferlösung zugesetzt, die das pH-Optimum der Esterase von pH 7,0 aufwies. Die Hydrolyse wurde bei dem Temperaturoptimum des Enzyms von 37 ° C durchgeführt. Die Reaktionszeiten für die Versuche wurden von 30 Minuten bis zu 12 Stunden variiert. Im Anschluß an die Hydrolyse wurden die freigesetzten Steroide mit Dichlormethan aus der Reaktionslösung extrahiert. Der Extrakt wurde mit einem Injektionsstandard versetzt, zur Trockene gebracht und derivatisiert. Die Analyse erfolgte mittels GC-FID. Die Bestimmung der freigesetzten Menge erfolgte mit Hilfe eines externen Standards. Die systematischen Namen der Standardsubstanzen, die genauen Versuchsbedingungen sowie die GC-FID Bedingungen finden sich in Anhang 9.2.2, 9.11 und Anhang 9.4.

Die Ergebnisse der maximal erzielten Freisetzung für die jeweiligen Emulgatoren sind in **Tabelle 4** angegeben.

Tabelle 4 – Freisetzungsraten der Steroide mittels enzymatischer Hydrolyse nach optimierten Reaktionsbedingungen

Reaktionsbedingungen	Testosteron aus Enanthat	Testosteron aus Benzoat	Estradiol aus Stearat	Cortison aus Acetat	Cholesterol aus Oleat
Taurocholat; 1 Std. 37 ° C;	79,2 %	n.n.	n.n.	n.n.	47,1 %
Rinderserumalbumin 12 Std. 37 ° C	87,6 %	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. nicht nachweisbar

Die Freisetzung von Testosteron aus Testosteronenanthat gelang bei dem Einsatz von Rinderserumalbumin als Emulgator nicht reproduzierbar. Dargestellt ist das beste erzielte Ergebnis.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine Substratspezifität des Enzyms auftritt. Diese Substratspezifität scheint sowohl das an der Esterbindung beteiligte Steroid als auch die Säure zu betreffen. So ist anscheinend keine Hydrolyse bei Beteiligung einer aromatischen Säure möglich (Testosteronbenzoat). Ebenso tritt keine Hydrolyse bei Vorliegen von Estradiol auf, was darauf hindeutet, daß eine Hydrolyse bei Vorliegen eines aromatischen Steroids nicht möglich ist. Auch Cortisonacetat scheint nicht hydrolysierbar zu sein, was auf die Esterbindung an C21 zurückzuführen sein könnte.

Probleme bei der Hydrolyse können ebenfalls auf den schlechten Kontakt zwischen Enzym und Substrat zurückzuführen sein, da sich die eingesetzten Emulgatoren als nicht sehr leistungsfähig erwiesen und die Steroidfettsäureester schlecht im wäßrigen Medium löslich sind. Rinderserumalbumin wies eine geringe mechanische Belastbarkeit auf, so daß es bei Behandlung der Reaktionslösung im Ultraschallbad oder bei ständigem Rühren zur Denaturierung des Proteins kam, das dann keinerlei Emulgator-Eigenschaften mehr aufwies. Da Taurocholat ebenso wie die Analyten eine Steroidstruktur aufweist, zeigte es Störpeaks in den Chromatogrammen. Die Verwendung leistungsfähigerer Emulgatoren hingegen würde die Extraktion der freigesetzten Steroide aus der Reaktionslösung mittels flüssig-flüssig Extraktion unmöglich machen und damit ebenso die gaschromatographische Analyse.

Da, wie gezeigt wurde, bei Anwendung dieser Methode Probleme in Hinblick auf die Substratspezifität des Enzyms auftreten und kein geeigneter Emulgator ermittelt werden konnte, wurde diese Methode als nicht geeignet angesehen und nicht weiter verfolgt.

6.1.2 Chemische Hydrolyse von Steroidfettsäureestern – Umesterung

Durch Umesterung der Steroidfettsäureester werden die Säurekomponenten mit anderen Alkoholen verestert, wodurch die Steroide als Alkoholkomponenten freigesetzt werden. Nach BIEDERMANN et al. (1993) bietet die Umesterung im Gegensatz zur Verseifung Vorteile. Da sich kein Seifenstock bildet, ist die Extraktion der Steroide aus der Reaktionslösung einfacher. Es sind keine langen Reaktionszeiten und keine hohen Temperaturen notwendig. So kann eine Umesterung von Steroidfettsäureestern innerhalb von 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgen. SCHMARR et al. (1996) beschreiben ein Verfahren zur Umesterung von Steroidfettsäureestern, bei dem die Reaktion mit 10 %iger Natriummethylatlösung in Methanol, 4:6 verdünnt mit *n*-Methyl-*tert*-butylether (MTBE), erfolgte. Die Reaktionszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Diese Reaktionslösung wurde in Hinblick auf Reaktionszeit und Temperatur getestet. Als Steroidfettsäureester wurde für die Versuche ein Testosteronenanthat-Standard herangezogen. Bei der Umesterung ist nicht mit selektiven Freisetzungsreaktionen, aber aufgrund der Reaktionsbedingungen mit Nebenreaktionen der empfindlichen Steroide mit Seitenkette zu rechnen. Aus diesem Grund wurden neben der Testosteronenanthat-Standardlösung zur Überprüfung der Freisetzung Standardlösungen der ungebundenen Steroide eingesetzt, die anfällig für Nebenreaktionen sein könnten. Ausgewählt wurden Pregnenolon und Progesteron sowie Cortison als Vertreter der Corticoide. Die Empfindlichkeit gegenüber drastischeren Reaktionsbedingungen ist auf die Seitenkette an

C17 zurückzuführen. Um die Reaktion abubrechen, wurde mit Salzsäure neutralisiert und die Steroide mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurden die Extrakte zur Trockene gebracht, mit einem Injektionsstandard versetzt und derivatisiert. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe eines externen Standards. Die Wiederfindungsraten der empfindlichen Steroide mit Seitenkette wurden ermittelt, indem die ermittelten Gehalte dieser Steroide nach Behandlung mit Umesterungslösung mit denen des externen Standards verglichen wurden. Die Versuchsbedingungen finden sich in Anhang 9.11.

In **Tabelle 5** sind die Ergebnisse für unterschiedliche Reaktionszeiten dargestellt. Die aufgeführten Reaktionen fanden bei Raumtemperatur statt.

Die Freisetzung von Testosteron aus Testosteronenanthat gelingt schon nach 30 Minuten fast vollständig. Cortisol ist in der Reaktionslösung nicht mehr nachweisbar. Da die Corticoide über eine Seitenkette mit sauerstoffhaltigen, funktionellen Gruppen verfügen, sind sie gegenüber drastischen Reaktionsbedingungen wie hohen pH-Werten sehr anfällig. Die Wiederfindungsrate des Progesterons nimmt mit der Zeit zu. Die geringe Wiederfindungsrate nach kurzer Reaktionszeit läßt sich dadurch erklären, daß ein Abbau des Progesterons bei diesen Reaktionsbedingungen stattgefunden hat. Die Zunahme der Wiederfindungsrate des Progesterons bei zunehmender Reaktionszeit könnte durch eine Bildung von Progesteron aus anderen Steroiden, hier zum Beispiel Pregnenolon und den Corticoiden, zurückzuführen sein, die der Abbaureaktion überwiegt. Die Zunahme ist also nicht auf eine Freisetzungsreaktion zurückzuführen.

Die Ergebnisse lassen eine Reaktionszeit von 30 Minuten für weitere Versuche geeignet erscheinen.

Tabelle 5 – Freisetzungsraten von Testosteron aus Testosteronenanthat nach Umesterung mit 10 %iger Natriummethylatlösung und Wiederfindungsraten der Steroide mit Seitenkette bei Raumtemperatur

Reaktionszeit	Freisetzung von Testosteron	WFR Pregnenolon	WFR Progesteron	WFR Cortisol
1 Minute	79 %	83 %	56 %	n.n.
10 Minuten	76 %	76 %	67 %	n.n.
30 Minuten	95 %	81 %	77 %	n.n.
60 Minuten	93 %	73 %	78 %	n.n.

WFR = Wiederfindungsrate n.n. = nicht nachweisbar

Um festzustellen, ob auch bei Vorliegen der Steroidfettsäureester in einer Fettmatrix 30 Minuten Reaktionszeit für eine vollständige Umesterung sowohl der Matrix als auch der Analyten genügen, sollte ein Umesterungsversuch an einer der Probenmenge äquivalenten Menge einer Modellmatrix durchgeführt werden, die ebenso wie die Matrix Rinderfett Triglyceride enthält. Ein ausreichendes Volumen der Umesterungslösung sowie eine ausreichende Reaktionszeit sind notwendig, um sicherzustellen, daß zunächst alle Triglyceride umgeestert werden, da die Umesterung der Steroidfettsäureester langsamer verläuft als die der Triglyceride (BIEDERMANN et al., 1993). Als Modellmatrix wurde Schweineschmalz gewählt. Die eingesetzte Menge Schweineschmalz wurde der späteren realen Probenmenge angepaßt. Die Umesterung sollte im Rahmen des später zu untersuchenden Tierversuchs zunächst bei intramuskulärem Fett durchgeführt werden.

Dieses sollte nach der methanolisch-wäßrigen Extraktion des Muskelgewebes durch Extraktion mit unpolarem Lösungsmittel extrahiert werden, um unpolare Steroidfettsäureester zu erfassen. Anschließend sollte dieser Extrakt einer Umesterung unterzogen werden.

Da zur methanolisch-wäßrigen Extraktion 20 g Muskelgewebe eingesetzt werden, kann bei einem durchschnittlichen Fettgehalt des Muskelgewebes von 5 % Fett von etwa 1 g intramuskulärem Fett pro Versuchsansatz ausgegangen werden. Von der Modellmatrix Schweineschmalz wurde entsprechend 1 g für den folgenden Versuch eingesetzt.

1 g Schweineschmalz wurde mit 15 mL Umesterungslösung versetzt. Nach 30 Minuten und mehrmaliger Behandlung im Ultraschallbad wurde die Lösung mit Salzsäure neutralisiert und anschließend mit Chloroform extrahiert. Die Lösung wurde im Vergleich zu einem in Chloroform gelösten Schweineschmalz-Standard mittels Dünnschichtchromatographie untersucht, um festzustellen, ob eine vollständige Umesterung der Triglyceride stattgefunden hat. Die Bedingungen finden sich in Anhang 9.11. Es wurde festgestellt, daß nach 30 Minuten eine vollständige Hydrolyse der Matrix stattgefunden hatte. Da die Lösung nach 30 Minuten immer noch stark alkalisch reagierte, wurde davon ausgegangen, daß die Umesterungslösung im Überschuß vorlag und somit auch eine Umesterung der Steroidfettsäureester gewährleistet ist.

6.1.3 Chemische Hydrolyse der Steroidfettsäureester - Verseifung

Als Alternative zur genannten Umesterung wurde eine Verseifung der Steroidfettsäureester durchgeführt, um festzustellen, ob diese Reaktion ebenso eine Zerstörung der Steroide mit Seitenkette hervorruft.

Zur Verseifung wurde eine von ARDÉVOL et al. (1997) vorgeschlagene, 0,5 M ethanolische Kalilauge eingesetzt. Die beschriebene Reaktion wurde bei 85 °C durchgeführt. Für die hier durchgeführten Versuche wurden zunächst mildere Reaktionsbedingungen bei Raumtemperatur und als Alternative bei 60 °C gewählt.

Für die Untersuchungen wurden die gleichen Standardlösungen wie unter 6.1.2 eingesetzt. Sowohl Reaktionszeit als auch -temperatur wurden variiert. Die genauen Bedingungen finden sich in Anhang 9.11.2. In **Tabelle 6** sind die Ergebnisse dieser Versuche aufgeführt.

Tabelle 6 – Freisetzungsraten von Testosteron aus Testosteronenanthat nach Verseifung mit 0,5 M KOH und Wiederfindungsraten der Steroide mit Seitenkette

Reaktionsbedingungen	Freisetzung von Testosteron	WFR Pregnenolon	WFR Progesteron	WFR Cortisol
10 Minuten; RT	54 %	107 %	88 %	n.n.
30 Minuten; RT	106 %	91 %	87 %	n.n.
60 Minuten; RT	103 %	78 %	87 %	n.n.
60 Minuten; 60 °C	74 %	62 %	69 %	n.n.

RT = Raumtemperatur WFR = Wiederfindungsrate n.n. = nicht nachweisbar

Auch bei diesen Reaktionsbedingungen ist, ebenso wie bei der Umesterung, kein Cortisol nachweisbar. Eine optimale Freisetzung des Testosterons wird nach 30 Minuten bei Raumtemperatur erzielt. Bei Verlängerung der Reaktionszeit findet ein Abbau des Pregnenolons statt. Bei Erhöhung der Temperatur verringern sich die Wiederfindungsraten aller untersuchten Steroide.

Anschließende Versuche mit 1 g Modellmatrix ergaben, daß bei Raumtemperatur mit 20 mL 0,5 M ethanolischer Kalilauge keine vollständige Verseifung der Matrix möglich ist. Die Überprüfung erfolgte dünnschichtchromatographisch wie in Anhang 9.11 beschrieben. Durch Erhöhung der Konzentration der Kalilauge auf 2 M konnte eine vollständige Verseifung der Matrix erreicht werden. Versuche mit einem Steroid-Mischstandard ergaben, daß durch die Erhöhung der Konzentration kein verstärkter Abbau der Steroide erfolgte.

Die Extraktion der freigesetzten Steroide aus der Seifenlösung gestaltete sich sehr schwierig, da sehr starke Emulsionsbildung einsetzte.

6.1.4 Auswahl der geeigneten Methode zur Freisetzung von Steroiden aus Steroidfettsäureestern

Die enzymatische Hydrolyse der Steroidfettsäureester mit Hilfe der Steroid-Ester-Hydrolase wurde aus den in Kapitel 6.1.1 genannten Gründen nicht weiter verfolgt.

Da sowohl bei der Umesterung als auch bei der Verseifung der Steroidfettsäureester eine nahezu vollständige Freisetzung des Steroids aus dem Ester erfolgte und bei geeigneten Reaktionsbedingungen die Steroide mit Seitenkette nur geringfügig zerstört wurden, wurde für die weiteren Untersuchungen die Methode gewählt, bei der die Abtrennung der freigesetzten Steroide aus der Matrix am besten gelang. Dies war bei der Freisetzung der Steroide durch Umesterung der Fall. Bei der Freisetzung der Steroide durch Verseifung entstanden bei Anwesenheit der Matrix große Mengen von Seifen, die sich bei der Abtrennung der freigesetzten Steroide durch flüssig-flüssig-Extraktion hinderlich auswirkten. Dies war bei der Freisetzung durch Umesterung nicht der Fall. Versuche, die abgeschiedenen Seifen durch Zentrifugation abzutrennen, die Seifen als Kalkseife zu fällen oder nach Ansäuern die Fettsäuren auszufrieren, schlugen fehl.

Bei allen im folgenden durchgeführten Freisetzungen wurde die Umesterung mit Natriummethylat-Lösung verdünnt mit MTBE eingesetzt (siehe 6.1.2).

6.2 Nachweis von Steroiden und deren Fettsäureestern im unpolaren Extrakt des Muskelgewebes

6.2.1 Unpolare Extraktion

Steroide sind sowohl in einigen polaren Lösungsmitteln als auch in einigen unpolaren Lösungsmitteln löslich. Steroidextraktionen aus Geweben werden in der Regel mit polaren Lösungsmitteln wie Wasser, wäßrigen Pufferlösungen oder methanolisch-wäßrigen Lösungen durchgeführt. Methanolisch-wäßrige Lösungen werden bevorzugt für die Bestimmung von Steroiden mittels GC-MS eingesetzt (VERBEKE, 1979; BERGNER-LANG & KÄCHELE, 1981; BUNDESGESUNDHEITSAMT, 1989; FRITSCHKE et al., 1999). Wäßrige Pufferlösungen werden häufig für die anschließende Bestimmung mittels

immunologischer Methoden verwendet (SJÖVALL & AXELSON, 1982; HENRICKS & TORRENCE, 1983; HOFFMANN, 1983; MEYER, 1990). Der Vorteil von polaren gegenüber unpolaren Lösungsmitteln ist die gleichzeitig geringe Extraktion von hydrophoben Substanzen, die die weitere Reinigung des Extraktes erschweren.

Eine Anreicherung von Steroiden im Fettgewebe ist bekannt (siehe Kapitel 2.2.2). Auch weist Muskelgewebe mit einem höheren Fettgehalt laut FRITSCHE et al. (1998b) andere Steroidhormonmuster als Muskelgewebe mit geringerem Fettgehalt auf. Diese Zusammenhänge erlauben die Vermutung, daß Steroide im Muskelgewebe in Zellen mit hohem Fettgehalt vorliegen oder sogar akkumuliert werden. Wenn dies der Fall ist, werden diese Steroide vermutlich nicht mit den oben genannten polaren Extraktionsmitteln erfaßt. Steroidfettsäureester sind sehr unpolar und in polaren Lösungsmitteln unlöslich. Aus diesem Grund werden diese Substanzen mit den üblichen Extraktionsverfahren vermutlich nicht erfaßt, da sie in Micellen von anderen lipophilen Bestandteilen eingeschlossen vorliegen können. Diese Steroide würden somit nicht extrahiert werden.

Um sowohl die Steroide zu erfassen, die in Zellen mit hohem Fettgehalt vorliegen, als auch Steroidfettsäureester, sollte die Extraktionsmethode modifiziert werden. Da festgestellt werden sollte, welcher Anteil der Steroide mit der methanolisch-wäßrigen Extraktion erfaßt wird, wurde diese polare Extraktion beibehalten. Der Rückstand der methanolisch-wäßrigen Extraktion von 20 g Muskelgewebe sollte mit unpolaren Lösungsmitteln nachextrahiert werden.

Um eine Benetzung des Rückstandes zu gewährleisten, konnte im Anschluß an die methanolisch-wäßrige Extraktion (siehe Kapitel 4.2) nicht mit einem stark unpolaren, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel extrahiert werden. Es wurde Ethylacetat als Lösungsmittel mittlerer Polarität gewählt, das einen geringen Wasseranteil zu lösen vermag. Zur Extraktion wurden 50 mL Ethylacetat eingesetzt. Lösungsmittel und Rückstand wurden mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert und das Ethylacetat dekantiert. Im Anschluß daran wurde der Rückstand der Ethylacetat-Extraktion mit 50 mL *n*-Hexan versetzt und nochmals extrahiert, um auch die sehr unpolaren Steroidfettsäureester zu erfassen. Die Extraktion wurde ebenso wie die mit Ethylacetat durchgeführt und der *n*-Hexan-Extrakt mit dem Ethylacetatextrakt vereinigt.

Die Extraktion mit der methanolisch-wäßrigen Lösung bildete den polaren Extrakt und der Ethylacetat/*n*-Hexan-Extrakt den unpolaren Extrakt.

Der polare Extrakt wurde, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, zweimal mit *n*-Hexan extrahiert. Die dabei anfallenden *n*-Hexan-Phasen wurden dem unpolaren Extrakt zugeführt.

6.2.2 Behandlung des polaren Extraktes (Methanol/Wasser)

Die weitere Reinigung des polaren Extraktes erfolgte wie in Kapitel 4.2 beschrieben.

6.2.3 Behandlung des unpolaren Extraktes (Ethylacetat/*n*-Hexan)

6.2.3.1 Freisetzung der Steroide aus Steroidfettsäureestern

Der Rückstand der Ethylacetat/*n*-Hexan-Extraktion wurde der in Kapitel 6.1.2 beschriebenen Umesterung unterworfen. Es wurden 20 mL Umesterungslösung

zugesetzt, um einen Überschuss der Reaktionslösung zu garantieren. Der Rückstand wurde mit Hilfe eines Ultraschallbades suspendiert. Die Reaktion erfolgte 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lösung mit 2 M Salzsäure neutralisiert und dreimal mit 10 mL Chloroform extrahiert. Chloroform wurde als Extraktionsmittel gewählt, da alle Steroide sehr gut in diesem Lösungsmittel löslich sind. Der Chloroform-Extrakt wurde zur Trockene gebracht.

Da festgestellt werden sollte, ob im Muskelgewebe Steroidfettsäureester vorliegen, wurden von den Proben zwei Ansätze durchgeführt (siehe Kapitel 6.1). Der unpolare Extrakt des einen Ansatzes wurde, wie oben beschrieben, mit Umesterungslösung behandelt, während der unpolare Extrakt der anderen Probe mit einem Gemisch aus Methanol und MTBE versetzt wurde, das eine der Umesterungslösung vergleichbare Zusammensetzung der Lösungsmittel hatte (Methanol/ MTBE 4/6 V/V). Mit dieser Probe wurde ebenso verfahren wie mit der Probe, die der Umesterung unterworfen wurde.

6.2.3.2 Clean-up des unpolaren Extraktes

Der nach dem Ansäuern der Umesterungslösung erhaltene Chloroform-Extrakt enthält nicht nur die freien und die aus den Steroidfettsäureestern freigesetzten Steroide, sondern auch andere hydrophobe Substanzen wie Fettsäuremethylester. Um Störungen bei der GC-MSD und Verunreinigungen des Massenspektrometers zu vermeiden, müssen die Steroide weitgehend von diesen Begleitsubstanzen getrennt werden. Diese Trennung effektiv durchzuführen ist schwierig, da die störenden Substanzen häufig eine ähnliche Polarität aufweisen wie die Analyten. Erschwerend wirkt sich die nicht einheitliche Polarität der zu bestimmenden Steroide aus. Als Reinigungsverfahren bieten sich die Flüssig-flüssig-Extraktion und die Festphasenextraktion an.

Als effektive Entfettungsmethode hat sich die Flüssig-flüssig-Extraktion mit *n*-Hexan erwiesen (siehe Kapitel 4.2). Da bei dem gewählten Verhältnis von Methanol/Wasser zu *n*-Hexan keine Verluste von Steroiden durch Lösung der Steroide in der *n*-Hexan-Phase zu erwarten sind, wurde diese Extraktion als erster Schritt zur Entfernung hydrophober Störsubstanzen gewählt. Das Chloroform wurde mit Hilfe eines Vakuumrotationsverdampfers entfernt und der Rückstand in 70 mL Methanol und 20 mL Wasser aufgenommen. Diese Lösung wurde zweimal mit 20 mL *n*-Hexan extrahiert.

Da weitere Verunreinigungen des Extraktes zu erwarten waren, bot sich als weiterer Reinigungsschritt eine Festphasenextraktion an einer polaren Phase mit mehreren Waschschritten an. Mit Hilfe dieses Schrittes können auch polarere Substanzen als mit der flüssig-flüssig-Extraktion mit *n*-Hexan entfernt werden. Hierfür wurde ein Reinigungsschritt mit einer Kieselgel-Festphase entwickelt. Die Kieselgel-Festphase mit einer Sorbensmenge von 500 mg wurde mit Ethylacetat, welches 2,6 % Wasser enthielt, deaktiviert, um auch eine Elution der polaren Steroide zu ermöglichen. Anschließend wurde mit *n*-Hexan konditioniert.

Die Probenaufgabe mußte in einem unpolaren Lösungsmittel erfolgen. Zur Überführung der Analyten in ein unpolares Lösungsmittel wurde die Methanol/Wasser-Phase des ersten Reinigungsschrittes mit Dichlormethan extrahiert. Dieses wurde zur Trockene gebracht und der Rückstand in einem Chloroform/*n*-Hexan-Gemisch aufgenommen, welches auf die Kieselgel-Festphase gegeben wurde. Es folgten mehrere Waschschrritte mit *n*-Hexan/MTBE-Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung mit steigendem

MTBE-Anteil. Die Elution der Steroide erfolgte mit Ethylacetat, welches 2,6 % Wasser enthielt. Zu dem Eluat wurden 20 mL Wasser gegeben und das Ethylacetat mit Hilfe eines Vakuumrotationsverdampfers entfernt. Aus der wäßrigen Lösung ist eine Fraktionierung der Steroide über die C8-Festphase und eine weitere Probenvorbereitung nach der in Kapitel 4.2 geschilderten Methode möglich.

Die Fraktionierung der Steroide und ihre Messung erfolgte wie in Kapitel 4.2 beschrieben.

Das Arbeitsschema für die modifizierte Extraktion ist in **Abbildung 5** dargestellt.

Die genaue Arbeitsvorschrift findet sich in Anhang 9.8.

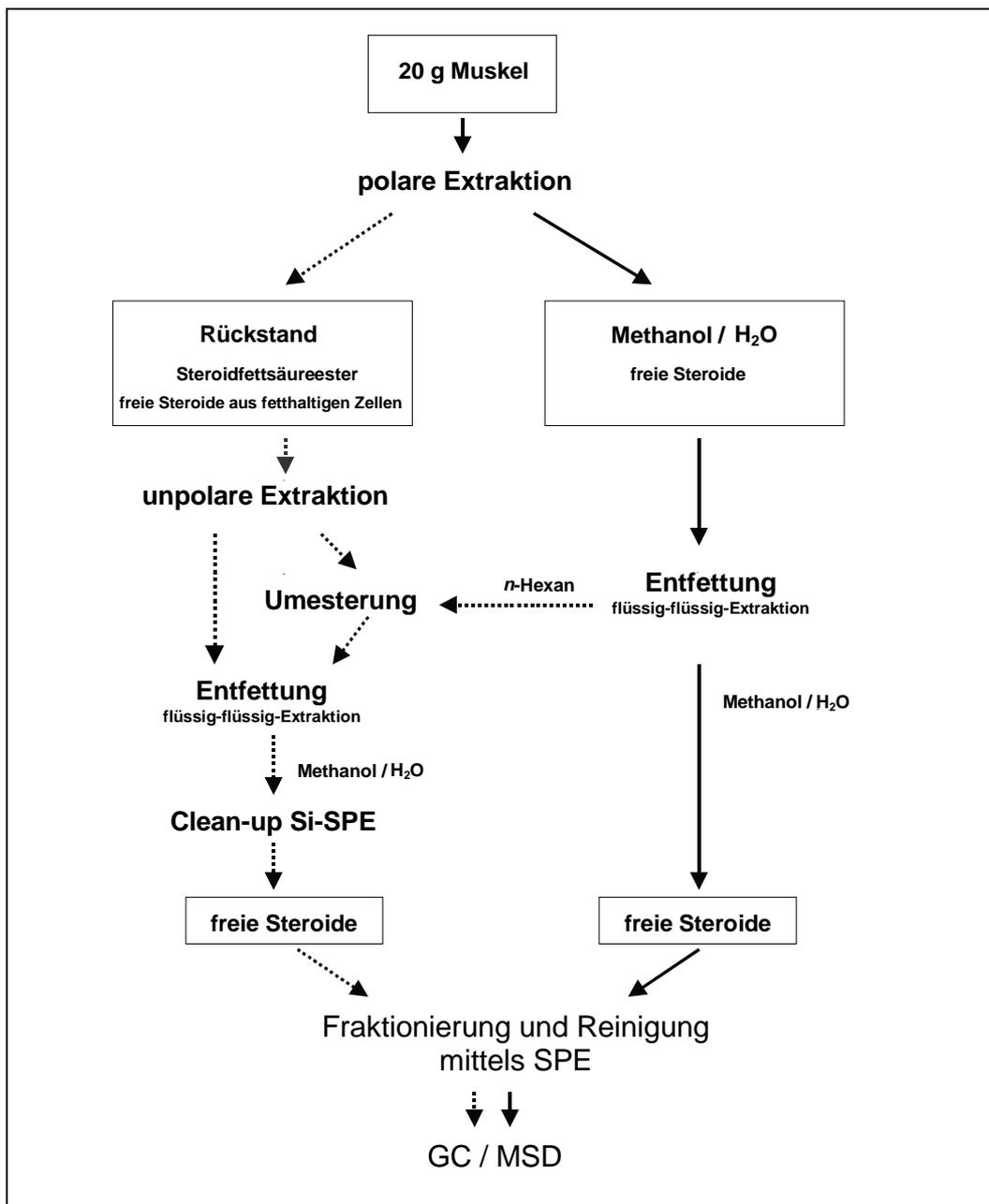


Abbildung 5 – Schematische Darstellung der polaren und unpolaren Extraktion

6.2.4 Untersuchung von Proben

6.2.4.1 Nachweis von Fettsäureestern im Muskelgewebe

Um festzustellen, ob in den unpolaren Extrakten des Muskelgewebes (MLD) Steroidhormonfettsäureester vorliegen, wurde das Muskelgewebe dreier Ochsen aus dem Tierversuch untersucht. Die drei Ochsen entstammten der ersten Schlachtgruppe. Dabei wurden von jeder Probe zwei Ansätze analysiert. Von jeder Bestimmung wurde ein polarer Extrakt und ein unpolarer Extrakt erstellt.

Ein unpolarer Extrakt aus dem doppelten Probenansatz wurde einer Umesterung unterzogen, der andere unpolare Extrakt wurde nicht umgeestert.

Die Gehalte der Steroide der umgeesterten und der nicht umgeesterten unpolaren Extrakte der drei Ochsenmuskelgewebe sind in **Abbildung 6** dargestellt. Man sieht, daß kaum Unterschiede zwischen den Gehalten der umgeesterten und der nicht behandelten Extrakte auftreten. Würden Steroidfettsäureester in nennenswerten Mengen in diesen Muskelgeweben vorliegen, so müßte eine Erhöhung der betroffenen Steroide im umgeesterten Extrakt gegenüber dem nicht behandelten Extrakt auftreten. Man erkennt bei Ochse 833, daß in dem umgeesterten unpolaren Extrakt der DHEA- und der Pregnenolongehalt nach der Umesterung leicht erhöht sind. Testosteron wurde nur in dem umgeesterten unpolaren Extrakt nachgewiesen; allerdings kommt es dort auch nur in sehr geringen Gehalten vor (50 ng/kg). Der Androstanolongehalt ist in dem nicht behandelten unpolaren Extrakt ebenso wie der Progesterongehalt erhöht. Betrachtet man die Gehalte in den Extrakten des Muskelgewebes des Ochsen 828, so sieht man ein ähnlich

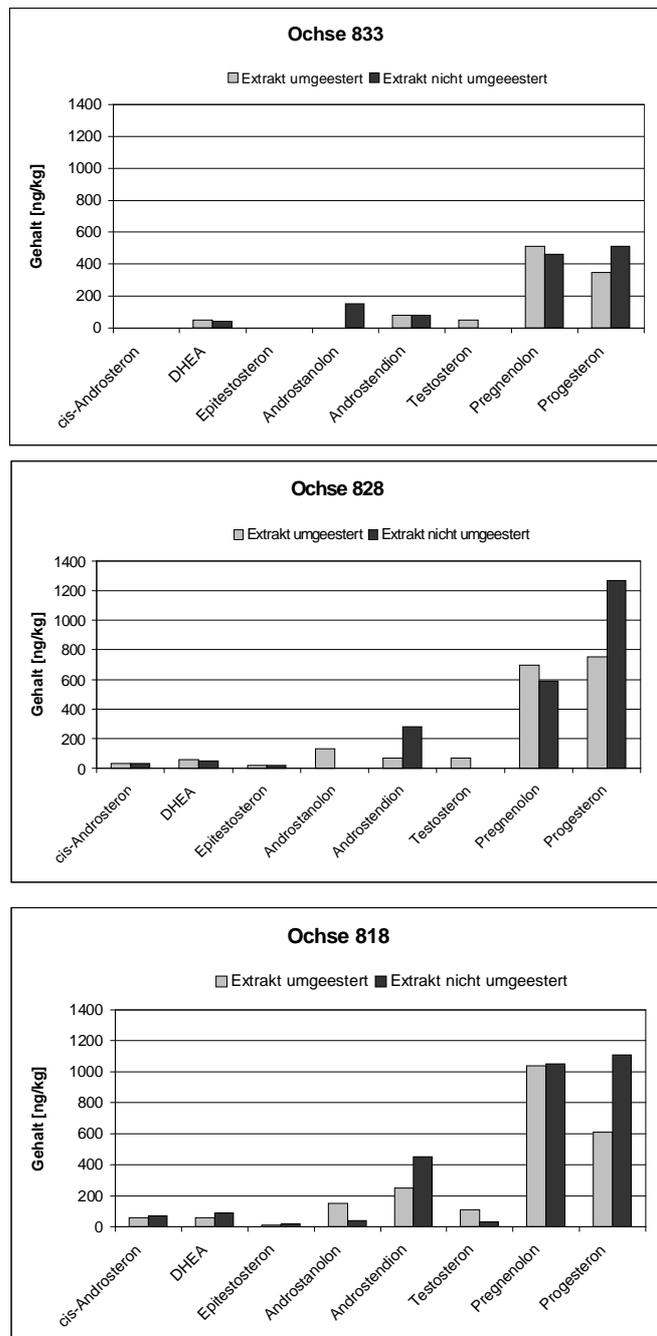


Abbildung 6 – Steroidgehalte der unpolaren Extrakte von Ochsenmuskelgewebe mit und ohne Umesterung

unspezifisches Verhalten. Im umgeesterten unpolaren Extrakt liegt eine leichte Erhöhung des Pregnenolongehaltes vor. Androstanolon und Testosteron kommen nur im umgeesterten Extrakt vor. Diese Gehalte sind relativ gering. Der Progesterongehalt ist in dem nicht behandelten unpolaren Extrakt stark erhöht. Dies ist auch bei den unpolaren Extrakten des Muskelgewebes des Ochsen 818 der Fall. Hier tritt eine leichte Erhöhung des Androstanolon- und auch des Testosterongehaltes im umgeesterten Extrakt auf. Der bei allen untersuchten Proben auftretende niedrigere Progesterongehalt im behandelten unpolaren Extrakt ist wahrscheinlich auf eine Zerstörung des Progesterons bei der Umesterung zurückzuführen. Bei keinem der untersuchten Steroide tritt eine erhebliche Erhöhung eines Gehaltes durch die Umesterung auf. Zwar ist bei allen drei Proben der Testosterongehalt nach der Umesterung erhöht, die Testosterongehalte sind aber bei allen untersuchten Ochsen sehr niedrig. Da die untersuchten Extrakte auch nach dem Clean-up noch Störsubstanzen enthielten, war die Quantifizierung zum Teil nur über eine Masse im MS möglich. Falls Steroidfettsäureester überhaupt in Muskelgewebe vorliegen, dann in geringen Mengen. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß Steroidfettsäureester eine Speicherform darstellen, die naturgemäß jedoch nicht im Muskelgewebe angereichert wird.

Da kein eindeutiger Nachweis von Steroidfettsäureestern im Muskelgewebe möglich war, wurde auf die weitere Bestimmung von Steroidgehalten nach der Umesterung in unpolaren Extrakten von Muskelgewebe verzichtet.

Die Gehalte der umgeesterten und nicht umgeesterten unpolaren Extrakte der drei Ochsen sind tabellarisch in Anhang 9.12.1 angegeben.

6.2.4.2 Vergleich der Steroidgehalte des unpolaren und polaren Extraktes von Muskelgewebe

Wie schon erwähnt, wurden Steroidhormonbestimmungen in Gewebe meist nach polarer Extraktion durchgeführt. Aufgrund der Löslichkeit der Steroide in unpolaren Lösungsmitteln und ihrer Eigenschaft, sich in Fettgewebe anzureichern, bestehen Zweifel an der Vollständigkeit dieser Extraktionsmethode. Aus diesem Grund sollen die Gehalte der polaren Extraktion, die mit einer Mischung aus Methanol und Wasser durchgeführt wurde, mit den Gehalten, die durch die anschließend durchgeführte Extraktion mit Ethylacetat und *n*-Hexan erzielt wurden, verglichen werden.

Untersucht wurde der MLD der Ochsen der Schlachtgruppe 1. Bei den Ochsen 833, 818 und 828 werden nur die Gehalte im unpolaren Extrakt, die durch Analyse ohne Umesterung erhalten wurden, herangezogen. Um festzustellen, ob eine Abhängigkeit zwischen den Steroidgehalten des unpolaren Extraktes und dem Fettgehalt der Muskeln bestand, wurde der Fettgehalt wie in Kapitel 4.3 beschrieben bestimmt.

In **Tabelle 7** sind die Gesamtsteroidgehalte, die sich aus den Gehalten der unpolaren und der polaren Extrakte zusammensetzen, sowie der prozentuale Anteil der unpolaren Extrakte am Gesamtgehalt angegeben. Berechnet wurde der mittlere prozentuale Anteil des unpolaren Extraktes sowie die Standardabweichung. Ebenso angegeben ist der Fettgehalt der untersuchten Muskelgewebe in g/100 g.

Jedes der untersuchten Steroide ist in mindestens 5 der 8 untersuchten unpolaren Extrakte nachweisbar. Die Verteilung der polareren und unpolaren Steroide zwischen polarem und unpolarem Extrakt ist verschieden. Zu den polareren Steroiden gehören cis-

Androsteron, DHEA, Epitestosteron, Androstanolon und Testosteron. Eher unpolar sind Androstendion, Pregnenolon und Progesteron.

Die polareren und physiologisch wirksamen Steroide Androstanolon und Testosteron zeigen sehr große Anteile am Gesamtsteroidgehalt im unpolaren Extrakt, wenn sie in diesem nachweisbar sind. In 6 der 8 untersuchten Proben war Testosteron im unpolaren Extrakt nachweisbar. In diesen Fällen lag der Anteil des Testosterongehaltes im unpolaren Extrakt am Gesamttestosterongehalt zwischen 79 % und 100 %. Bei einer Probe konnte Testosteron nicht im unpolaren Extrakt nachgewiesen werden und in einem Fall lagen die Gehalte unterhalb der Grenze des praktischen Arbeitsbereiches. Wenn Androstanolon nachgewiesen werden konnte, lag es bis auf eine Ausnahme vollständig im polaren oder im unpolaren Extrakt vor. Epitestosteron war bei allen Proben mit weniger als 50 % des Gesamtgehaltes im unpolaren Extrakt vertreten. cis-Androsteron konnte in jedem untersuchten unpolaren Extrakt nachgewiesen werden und machte in diesem bis zu 90 % des Gesamtsteroidgehaltes aus. DHEA verhielt sich ähnlich wie cis-Androsteron, konnte in einem unpolaren Extrakt aber nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 7 – Anteil des unpolaren Extraktes am Gesamtsteroidgehalt in % und Gesamtsteroidgehalte in [ng/kg]

Steroid	Ochse 833 % ([ng/kg])	Ochse 828 % ([ng/kg])	Ochse 866 % ([ng/kg])	Ochse 839 % ([ng/kg])	Ochse 818 % ([ng/kg])	Ochse 831 % ([ng/kg])	Ochse 834 % ([ng/kg])	Ochse 866 % ([ng/kg])	n	Ø	s
cis-Androsteron	26 (60)	39 (70)	79 (80)	77 (80)	90 (60)	58 (40)	33 (50)	90 (40)	8	71	28
DHEA	70 (80)	56 (100)	32 (120)	80 (150)	100 (60)	0 (30)	47 (140)	67 (150)	8	57	31
Epitestosteron	n.n.	44 (40)	50 (60)	48 (30)	n.n.	n.n.	30 (70)	0 (40)	5	34	18
Androstanolon	n.n.	100 (130)	0 (690)	59 (270)	100 (150)	0 (110)	100 (130)	n.n.	6	45	47
Androstendion	34 (230)	27 (270)	83 (1110)	58 (170)	65 (380)	60 (180)	46 (470)	22 (490)	8	49	20
Testosteron	100 (50)	n.n.	0 (140)	89 (900)	100 (110)	88 (80)	79 (120)	83 (120)	7	77	32
Pregnenolon	37 (1400)	41 (1710)	26 (3160)	36 (810)	32 (3170)	48 (990)	41 (1160)	38 (1110)	8	38	6
Progesteron	85 (510)	31 (2400)	41 (1540)	60 (600)	34 (1800)	49 (480)	45 (1220)	44 (510)	8	51	16
Intramuskulärer Fettgehalt [g / 100g]*	0,8	1,1	1,6	1,7	1,8	1,9	2,2	3,0	8	1,8	0,7

n.n. nicht nachweisbar im polaren und im unpolaren Extrakt

0 nachweisbar im polaren aber nicht im unpolaren Extrakt

n Anzahl der Proben, die in den Mittelwert einbezogen wurden

Ø mittlerer prozentualer Anteil des unpolaren Extraktes

s Standardabweichung

* bezogen auf das Muskelgewebe

Die weniger polaren Steroide Pregnenolon, Progesteron und Androstendion konnten in allen untersuchten unpolaren Extrakten nachgewiesen werden und zwar in Anteilen von 22 bis 85 % des Gesamtsteroidgehaltes.

Die Standardabweichungen für die Anteile der Steroide des unpolaren Extraktes am Gesamtsteroidgehalt lagen für Pregnenolon bei 6 %, für Progesteron bei 16 % und für Androstendion bei 20 %. Die Standardabweichungen für die polareren Steroide waren alle größer als 18 % und reichten bis zu 47 %. Die Gesamtgehalte von Pregnenolon, Progesteron und Androstendion waren höher als die der polareren Steroide und lagen zwischen 180 ng/kg und 3170 ng/kg. Die polareren Steroide zeigten Gesamtsteroidgehalte bis zu 160 ng/kg, abgesehen von höheren Gehalten an Androstanolon, die bis zu 690 ng/kg erreichten.

Die Steroidhormonmuster der polaren Extrakte sind vergleichbar mit den Mustern der Gesamtsteroide. Am Beispiel einer untersuchten Probe ist dieser Sachverhalt in **Abbildung 7** dargestellt. Alle anderen untersuchten Proben verhalten sich vergleichbar. Der Gesamtsteroidgehalt ist höher als der Steroidgehalt des polaren Extraktes. Die Verhältnisse der einzelnen Steroide zueinander unterscheiden sich zwischen Gesamtsteroidgehalt und polarem Extrakt nur wenig.

Die Muskelproben zeigten Fettgehalte zwischen 0,8 g/100g Muskelgewebe und 3,0 g/100g Muskelgewebe. Weder der Steroidgehalt des polaren Extraktes noch der Steroidgehalt des unpolaren Extraktes sind vom intramuskulären Fettgehalt abhängig. Daraus folgt, daß auch der Gesamtsteroidgehalt keine Abhängigkeit vom intramuskulären Fettgehalt zeigt. Die Unterschiede der Proben in ihren Steroidgehalten werden durch die individuellen Unterschiede der Steroidproduktion der Ochsen und nicht durch den vorliegenden Fettgehalt bestimmt. Hierbei muß andererseits bedacht werden, daß die intramuskulären Fettgehalte der untersuchten Proben recht gering und vergleichbar sind.

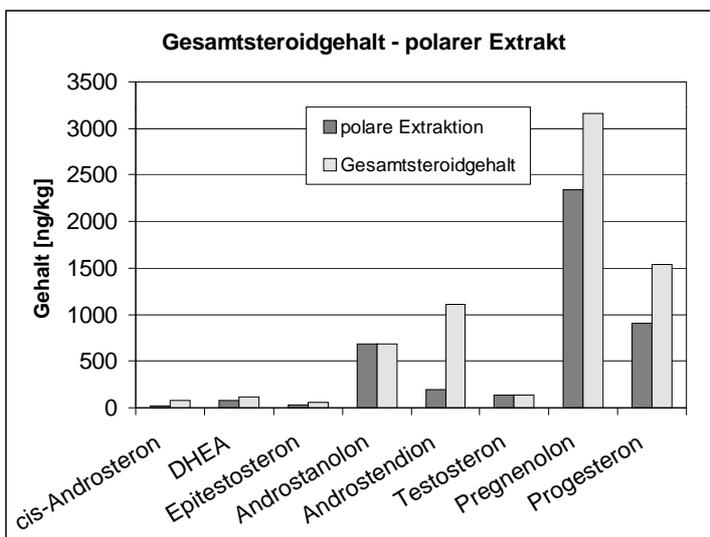


Abbildung 7 – Gesamtsteroidgehalt ermittelt aus der Summe des polaren und des unpolaren Extraktes im Vergleich zum Steroidgehalt des polaren Extraktes

Aus dieser Untersuchung läßt sich folgern, daß die Extraktion von Muskelgewebe mit polaren Lösungsmitteln nicht ausreichend für eine vollständige Extraktion der enthaltenen Steroide ist. Die voneinander abweichenden Gehalte der polareren Steroide in den unpolaren Extrakten können dadurch eine unterschiedliche Lokalisation der Steroide im Gewebe verursacht werden. Steroide, die in Zellen mit höherem Fettgehalt vorliegen, können vermutlich unvollständig mit einem Methanol-Wasser-Gemisch extrahiert werden. Ein weiterer Grund für die unvollständige Extraktion mit Methanol-Wasser-Gemischen kann die Löslichkeit der Steroide sein. Diese sind in etwas weniger polaren Lösungsmitteln wie Methanol ohne Wasseranteil oder Ethylacetat besser löslich.

Deutlich wird, daß die Bestimmung des Gesamtsteroidgehaltes durch Extraktion mit Methanol-Wasser-Gemischen nicht möglich ist. Es muß also beachtet werden, daß die ermittelten Steroidgehalte mit Literaturdaten oder Literaturdaten untereinander, sofern

unterschiedliche Extraktionsverfahren zur Analyse dieser Werte herangezogen wurden, nicht vergleichbar sind. Die Steroidhormonmuster des polaren Extraktes und der Gesamtsteroiden unterscheiden sich jedoch nicht wesentlich.

Von der CEC wurden Steroidgehalte publiziert, die als Anhaltspunkt für den Nachweis einer Anabolikabehandlung von Rindern dienen sollen. Diese Daten basieren auf Analysenwerten aus immunologischen Methoden, die nach polarer Extraktion ermittelt wurden. Dieser Sachverhalt muß bei der Bewertung von Ergebnissen, die einen Rückschluß auf die Anabolikabehandlung eines Rindes gestatten sollen, berücksichtigt werden. Abschätzungen, die über die Steroidaufnahme über das Nahrungsmittel Fleisch gemacht wurden, müssen ebenso kritisch betrachtet werden. In den meistens Fällen wurden sie auf Basis von Werten gemacht, die nach polarer Extraktion ermittelt wurden.

6.3 Bestimmung von Steroiden in Fettgewebe

Steroidgehalte in Fettgewebe wurden bisher hauptsächlich zum Nachweis eines Anabolikaeinsatzes ermittelt. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um die Bestimmung einzelner Steroide, die mittels immunologischer Methoden durchgeführt wurde (HENRICKS et al., 1983; GAIANI & CHIESA, 1986; MEYER, 1990; SCIPPO et al., 1993).

Die Bestimmung von Steroidhormonmustern in Fettgewebe wurde noch nicht durchgeführt, da Fettgewebe als Matrix bei der Steroidbestimmung analytische Probleme aufwirft. So ist eine Abtrennung der Steroide aus einer Fettmatrix aufgrund ihrer guten Fettlöslichkeit ausgesprochen schwierig. Des weiteren bereitet die unterschiedliche Polarität der 10 ausgewählten Steroide bei Wasch- und Elutionsschritten Probleme, wohingegen die Bestimmung eines Steroids einfacher durchzuführen ist. Ebenfalls problematisch gestaltet sich die Wahl der Probenmenge. Für die immunologischen Methoden ist nur eine relativ geringe Probenmenge aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit im Gegensatz zu GC-MSD-Methoden notwendig. Aufgrund der größeren Selektivität der immunologischen Methoden und aufgrund der geringeren erforderlichen Probenmenge ist keine so aufwendige Reinigung des zu untersuchenden Extraktes wie für die Untersuchung mittels GC-MSD notwendig. Für die Bestimmung von Steroidhormonmustern mittels GC-MSD in Fettgewebe sind also im Gegensatz zu den immunologischen Methoden vergleichbar große Probenmengen notwendig. Schon bei der Bestimmung der Steroidhormonmuster von intramuskulärem Fettgewebe wurde festgestellt, daß kleine Mengen Fett Störpeaks bei der gaschromatographischen Analyse hervorrufen, die zudem noch mit den Steroiden vergleichbare Massen im SIM-Modus zeigen. Durch Fettrückstände in der Probe wird die Ionenquelle und der Quadrupol des Massenspektrometers stark verschmutzt, so daß die Empfindlichkeit des Gerätes leidet und eine häufige Reinigung notwendig wird. Diese Umstände machen eine möglichst vollständige Abtrennung der Fettkomponenten notwendig.

Um Steroidhormonmuster in Fettgewebe bestimmen zu können, mußte zunächst die richtige Probenmenge ausgewählt werden. Weiterhin mußte eine Methode zur Extraktion der Steroide sowie eine Methode zur Abtrennung der Matrix entwickelt werden.

Für die Abtrennung der Fettkomponenten einschließlich der Steroidfettsäureester wurde eine säulenchromatographische Methode entwickelt. Die weitere Probenvorbereitung

wurde an die bestehende Methode zur Bestimmung von Steroidhormonmustern in Muskelgewebe angeglichen.

6.3.1 Wahl der Probenmenge und Extraktion der Steroide aus Fettgewebe

6.3.1.1 Wahl der Probenmenge

Bei der Wahl der Probenmenge soll sowohl dem Umstand Rechnung getragen werden, daß eine große Probenmenge zu starken Verunreinigungen führt als auch dem Umstand, daß eine bestimmte Probenmenge notwendig ist, um einige Steroide nachweisen zu können. Von SCIPPO et al. (1993) wird ein fünf- bis acht mal höherer Testosterongehalt in Fettgewebe von männlichen Kälbern als in Muskelgewebe beschrieben. Von HOFFMANN & RATTENBERGER (1977) wurden bei Bullen sogar zehnmals höhere Gehalte im Fett- als im Muskelgewebe ermittelt. Androstendion liegt laut GAIANI & CHIESA (1986) bei männlichen Kälbern in bis zu vierzig mal höheren Gehalten im Fettgewebe gegenüber Muskelgewebe vor. Bei Bullen beträgt der Faktor 30, bei weiblichen Kälbern etwa 10.

Aufgrund dieser Angabe wurden 5 g Fettgewebe als Probenmenge gewählt. Da die Steroide in 20 g Muskelgewebe gut zu quantifizieren sind, sollte auch bei einer nur leichten Erhöhung der Gehalte im Fettgewebe gegenüber dem Muskelgewebe diese Menge für eine Bestimmung ausreichend sein.

6.3.1.2 Extraktion der Steroide

VAN LOOK et al. (1989) homogenisierten zur dünnschichtchromatographischen Bestimmung von Anabolika in Fettgewebe dieses mit *n*-Hexan. Anschließend wurde das Homogenat auf 40 °C erhitzt, bis sich das Fett vollständig in dem Lösungsmittel gelöst hatte.

EDELHÄUSER (1989) wählte eine andere Methode, um Androstenon in Fettgewebe von Ebern zu bestimmen. Das Fettgewebe wurde in einem Mikrowellengerät ausgelassen und anschließend in Lösungsmittel aufgenommen.

Da bei der Erwärmung des Fettes in Lösungsmittel viel Lösungsmittel verdampft, wurde das Fett in gefrorenem Zustand mit Hilfe eines Mixers homogenisiert und anschließend in der Mikrowelle ausgelassen. Das flüssige Fett wurde in *n*-Hexan aufgenommen und mit Hilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde das *n*-Hexan dekantiert und der Rückstand nochmals mit Ethylacetat extrahiert. Das Ethylacetat wurde ebenfalls dekantiert und am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand der Ethylacetat-Extraktion wurde in wenig Ethylacetat gelöst und mit *n*-Hexan aufgenommen. Beide *n*-Hexan Phasen wurden vereinigt.

Der Rückstand der Fettextraktion besteht aus Bindegewebe. So ist davon auszugehen, daß eine vollständige Extraktion der Steroide erfolgte.

Die Arbeitsvorschrift für die Extraktion der Steroide aus Fettgewebe findet sich in Anhang 9.8.

6.3.2 Säulenchromatographie

Mit Hilfe eines säulenchromatographischen Verfahrens sollten Bestandteile der Fettmatrix von den freien Steroiden getrennt werden. Gleichzeitig sollte die Abtrennung der Steroidfettsäureester erfolgen. Grundsätzlich werden für die Isolierung von Steroiden aus Gewebe-Extrakten und Lösungen mittels Säulenchromatographie als Sorbentien sowohl Normalphasen als auch Umkehrphasen eingesetzt. VAN LOOK et al. (1989) beschreiben die Reinigung eines Steroidextraktes aus Fettgewebe an C 18-Material. Hierzu müssen die Steroide allerdings zunächst in ein polares Lösungsmittel überführt werden.

Um den hergestellten *n*-Hexan-Extrakt direkt chromatographieren zu können, muß die Säulenchromatographie an einer Normalphase stattfinden. Die Trennung von Lipidklassen an Kieselgel wurde schon durchgeführt. Hierbei ist zum Beispiel die Trennung von Cholesterin und seinen Fettsäureestern möglich (AL-AHMAD, 1991). Zahlreiche Autoren verwendeten Kieselgel für die Reinigung von Steroidextrakten (STAN & HOHLS, 1979; HSU et al., 1988; BETTIN & FÜRST, 1989; BELLO, 1992).

Als Sorbensmenge wurde nach Vorversuchen mit 5 g Fettgewebe 8 g Kieselgel gewählt.

Die Corticoide Cortisol und Cortison sollten in die Bestimmungen mit einbezogen werden. Da die polaren Corticoide schwer von polaren Sorbentien zu eluieren sind, setzten HARTMANN & STEINHART (1997a) mit Wasser desaktivierte Kieselgel-Kartuschen für die Reinigung einer Fraktion ein, die Corticoidhormone enthielt. Auch von ANDERSSON & SJÖVALL (1983) wird die Elution der polaren Steroide von Kieselgel als problematisch beschrieben. Aus diesem Grund sollte das einzusetzende Kieselgel einer Desaktivierung unterzogen werden, um eine Elution dieser polaren Steroide zu ermöglichen. Die Desaktivierung wurde nach Trocknung des Kieselgels durchgeführt. Das Kieselgel wurde mit dem zur Desaktivierung gewählten Wasseranteil versetzt und über Nacht mit Hilfe einer Rollmaschine bewegt.

Trotz Desaktivierung des Kieselgels mit 30 % Wasser konnten nur Wiederfindungsraten von 20 – 30 % für Cortison und Cortisol mit dem Einsatz von Methanol als starkem Elutionsmittel erzielt werden. Da das Vorliegen von Corticoidhormonen aufgrund ihrer Polarität in Fettgewebe weniger wahrscheinlich erscheint, wurde in Anbetracht der auftretenden Probleme auf die Bestimmung von Cortison und Cortisol in Fettgewebe verzichtet. Für die Bestimmung der anderen Steroide wurde eine Desaktivierung des Kieselgels mit 20 % Wasser gewählt, die bei Standardlösungen gute Wiederfindungsraten ergab. Die Waschschriffe sollten so gewählt werden, daß eine Trennung von freien Steroiden und Steroidfettsäureestern gewährleistet ist. Da nicht bekannt ist, mit welchen Fettsäuren Steroide in Fettgewebe verestert vorliegen, wurde Testosteronenanthat als Standardsubstanz gewählt. Bei Enanthsäure handelt es sich um eine Fettsäure mit kurzer Kettenlänge. Da es sich bei Testosteronenanthat aufgrund der Veresterung mit einer Fettsäure kurzer Kettenlänge um einen relativ polaren Steroidfettsäureester handelt, ist gewährleistet, daß alle weniger polaren Steroidfettsäureester leichter von Kieselgel eluierbar sind. Die geringere Polarität der Ester ist dabei auf länger-kettige Fettsäuren zurückzuführen. Da bisher hauptsächlich Ester zwischen Steroiden und Linol-, Stearin-, Arachidon- und Linolensäure beschrieben wurden (LARNER et al., 1993), ist ein Vorliegen von Steroidfettsäureestern mit kurz-kettigen Fettsäuren weniger wahrscheinlich.

Nach der Probenaufgabe wurde die Säule mit *n*-Hexan, einem *n*-Hexan/Ethylacetat-Gemisch der Zusammensetzung 90/10 V/V und anschließend mit einem *n*-

Hexan/Ethylacetat-Gemisch der Zusammensetzung 75/25 V/V gewaschen. Mit dem letztgenannten Gemisch wird Testosteronenanthat eluiert. Die Waschlösungen wurden vereinigt und enthalten damit die Steroidfettsäureester, die ähnlich polar oder unpolarer als Testosteronenanthat sind, sowie alle unpolaren Fettbestandteile aber keine Steroide. Die Elution der freien Steroide erfolgte mit Methanol. Eine Beschreibung der Methode findet sich in Anhang 9.9.3.3.

6.3.3 Reinigung der Fraktion der freien Steroide

Das methanolische Eluat der Kieselgelsäule wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, um Reste von Ethylacetat und Reste von *n*-Hexan zu entfernen. Der Rückstand wurde in 70 mL Methanol und 20 mL Wasser aufgenommen. Diese Lösung wurde, wie für die Bestimmung von Steroiden in Muskelgewebe beschrieben, zweimal mittels flüssig-flüssig-Extraktion mit *n*-Hexan von weiteren unpolaren Bestandteilen gereinigt. Die methanolisch-wässrige Lösung wurde mit Hilfe des Vakuumrotationsverdampfers von Methanol befreit und die wässrige Lösung wie in Kapitel 4.2 beschrieben über eine C 8-Kartusche zur Festphasenextraktion gereinigt. Dabei wurde der in Kapitel 4.2 beschriebene Elutionsschritt für die Corticoide in diesem Fall als Reinigungsschritt benutzt, um polare Substanzen abzutrennen. Die anschließende Extraktion mit Kalilauge, die bei der Steroidbestimmung im Muskelgewebe der Erfassung der Estrogene dient, wurde als Reinigungsschritt beibehalten, obwohl keine Estrogene erfaßt werden sollten. Durch die Kalilauge werden Reste von Triglyceriden verseift und in die alkalische wässrige Phase überführt.

Eine Darstellung des Analysenweges erfolgt in **Abbildung 8**.

Eine Beschreibung der Methode befindet sich in Anhang 9.9.3.4.

6.3.4 Umesterung und Reinigung der Fraktion der Steroidfettsäureester

Die vereinigten Waschfraktionen der Kieselgelsäule, die die Steroidfettsäureester enthalten, wurden zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde mit 20 mL der in Kapitel 6.1.2 beschriebenen Umesterungslösung versetzt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur und mehrmaliger Behandlung der Lösung im Ultraschallbad wurde die Lösung mit Salzsäure neutralisiert. Es folgte eine Extraktion der Lösung mit Chloroform. Die organische Phase wurde am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in *n*-Hexan aufgenommen und wie in Kapitel 6.4.1 beschrieben weiter behandelt.

Eine Darstellung des Analysenweges erfolgt in **Abbildung 8**.

Eine Beschreibung der Methode befindet sich in Anhang 9.9.3.5.

6.3.5 Ermittlung von Methodenparametern für die Bestimmung freier Steroide in Fettgewebe

Da mit der entwickelten Methode zur Bestimmung von Steroidhormonmustern in Fettgewebe alle Proben des Tierversuchs untersucht werden sollten, sollte die Reproduzierbarkeit der Methode überprüft und eine Kalibrierung durchgeführt werden, um den Linearitätsbereich zu überprüfen.

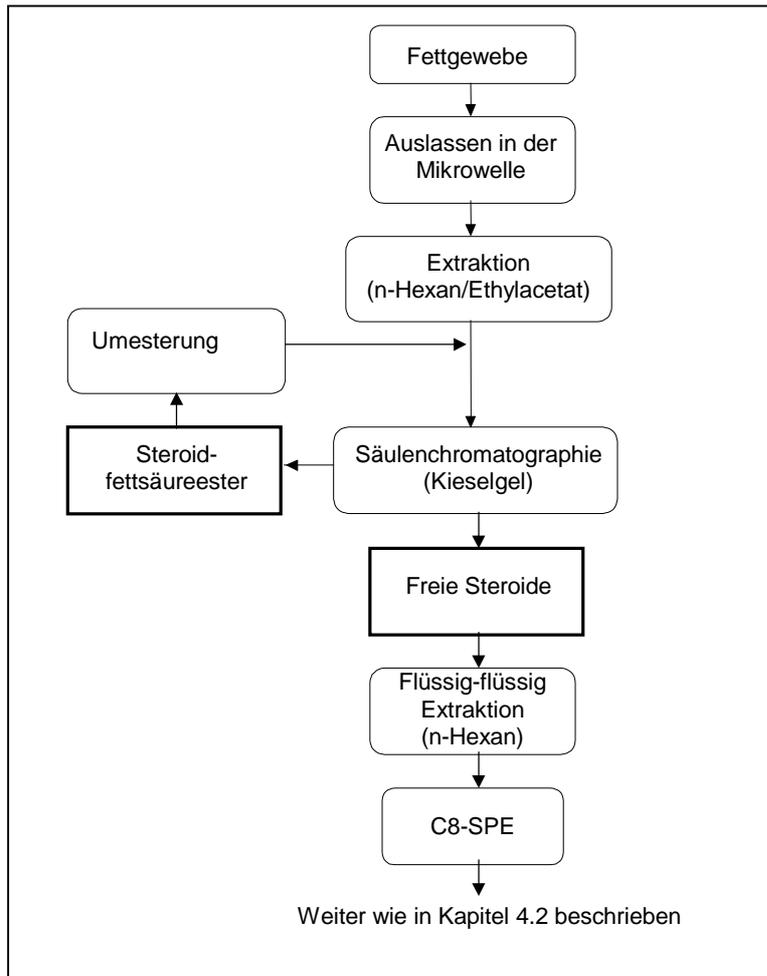


Abbildung 8 - Schematische Darstellung der Methode zur Bestimmung von freien Steroiden und Steroidfettsäureestern in Fettgewebe

6.3.5.1 Linearitätsbereich

Die Linearität der Methode zur Bestimmung von Steroiden in Muskelgewebe wurde im Bereich von 50 ng/kg bis 1600 ng/kg für die Androgene und 100 ng/kg bis 4300 ng/kg für Pregnenolon und Progesteron überprüft. Es ergaben sich Regressionskoeffizienten von $r > 0,995$ mit Ausnahme von Androstanolon, das einen Regressionskoeffizienten von 0,990 aufwies (HARTMANN & STEINHART, 1997a). Daraus ergibt sich eine Linearität im Konzentrationsbereich ab 200 ng/kg für die Androgene und 400 ng/kg für Pregnenolon und Progesteron, da sich die Einwaage von Fett- und Muskelgewebe um den Faktor 4 unterscheidet. Die Umrechnung der eingesetzten Standardkonzentrationen in ng/kg-Gehalte findet sich in Anhang 9.2.6.2.

Da in Fettgewebe höhere Steroidkonzentrationen erwartet wurden, sollte überprüft werden, ob eine Linearität auch noch bei höheren Konzentrationen gegeben ist. Aus diesem Grund wurden Kalibriergeraden für beide Massen der eingesetzten Steroide aufgenommen. Es wurden Standardlösungen mit den in Anhang 9.2.6.2 angegebenen Konzentrationen und Volumina eingesetzt, wobei für P 4 und P 5 160 μ l und 320 μ l der Kalibrierlösung eingesetzt wurden (siehe Anhang 9.2.6.1).

Tabelle 8 – Kalibrierung für die Messung der Steroide im Fettgewebe

Steroid	P1 [ng/kg]	P2 [ng/kg]	P3 [ng/kg]	P4 [ng/kg]	P5 [ng/kg]	1. Masse r	2. Masse r
cis-Androsteron	1176	2352	4704	9408	14700	0,998	0,997
DHEA	540	1080	2160	4320	6750	0,999	0,999
Epitestosteron	420	840	1680	3360	5250	0,995	0,998
Androstanolon	666	1332	2664	5328	8325	0,999	0,999
Androstendion	594	1188	2376	4752	7425	0,999	0,998
Testosteron	552	1104	2208	4416	6900	0,999	0,999
Pregnenolon	5342	10684	21368	42736	66775	0,996	0,998
Progesteron	4582	9164	18328	36656	57275	0,997	0,998

r = Korrelationskoeffizient

Die für die einzelnen Steroide ausgewählten Massen finden sich in Anhang 9.5. In **Tabelle 8** sind die Standardgehalte der einzelnen Meßpunkte P1 bis P5 sowie die Regressionskoeffizienten für die beiden Massen des jeweiligen Steroids angegeben.

Eine Linearität ist für die Steroidmessung auch in diesen Konzentrationsbereichen gegeben. Dies ist sogar bei den sehr stark erhöhten Gehalten für Pregnenolon und Progesteron der Fall. Einen Regressionskoeffizienten $r < 0,995$ wies keines der untersuchten Steroide auf.

6.3.5.2 Bestimmung von Wiederfindungsraten und Verfahrensvariationskoeffizienten

Um systematische Fehler auszuschließen, wurden die Wiederfindungsraten für die einzelnen Steroide ermittelt. Die Bestimmung der Wiederfindungsraten erfolgte über die Analyse von sieben dotierten Proben und sieben undotierten Proben. Die Berechnung der Wiederfindungsraten mußte über die Differenz der Steroidgehalte zwischen dotierten und undotierten Proben erfolgen, da kein tierisches Fett existiert, das frei von Steroiden ist. Es wurden 80 g Fettgewebe homogenisiert, siebenmal je 10 g eingewogen und extrahiert. Die Extrakte wurden anschließend geteilt und jeweils ein Teil dotiert. Dabei wurden alle

Tabelle 9 – Durchschnittliche Wiederfindungsraten

Steroid	Wiederfindungsrate [%]
cis-Androsteron	56
DHEA	59
Epitestosteron	44
Androstanolon	59
Androstendion	91
Testosteron	44
Pregnenolon	36
Progesteron	85

dotierten Proben mit demselben Volumen derselben Standardlösung versetzt. Es wurde jeweils die Differenz der zusammengehörenden dotierten und undotierten Probe gebildet.

Die ermittelten mittleren Wiederfindungsraten aus den Analysen der dotierten und undotierten Proben sind in **Tabelle 9** angegeben.

Die Gehalte der Dotierung, die Gehalte der einzelnen Probenpaare ebenso wie die Berechnung der Wiederfindungsraten sind in Anhang 9.3 angegeben.

Die Präzision der Messung wird durch die Variationskoeffizienten der dotierten und undotierten Proben charakterisiert. In **Tabelle 10** sind die bestimmten mittleren Gehalte der dotierten und undotierten Proben sowie ihre Standardabweichungen und Variationskoeffizienten angegeben.

Tabelle 10 – Mittelwerte der dotierten und undotierten Proben sowie Standardabweichungen und Variationskoeffizienten

Steroid	n	MW [ng/kg]	s [ng/kg]	CV [%]	MW [ng/kg]	s [ng/kg]	CV [%]
		undotierte Proben			dotierte Proben		
cis-Androsteron	7	754	471	62,4	2062	186	9,0
DHEA	7	727	247	34,0	1378	127	9,2
Epitestosteron	7	337	89	26,5	703	46	6,5
Androstanolon	7	504	251	49,8	1293	406	31,4
Androstendion	7	1259	464	36,9	2345	339	14,5
Testosteron	7	356	162	45,5	841	268	31,9
Pregnenolon	7	7906	892	11,3	11777	765	6,5
Progesteron	7	44862	9026	20,1	52653	5494	10,4

CV = Variationskoeffizient
 MW = Mittelwert
 s = Standardabweichung

Die Variationskoeffizienten für die undotierten Proben lagen wesentlich höher als die der dotierten Proben. Besonders hoch fielen diese für cis-Androsteron, Androstanolon und Testosteron aus. Die Ursache für die stärkeren Schwankungen zwischen den undotierten Proben konnte nicht abschließend geklärt werden. Möglich ist, daß die geringeren Gehalte in den undotierten Proben für diese Schwankungen verantwortlich waren. Durch gleich starke Interferenzen von Störsubstanzen waren die Peaks der Analyten bei größeren Gehalten leichter von der Matrix zu differenzieren als bei geringeren Gehalten. Die CEC fordert Verfahrensvariationskoeffizienten unter 45 % bei Steroidgehalten unter 1 µg/kg und für Steroidgehalte zwischen 1 und 10 µg/kg Verfahrensvariationskoeffizienten unter 32 % (93/256/EEC).

Die Variationskoeffizienten von DHEA, Epitestosteron, Pregnenolon und Progesteron entsprachen diesen Anforderungen sowohl bei den dotierten als auch bei den undotierten Proben. cis-Androsteron, Androstanolon und Testosteron entsprachen den Anforderungen für Steroidgehalte unter 1 µg/kg nicht, wobei die Variationskoeffizienten für Androstanolon und Testosteron mit 49,8 % und 45,5 % nur knapp über den geforderten 45 % liegen. Im Bereich von 1 bis 10 µg/kg entsprechen sowohl cis-Androsteron als auch Androstanolon und Testosteron den Anforderungen.

Da es sich bei diesen Untersuchungen um erste Analysen von Fettgewebe handelt und anhand einzelner Steroidgehalte keine Aussagen über die Behandlung eines Tieres getroffen werden sollen, wird diese Methode trotz auftretender Schwankungen in dieser Form eingesetzt

6.3.5.3 Grenze des praktischen Arbeitsbereichs

Da die untersuchten Steroide natürlich in Rinderfettgewebe vorkommen, ist eine Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nicht möglich. Es existiert kein Fettgewebe, das frei von Steroiden ist, so daß keine Blindproben zur Verfügung stehen. Ersatzweise wird die „Grenze des praktischen Arbeitsbereiches“ (GdpA) angegeben (HARTWIG, 1993). Die GdpA gibt an, bis zu welcher Konzentration die betreffende Substanz erfahrungsgemäß mit ausreichender analytischer Sicherheit identifiziert und quantifiziert werden kann. Bei der Abschätzung der GdpA wird von folgenden Kriterien ausgegangen:

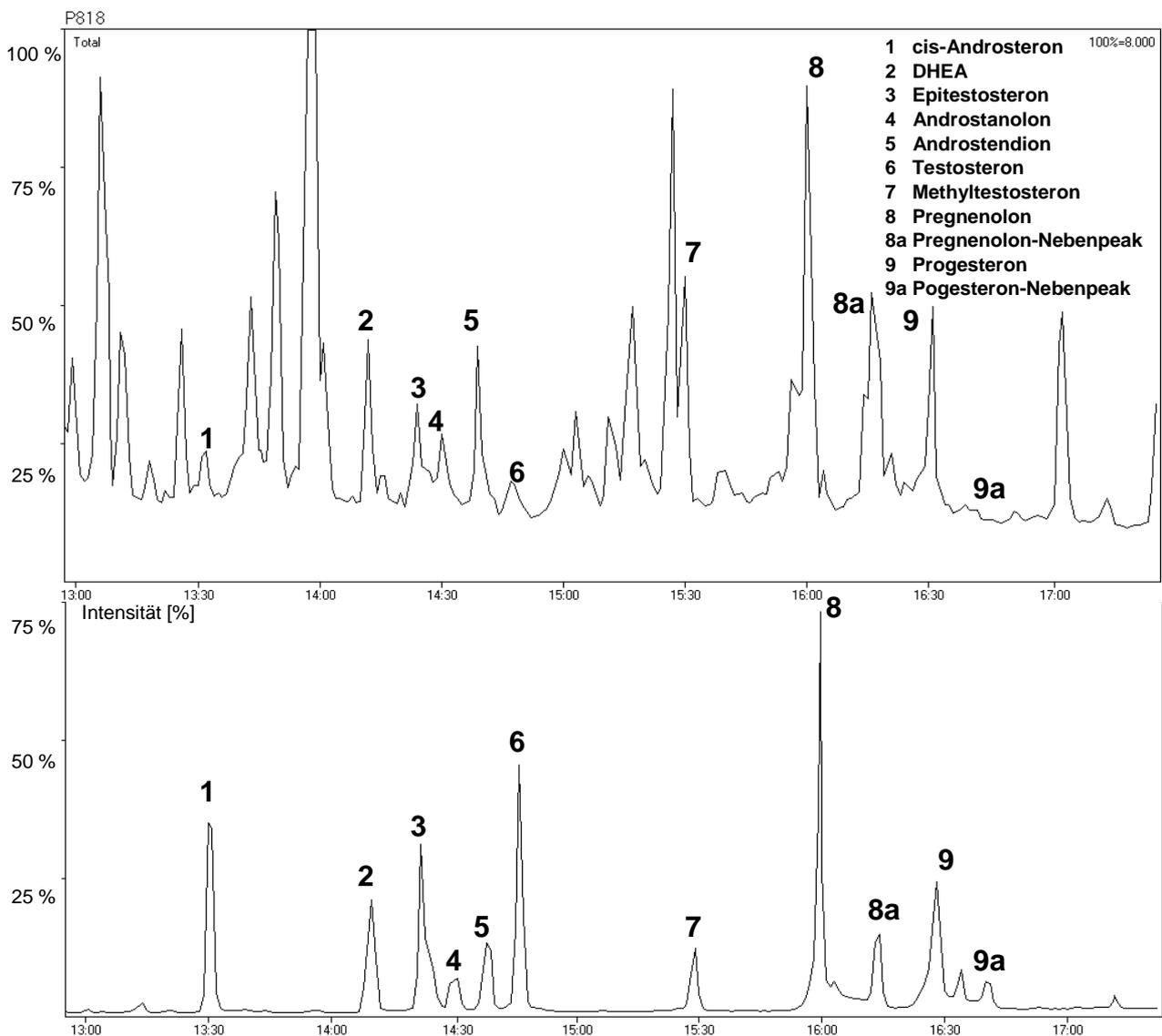


Abbildung 9 – SIM-Chromatogramm einer Fettprobe (oben) und eines Steroid-Standards (unten)

- Die Identifizierung und Quantifizierung wurde über möglichst zwei verschiedene Massenfragmente des Steroids ausgeführt.
- Die über diese Fragmentationen erzielten Ergebnisse weichen vom Mittelwert nicht mehr als 10 % ab.
- Die Signale der einzelnen Fragmentationen sind dabei 3 x höher als die Intensität des mittleren Grundrauschens der Ionenspur.

Die Grenze des praktischen Arbeitsbereiches lag für alle Steroide in Fettgewebe bei 100 ng/kg.

Die Abbildung eines Probenchromatogramms im Vergleich zu einem Steroid-Standard ist in **Abbildung 9** zu sehen. Eine Differenzierung der Peaks der Analyten von denen der Matrixbestandteile ist möglich.

6.3.6 Nachweis von Steroidfettsäureestern in Fettgewebe

Zum Nachweis von Steroidfettsäureestern in Fettgewebe wurde die in Kapitel 6.3.4 beschriebene Methode angewendet. Die Reinigung der durch Umesterung veränderten Matrix gestaltete sich schwierig. Die veränderte Matrix verhielt sich deutlich anders als der

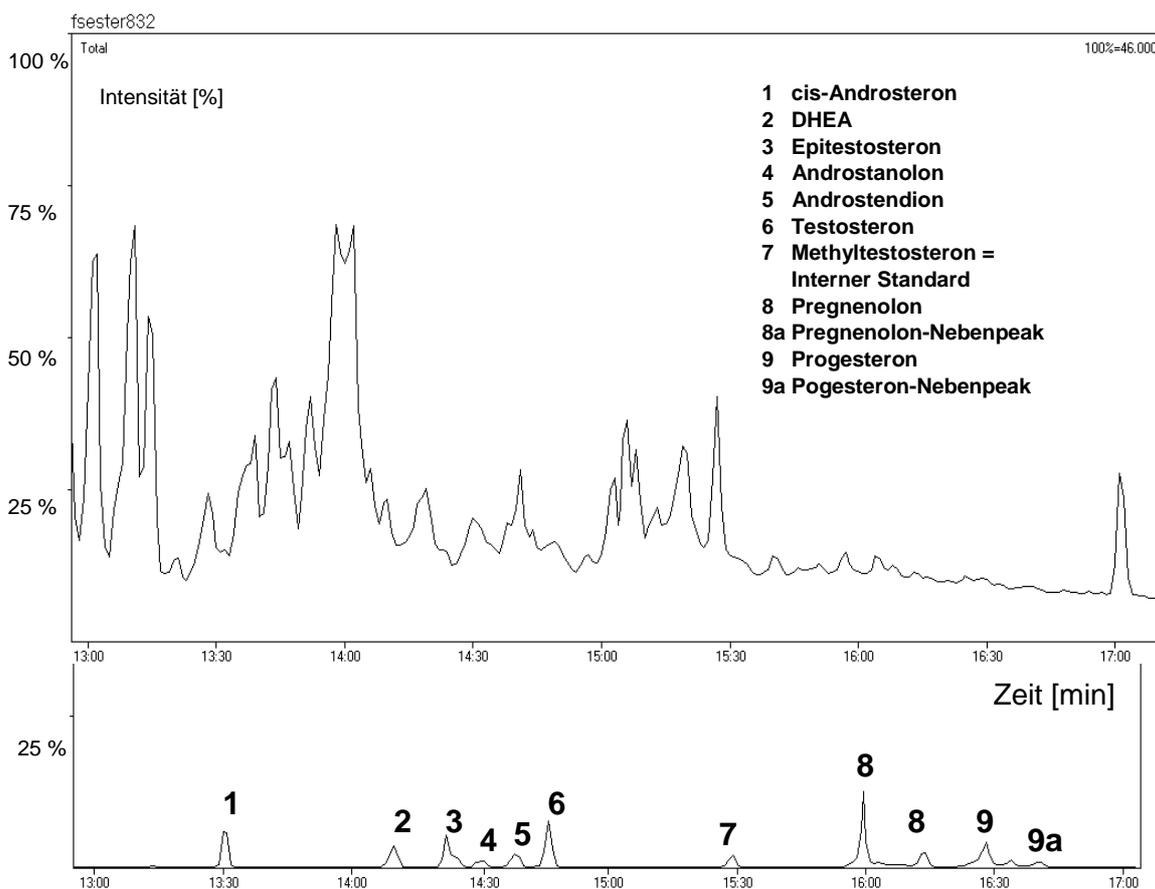


Abbildung 10 – SIM-Chromatogramm eines umgeesterten Eluats der Kieselsäule im Vergleich zu einem Standard-Chromatogramm

unveränderten Fettextrakt. Die aus den Triglyceriden entstandenen Fettsäuremethylester

waren wesentlich polarer. Dies erschwerte eine Abtrennung der veränderten Matrix. Aus diesem Grund erwies sich eine Identifizierung von Steroiden in den Proben als schwierig. Zwar traten Substanzen mit den für die Analyten charakteristischen Massen zu den erwarteten Retentionszeiten auf, aber die über die Fragmentationen eines Steroids erzielten Ergebnisse wichen weit mehr als 10 % vom Mittelwert ab. Aus diesem Grund war kein Steroid in dem umgeesterten Extrakt eindeutig nachweisbar. Weitere Versuche zur Reinigung des Extraktes mit unterschiedlichen Extraktionsverfahren brachten keine Verbesserung. In **Abbildung 10** sind zwei SIM-Chromatogramme dargestellt. Das eine zeigt einen Steroid-Standard, das andere eine umgeesterte Probe. Deutlich kann man die Verunreinigungen im Proben-Chromatogramm erkennen.

Da die Abtrennung der Matrix nach Umesterung nicht ausreichend gelang, wurde als alternatives Verfahren zur Freisetzung der Steroidfettsäureester die Verseifung eingesetzt, um andere Möglichkeiten der Matrixabtrennung zu erproben. Eine Verseifung der Probe mit anschließendem Fällen der Seifen mit Calciumchlorid gelang allerdings ebenso wenig wie eine Abtrennung durch Ausfrieren der Matrix, so daß auch hier keine weiterführenden Ergebnisse erzielt werden konnten.

7 Untersuchung des Tierversuchs – Ergebnisse und Diskussion

Die aus Muskelgewebe und Fettgewebe bestehenden Proben wurden auf ihre Steroidhormonmuster untersucht. Es wurden polare und unpolare Extrakte des Muskelgewebes hergestellt und deren Steroidhormonmuster ermittelt. Weiterhin wurden die Steroidhormonmuster des Fettgewebes bestimmt. Des weiteren wurde der Fettgehalt der Muskelproben bestimmt.

7.1 Muskelgewebe

7.1.1 Muskelgewebe – Fettgehalt

Die Fettgehalte der Muskelgewebe wurden wie unter 4.3 beschrieben ermittelt. In der **Tabelle 11** sind sowohl die Fettgehalte der Muskelgewebe der einzelnen Tiere als auch die aus diesen ermittelten Mediane der behandelten und der unbehandelten Ochsen der einzelnen Schlachtgruppen angegeben.

Tabelle 11 – Fettgehalte der Muskelgewebe der Ochsen

Ochsen der Schlachtgruppe 1 unbehandelt	Fettgehalt [g/100g]	Ochsen der Schlachtgruppe 1 behandelt	Fettgehalt [g/100g]
833	0,8	818	1,8
834	2,2	828	1,1
866	1,6	831	1,9
867	3,0	839	1,7
Median	1,9	Median	1,8
Ochsen der Schlachtgruppe 2 unbehandelt	Fettgehalt [g/100g]	Ochsen der Schlachtgruppe 2 behandelt	Fettgehalt [g/100g]
815	1,4	821	3,8
826	1,7	823	3,2
842	2,3	875	2,9
882	3,3	880	8,5
Median	2,0	Median	3,2
Ochsen der Schlachtgruppe 3 unbehandelt	Fettgehalt [g/100g]	Ochsen der Schlachtgruppe 3 behandelt	Fettgehalt [g/100g]
822	3,1	816	3,0
825	3,3	817	7,4
863	3,5	864	6,7
879	5,7	873	4,9
Median	3,4	Median	5,8
Ochsen der Schlachtgruppe 4 unbehandelt	Fettgehalt [g/100g]	Ochsen der Schlachtgruppe 4 behandelt	Fettgehalt [g/100g]
832	5,9	819	2,1
837	3,8	862	2,2
846	5,1	874	2,8
869	3,1	878	5,7
Median	4,5	Median	2,6

Innerhalb der Gruppen wiesen einzelne Ochsen einen stark erhöhten Fettgehalt des Muskelgewebes auf, der durch individuelle physiologische Unterschiede in der Fetteinlagerung zu erklären ist. Auch visuell war bei den Proben mit höherem Fettgehalt

eine stärkere Marmorierung des Muskelgewebes erkennbar. Da aus diesem Grund und wegen der geringen Probenanzahl (vier) die abweichenden Werte nicht als Ausreißer angesehen werden (siehe 4.4), wird der Median anstelle des gegen Schwankungen empfindlichen Mittelwertes angegeben.

Die Fettgehalte der untersuchten Proben lagen zwischen 0,8 und 8,5 %. Für Ochsen der Rasse Deutsches Fleckvieh wurden bei Gewichten zwischen 200 und 650 kg Fettgehalte des MLD von 1,0 bis 8,2 % angegeben (OTTO et al., 1993). Dieses entspricht den ermittelten Fettgehalten des MLD der untersuchten Ochsen der Rasse Charolais. Auch die Angaben von SWEETEN et al. (1990) für Fettgehalte des MLD von Ochsen im Alter von 12 bis zu 20 Monaten mit 1,9 bis 6,2 % liegen im Rahmen der ermittelten Fettgehalte. Die Rasse der von SWEETEN et al. (1990) untersuchten Ochsen wird nicht genannt.

Betrachtet man die medianen Fettgehalte der einzelnen Gruppen, so fällt auf, daß der Median bei den unbehandelten Ochsen von Schlachtgruppe 1 (SG 1) bis Schlachtgruppe 4 (SG 4) zunahm. Mit zunehmendem Alter erfolgte also eine verstärkte Fetteinlagerung in das Muskelgewebe. Dieser mit dem Alter ansteigende intramuskuläre Fettgehalt geht mit dem ansteigenden Lebendgewicht einher (OTTO et al., 1993). Auch bei den behandelten Ochsen erfolgte ein Anstieg des Fettgehaltes von Schlachtgruppe 1 (SG 1) bis 3 (SG 3). Der Median des intramuskulären Fettgehaltes der behandelten Ochsen der Schlachtgruppe 4 (SG 4) war mit 2,6 % niedriger als der Schlachtgruppe 2 (SG 2) und 3 (SG 3).

In SG 2 und 3 trat ein höherer Fettgehalt bei den mit Synovex-S behandelten Ochsen auf als bei den unbehandelten. MADER et al. (1994) berichteten ebenso wie RUMSEY et al. (1992a) von einer schwächeren Marmorierung des Muskelgewebes Mit Synovex-S behandelter Ochsen. ONO et al. (1996) untersuchten unterschiedliche Muskeln von Rindern, die mit Synovex-S behandelt wurden, und von unbehandelten Rindern hinsichtlich ihres Fettgehaltes. Dabei stellten sie fest, daß einige Muskeln der untersuchten Tiere nach Synovex-S Behandlung einen leicht erhöhten Fettgehalt gegenüber unbehandelten aufwiesen, andere einen geringeren. Erhöht waren die Fettgehalte des *Musculus supraspinatus*, des *Musculus triceps brachii* und des *Musculus rector femoris* der behandelten Ochsen. Niedriger waren die Fettgehalte der behandelten Ochsen im Gegensatz zu den unbehandelten im *Musculus psoas major* und im *Musculus semitendinosus*. HUNTER et al. (2000) untersuchten ebenfalls den *Musculus semitendinosus* und ermittelten bei mit Synovex-S behandelten Ochsen ebenfalls einen geringeren intramuskulären Fettgehalt als bei den unbehandelten Ochsen. Dieser nahm nach Reimplantation sogar prozentual noch weiter ab. Dies läßt sich durch eine stärkere Zunahme des Proteinanteils und schwächere Zunahme des Fettanteils der behandelten Ochsen im Gegensatz zu den unbehandelten Ochsen erklären, wodurch der intramuskuläre Fettanteil prozentual sinkt. So zeigten nach RUMSEY et al. (1992b) mit Synovex-S behandelte Ochsen eine tägliche Zunahme an Protein von 188 g und eine Fettzunahme von 287 g. Unbehandelte Ochsen wiesen eine Proteinzunahme von 139 g und eine Fettzunahme von 313 g auf.

Eine Aussage über die Erhöhung oder Minimierung des intramuskulären Fettgehaltes der untersuchten Muskeln durch die Behandlung läßt sich auf Grund der ermittelten Gehalte nicht treffen. Der Fettgehalt der Muskeln der behandelten Ochsen ist in Schlachtgruppe zwei und drei erhöht. In Schlachtgruppe 1 und 4 sind die Fettgehalte der Muskeln der

unbehandelten Ochsen höher. In allen untersuchten Gruppen traten starke Schwankungen des Fettgehaltes des MLD auf.

7.1.2 Muskelgewebe – polarer Extrakt

Vom MLD jedes Ochsen wurde ein polarer Extrakt erstellt und dessen Steroidhormonmuster mit Hilfe der unter 4.2 beschriebenen Methode ermittelt.

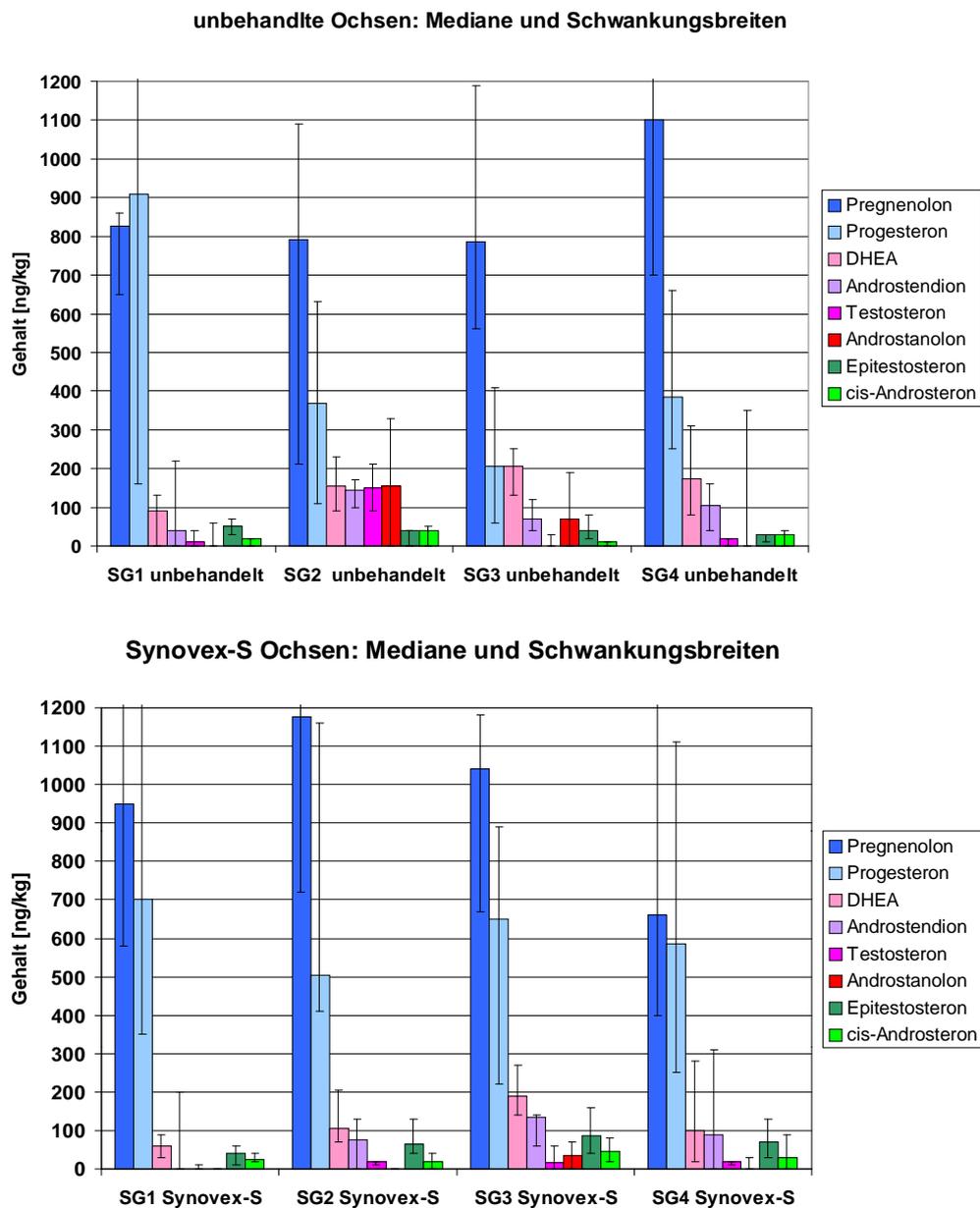


Abbildung 11 – Steroidhormonmuster der polaren Extrakte des Muskelgewebes; oben: unbehandelte Ochsen, unten: Mit Synovex-S behandelte Ochsen

Ermittelt wurden sowohl die Gehalte der Androgene und Gestagene als auch der Corticoidhormone Cortison und Cortisol. Die Angabe der Gehalte erfolgt in ng/kg. Die Steroidgehalte der polaren Extrakte der MLD der einzelnen Tiere sind im Anhang 9.12.2 angegeben. Zur Charakterisierung der vier behandelten und der vier unbehandelten Ochsen einer Schlachtgruppe wird jeweils der Median angegeben. Diese Mediane finden sich ebenfalls in Anhang 9.12.2.

Abbildung 11 zeigt die Steroidhormonmuster der Androgene und Gestagene im Muskelgewebe der behandelten und unbehandelten Ochsen. Dargestellt sind im oberen Diagramm jeweils die medianen Steroidgehalte der unbehandelten Ochsen der Schlachtgruppen 1 bis 4 als Säulen sowie die Schwankungsbreite der einzelnen Steroide innerhalb der Gruppe als Linie. Der höchste ermittelte Wert für Progesteron in SG 1 sowie der höchste in der Gruppe ermittelte Wert für Pregnenolon der SG 4 der unbehandelten Ochsen liegen in dieser Darstellung außerhalb der gewählten Skalierung. Diese wurde so gewählt, damit die Androgene, deren Vorstufen und Metaboliten trotz ihrer geringeren Gehalten als Pregnenolon und Progesteron zu erkennen sind. Die nicht mehr angegebenen oberen Gehalte der Schwankungsbreiten für Pregnenolon und Progesteron liegen bei etwa 5000 ng/kg. Im unteren Diagramm sind die Mediane der Steroidgehalte der einzelnen Schlachtgruppen mit Schwankungsbreiten für die mit Synovex-S behandelten Ochsen dargestellt. Wiederum liegen für Pregnenolon in SG 1, SG 2 und SG 4 und für Progesteron in SG 1 die höchsten ermittelten Gehalte außerhalb der Skalierung.

Die Steroide sind in den Diagrammen in ihrer biosynthetischen Reihenfolge angegeben. Pregnenolon als Vorstufe ist, von links nach rechts betrachtet, als erstes Steroid dargestellt. Darauf folgt das Gestagen Progesteron, das ebenfalls eine Vorstufe für die weitere Steroidsynthese ist. Es schließen sich DHEA und Androstendion als androgene Vorstufen an. Anschließend sind die Wirkformen Testosteron und Androstanolon und darauf folgend die Metaboliten Epitestosteron und cis-Androsteron dargestellt.

Beim Vergleich der Diagramme ist deutlich zu erkennen, daß kaum Unterschiede zwischen den Steroidmustern der behandelten und unbehandelten Ochsen in den einzelnen Schlachtgruppen bestehen. Weiterhin ist auffällig, daß sehr große Schwankungsbreiten bei einzelnen Steroiden innerhalb einer Schlachtgruppe auftreten.

Pregnenolon und Progesteron wiesen höhere Gehalte im Muskelgewebe auf als die Androgene. So lag Pregnenolon in allen Schlachtgruppen sowohl bei den behandelten als auch bei den unbehandelten Tieren mit mehr als 200 ng/kg Muskelgewebe vor. 97 % der ermittelten Gehalte lagen sogar über 400 ng/kg. Progesteron zeigte nur bei den behandelten Ochsen eine stärkere Erhöhung gegenüber den Androgenen.

Die Pregnenolon- und Progesterongehalte der einzelnen Schlachtgruppen sollen im folgenden gegenübergestellt und verglichen werden. Anschließend folgt eine detaillierte Betrachtung der Androgengehalte und der Corticoidgehalte.

Bei der Diskussion der ermittelten Steroidgehalte im Vergleich zu Literaturwerten muß immer berücksichtigt werden, daß es Hinweise auf eine Abhängigkeit der körpereigenen Steroidproduktion von der Rasse der untersuchten Rinder gibt. Dieser Zusammenhang würde sich auch in den Steroidgehalten der Muskeln widerspiegeln (THOMAS et al., 1992; CROSS et al., 1984).

Pregnenolon und Progesteron

Betrachtet man die Mediane der Pregnenolongehalte der unbehandelten Ochsens und vergleicht sie mit den Medianen der Pregnenolongehalte der behandelten Ochsens der einzelnen Schlachtgruppen, so zeigt sich das in **Abbildung 12** dargestellte Bild.

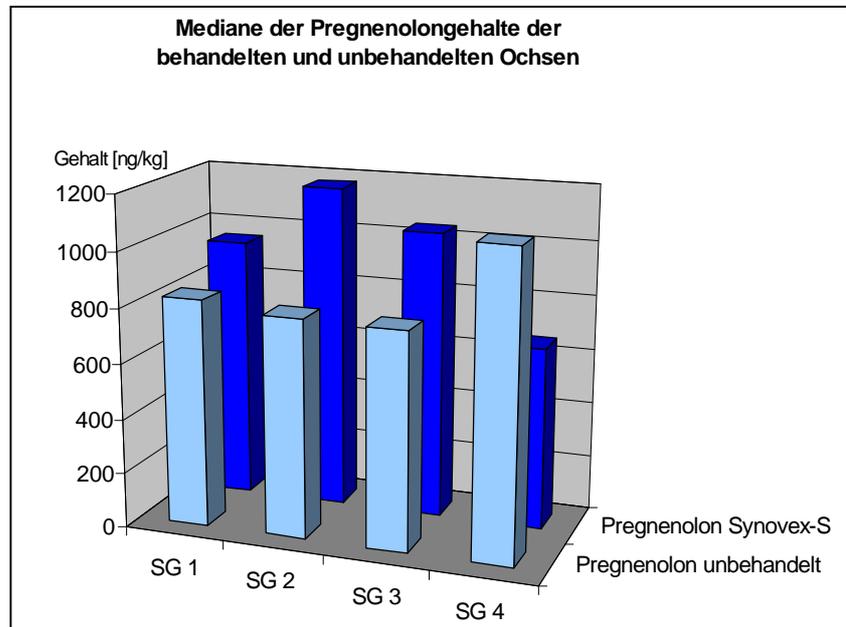


Abbildung 12 – Mediane der Pregnenolongehalte aller Schlachtgruppen – behandelte und unbehandelte Ochsens

Die Mediane der Pregnenolongehalte der mit Synovex-S behandelten Ochsens waren in den SG 1 bis 3 gegenüber denen der unbehandelten Ochsens erhöht. Die ermittelten Gehalte lagen für die unbehandelten Ochsens zwischen 210 und 1610 ng/kg. Die behandelten Ochsens zeigten Gehalte zwischen 400 und 2010 ng/kg. Pregnenolongehalte wurden bisher in Muskelgewebe nur selten ermittelt, da Pregnenolon keine anabole Wirkung aufweist und im Steroidmetabolismus nur als Vorstufe von Bedeutung ist. Von FRITSCHÉ et al. (1999) wurden für Muskelgewebe des MLD von Ochsens der Rasse Angus x Hereford bei einem Schlachtgewicht von etwa 500 kg Pregnenolongehalte von 2271 ± 263 ng/kg für mit Synovex-S behandelte und für unbehandelte Ochsens von 2317 ± 273 ng/kg ermittelt. Dieses Schlachtgewicht entspricht dem der hier untersuchten behandelten Ochsens der SG 2 und den unbehandelten Ochsens der SG 3. Die unbehandelten Ochsens der SG 3 zeigten Pregnenolongehalte zwischen 560 ng/kg und 1190 ng/kg im MLD, die behandelten Ochsens Gehalte zwischen 720 ng/kg und 2010 ng/kg. Die Pregnenolongehalte der untersuchten Ochsens im Muskelgewebe waren damit etwas geringer als die von FRITSCHÉ et al. (1999) ermittelten. Dies kann auf unterschiedliche Aspekte zurückzuführen sein. So stellten FRITSCHÉ et al. (1998a) eine Altersabhängigkeit des Pregnenolongehaltes im Muskelgewebe von Ochsens fest. Der Pregnenolongehalt nahm mit dem Alter der Ochsens zu. Die untersuchten Ochsens der Rasse Charolais können trotz des vergleichbaren Schlachtgewichtes jünger als die von FRITSCHÉ et al. (1999) untersuchten Ochsens der Rasse Angus x Hereford sein, da die Gewichtszunahme mit dem Alter stark von der Rasse der Rinder abhängig ist. Von

FRITSCHÉ et al. (1999) wurde nur das Schlachtgewicht und nicht das Alter der Ochsen angegeben. Für Ochsen der Rasse Simmental im Alter von 372 ± 14 Tagen gaben FRITSCHÉ et al. (1998a) einen Pregnenolongehalt im Muskelgewebe von 450 ± 110 ng/kg an. Dies entspricht in etwa dem Alter der untersuchten Ochsen der SG 2 mit einem Alter von etwa 365 Tagen. Diese Ochsen wiesen Pregnenolongehalte zwischen 210 und 1090 ng/kg auf.

Eine andere Untersuchung von FRITSCHÉ & STEINHART (1998) ergab einen Pregnenolongehalt von 1240 ng/kg in Muskelgewebe von Ochsen der Rasse Hereford und Hereford x Angus bei einem Schlachtgewicht zwischen 450 kg und 650 kg. Dies entspricht etwa den hier ermittelten Gehalten für unbehandelte und behandelte Ochsen der SG 2 bis 4.

Während sich die Mediane der Pregnenolongehalte der unbehandelten Ochsen von SG 1 bis SG 3 glichen, war von SG 3 zu SG 4 ein Anstieg um 300 ng/kg zu verzeichnen. Dieser Anstieg kann auf eine schon erwähnte Zunahme des Pregnenolongehaltes mit dem Alter (FRITSCHÉ et al., 1998a) oder auf starke individuelle Erhöhungen der Pregnenolongehalte der Muskeln einzelner Tiere zurückzuführen sein.

Der Median der Pregnenolongehalte der behandelten Ochsen der SG 1 war gegenüber dem der unbehandelten Tiere erhöht. Von SG 1 zu SG 2 war ein Anstieg des Pregnenolon-Medians der behandelten Ochsen zu erkennen, wohingegen von SG 2 zu SG 3 eine leichte Abnahme zu verzeichnen war. Die Erhöhung der Pregnenolongehalte der behandelten Ochsen der ersten drei Schlachtgruppen gegenüber den Gehalten der unbehandelten Ochsen kann nicht direkt auf die Verabreichung des Synovex-S Implantates zurückgeführt werden, da es sich bei Pregnenolon um eine Vorstufe der verabreichten Steroide Progesteron und 17β -Estradiol handelt. Eine Metabolisierung der verabreichten Steroide zu Pregnenolon erscheint unwahrscheinlich, weil eine Bildung von Pregnenolon aus Progesteron nicht bekannt ist. Bei der Bildung von Progesteron aus Pregnenolon handelt es sich um eine enzymatische Reaktion, an der zum einen die 3β -Hydroxy- Δ^5 -steroid-Dehydrogenase (EC 1.1.1.145) und zum anderen die Steroid- Δ -Isomerase (EC 5.3.3.1) beteiligt ist.

Bei verstärktem Auftreten einer Vorstufe bei Verabreichung der Wirkform könnte ein Rückkopplungseffekt vorliegen. Dies bedeutet, daß durch Verabreichung der Wirkformen Progesteron und 17β -Estradiol die Bildung der Vorstufen angeregt werden würde. Durch physiologisch erhöhte Steroidgehalte sind vor allem negative Rückkopplungseffekte bekannt, die zum Beispiel die Ausschüttung von FSH und LH unterdrücken (GOTTHARD, 1993). Über eine Anregung der Steroidproduktion durch Steroidgaben ist bislang nichts bekannt. Von SCIPPO et al. (1994) konnte bei der Verabreichung eines Testosteron-Estradiol-Cocktails an Bullen und Färsen nur eine Senkung des Pregnenolongehaltes im Plasma nachgewiesen werden. FRITSCHÉ et al. (1999) stellten bei der Untersuchung von 9 Ochsen, die mit Synovex-S behandelt wurden, keine Erhöhung des Pregnenolongehaltes gegenüber unbehandelten Ochsen fest. Allerdings wurden die von FRITSCHÉ et al. (1999) untersuchten Ochsen nach einer Frist von 80 Tagen nach der Implantation geschlachtet. Die Schlachtung aller Tiere erfolgte im Gegensatz zu dem hier untersuchten Tierversuch alle zum gleichen Zeitpunkt nach der Implantation. Bei den untersuchten behandelten Ochsen, bei denen ein erhöhter Pregnenolongehalt festgestellt wurde, waren nur 42 Tage zwischen Implantation und Schlachtung vergangen, so daß es möglich ist, daß sich bei den untersuchten Ochsen im Gegensatz zu denen von

FRITSCHKE et al. (1999) der physiologische Pregnenolonegehalt nach der Behandlung noch nicht wieder eingestellt hat.

Zusätzlich zu dem Synovex-S Implantat wurden die Ochsen mit GHRH und TRH behandelt. Diese veranlassen eine Freisetzung von Growth Hormone sowie eine Freisetzung von Schilddrüsenhormonen. Sowohl Wachstumshormone als auch Schilddrüsenhormone bewirken eine Steigerung des Wachstums über eine verstärkte RNA-Synthese und Proteinsynthese, einen verstärkten Transport von Glucose und Aminosäuren in die Zellen, eine verstärkte Lipolyse sowie eine erhöhte Stoffwechselrate (ECKERT, 1986). Diese Faktoren haben aber keinerlei Einfluß auf die Steroidsynthese, während die Verabreichung von Synovex-S bei Ochsen auch zu einem höheren Plasmaspiegel von Thyroxin führt (LONE, 1997). Die mit Synovex-S behandelten und die unbehandelten Ochsen aller Schlachtgruppen bis auf SG 4 wurden mit GHRH und TRH behandelt, so daß aufgrund der gleichen Behandlung weder Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Ochsen noch die Abnahme des Pregnenolonegehaltes der behandelten Ochsen der SG 4 auf die Verabreichung von GHRH und TRH zurückgeführt werden kann.

Die starke Abnahme des Medians der Pregnenolonegehalte der behandelten Tiere um 400 ng/kg von SG 3 zu SG 4 läßt sich im Falle des Vorliegens eines Rückkopplungseffektes auf die Schlachtung der SG 4 nach Überschreiten der maximalen Wirkzeit des dritten Implantates zurückführen. Während die ersten drei Schlachtgruppen ca. 40 Tage nach der letzten Implantation geschlachtet wurden, wurde diese Frist bei SG 4 um 15 Tage überschritten. Die maximale Wirkung der Implantate zeigt sich nach RUMSEY et al. (1992a) 30 bis 40 Tagen nach der Implantation. Wenn nach Überschreiten dieser Zeit auch die Freisetzung der Steroide aus dem Implantat nachläßt, ist so ebenfalls eine Abnahme des Rückkopplungseffektes vorstellbar, die eine Abnahme des Pregnenolonegehaltes bedingen würde. Allerdings wurde beim Einsatz von Synovex-C, das die Hälfte der Steroidmengen von Synovex-S enthält, bei Ochsenkälbern eine Abnahme des Estradiolspiegels im Serum auf das Niveau der unbehandelten Kälber erst nach 120 Tagen festgestellt, während die hier festgestellte Abnahme bereits nach 55 Tagen auftrat (HANCOCK et al., 1991). Die Erhöhung des Estradiolspiegels des Serums ist aber auf die direkte Freisetzung von Estradiol aus dem Implantat zurückzuführen.

Auch die medianen Progesteronegehalte der mit Synovex-S behandelten Ochsen zeigten eine Erhöhung gegenüber den unbehandelten (**Abbildung 13**). Allerdings trat diese Erhöhung bei SG 2 bis SG 4, nicht aber bei SG 1 auf. In SG 1 zeigten die unbehandelten Ochsen geringfügig höhere Progesteronegehalte als die behandelten. Die Progesteronegehalte der Muskelgewebe der unbehandelten Ochsen lagen zwischen 60 und 4470 ng/kg. Die behandelten Ochsen wiesen Gehalte zwischen 220 und 2720 ng/kg auf.

Progesteronegehalte von Rindergeweben wurden häufig untersucht, da Progesteron Anwendung in Anabolika-Cocktails findet. Betrachtet man die in der Literatur erwähnten Gehalte näher, so stellt man fest, daß widersprüchliche Angaben bezüglich der Erhöhung des Progesteronspiegels im Muskelgewebe bei einer Synovex-S Behandlung gemacht werden.

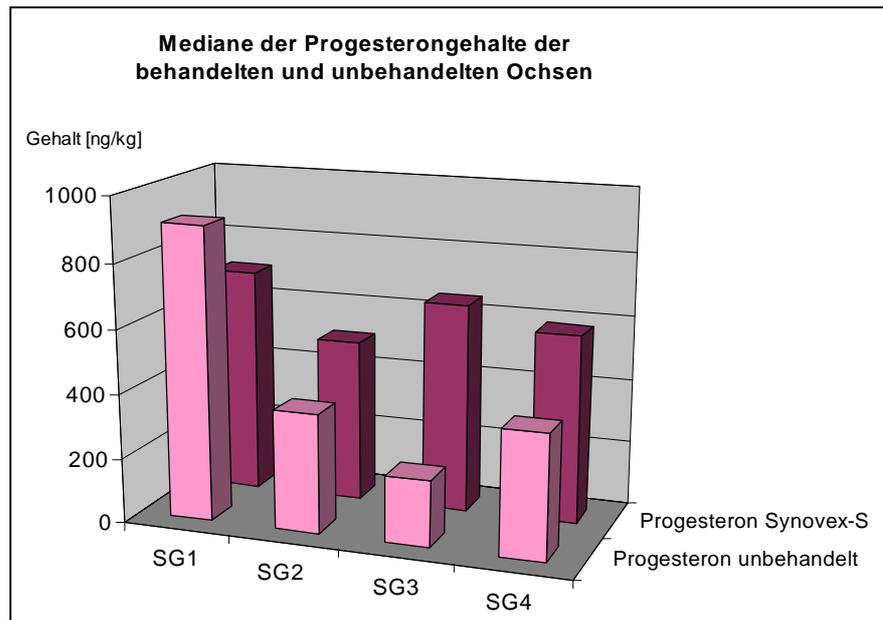


Abbildung 13 – Mediane der Progesterongehalte aller Schlachtgruppen – behandelte und unbehandelte Ochs

FRITSCHÉ & STEINHART (1998) ermittelten bei unbehandelten Ochs der Rasse Simmental und der Kreuzung Hereford x Angus mit einem Schlachtgewicht von 450 bis 650 kg Progesterongehalte zwischen 10 und 2330 ng/kg im Muskelgewebe. In einer anderen Studie von FRITSCHÉ et al. (1999) werden für Ochs der Rasse Angus x Hereford Progesterongehalte von 1211 ± 251 ng/kg angegeben.

Für mit Synovex-S behandelte Ochs hingegen werden 811 ± 135 ng/kg angegeben. Damit wiesen die behandelten und unbehandelten Ochs vergleichbare Progesterongehalte im Muskelgewebe auf mit einer Tendenz zu geringeren Gehalten bei behandelten Ochs. Das Schlachtgewicht der Ochs von etwa 500 kg entspricht dem der hier untersuchten SG 2 (behandelte Ochs) und 3 (unbehandelte Ochs) (Schlachtgewichte siehe Anhang 9.1). Die von FRITSCHÉ et al. (1999) untersuchten Ochs erhielten 160 und 80 Tage vor der Schlachtung ein Synovex-S Implantat. Die Schlachtung der Ochs des jetzt untersuchten Tierversuchs erfolgte etwa 40 Tage nach der Implantation. Aus diesem Grund ist es möglich, daß bei den von FRITSCHÉ et al. (1999) untersuchten Ochs eventuell eine Erhöhung des Progesterongehaltes im Muskelgewebe nach 40 Tagen vorlag, diese Gehalte aber 80 Tage nach der Implantation aufgrund der schwächer werdenden Progesteronfreisetzung aus dem Implantat zurückgegangen waren.

LONE (1997) zeigte anhand von Literaturdaten, daß die Progesterongehalte der Muskelgewebe von mit Synovex-S behandelten Ochs eines Behandlungsversuchs kaum von denen unbehalteter Ochs abwichen. Die Progesterongehalte der behandelten Ochs lagen im Bereich der physiologischen Gehalte, obwohl die Ochs dieses Tierversuchs Implantate im Abstand von 30 Tagen erhielten. Der von LONE (1997) angegebene und von KUSHINSKY (1983) ermittelte Gehalt für die unbehalteten Ochs betrug 270 ± 330 ng/kg. Die Progesterongehalte der behandelten Ochs lagen zwischen

230 ± 530 ng/kg bei einem erhaltenen Implantat und bis zu 580 ± 840 ng/kg bei fünf Implantaten. Damit ist ein leichter Anstieg des Progesterongehaltes im Muskelgewebe zu erkennen. Da laut FRITSCHÉ et al. (1998a) der Progesterongehalt nicht vom Alter der Tiere sondern höchstens vom Fettgehalt des Muskelgewebes abhängig ist, ist der Anstieg entweder auf eine Akkumulation durch das Implantat oder auf eine verstärkte Fetteinlagerung zurückzuführen. Weder über die Anzahl der untersuchten Ochsen noch über deren Rasse und Alter werden von KUSHINSKY (1983) und LONE (1997) Angaben gemacht.

Ein völlig anderes Bild zeigen die von TSUJIOKA & ITO (1992) ermittelten Ergebnisse. Es wurden 30 Ochsen untersucht, die 30 bzw. 60 Tage nach Verabreichung eines Synovex-S Implantates oder ohne Synovex-S Behandlung geschlachtet wurden. Die Kontrolltiere zeigten mit 3890 ± 770 ng/kg einen weitaus höheren Progesterongehalt als die behandelten Tiere, die 30 Tage nach der Implantation 1930 ± 270 ng/kg Progesteron und 60 Tage nach der Implantation 1700 ± 200 ng/kg Progesteron im Muskelgewebe aufwiesen. Diese Gehalte sind sehr viel höher als die von den anderen Autoren beschriebenen. Dies mag auf unterschiedliche Methoden der Extraktion zurückzuführen sein. Während FRITSCHÉ et al. (1998a, 1999) und HARTMANN & STEINHART (1997a) die hier angewendete Methode der polaren Extraktion einsetzten, basieren die von TSUJIOKA & ITO (1992) gemachten Angaben auf einer Diethyletherextraktion aus einem Puffer-Probenhomogenat und anschließendem Radioimmunoassay. Wie schon unter 6.2.4.2 gezeigt ist die Extraktion mit unpolaren Lösungsmitteln effektiver als die mit polaren. LONE (1997) macht keine Angaben zur angewendeten Methode zur Steroidbestimmung.

Aufgrund der abweichenden Daten ist verständlich, warum SANTARIUS und RAPP (1990) Muskelgewebe als nicht geeignetes Substrat für die Kontrolle eines illegalen Progesteron-Einsatzes in der Rindermast ansahen. Die COMMISSION OF EUROPEAN COMMUNITIES (1989) gibt einen Progesterongehalt für das Muskelgewebe von Rindern an, der für die Differenzierung zwischen behandelten und unbehandelten Rindern eingesetzt werden soll. Da bei der Kontrolle des Produktes Fleisch dessen geschlechtliche Herkunft selten bekannt ist, sollte von den höchsten, natürlich im Muskelgewebe vorkommenden Gehalten ausgegangen werden. Diese liegen im Muskelgewebe trächtiger Kühe vor (HOFFMANN, 1978). Unter Einbeziehung einer Sicherheitsspanne sind laut COMMISSION OF EUROPEAN COMMUNITIES (1989) Rinder, die höhere Progesterongehalte von mehr als 32000 ng/kg im Muskelgewebe aufweisen, als mit Progesteron behandelt anzusehen. Dieser Wert auf Basis der Progesterongehalte im Muskelgewebe trächtiger Kühe muß allerdings in Zusammenhang mit der Tatsache betrachtet werden, daß trächtige Kühe sehr selten geschlachtet werden, die Verwendung von deren Fleisch als Lebensmittel aber zulässig ist. Auch TSUJIOKA & ITO (1992) ermittelte im Muskelgewebe von Kühen abhängig vom Zyklus Gehalte zwischen 22730 ± 4670 ng/kg und 3780 ± 1000 ng/kg. Aufgrund dieser Werte für die Differenzierung von behandelten und unbehandelten Rindern wäre keiner der untersuchten behandelten Ochsen und keiner der von den anderen Autoren untersuchten behandelten Ochsen als solcher erkannt worden. Dies macht andererseits deutlich, daß die bei den behandelten Ochsen im Muskelgewebe auftretenden Gehalte keineswegs besorgniserregend sind, da höhere Progesterongehalte als bei den behandelten Ochsen ermittelten natürlich vorkommen.

Ebenso wie bei Pregnenolon wird deutlich, daß die alleinige Bestimmung von Progesteron in Muskelgewebe kein Kriterium sein kann, um behandelte und unbehandelte Rinder zu unterscheiden.

Androgene, deren Vorstufen und Metabolite

In **Abbildung 14** sind die Mediane der Gehalte der Androgene, ihrer Vorstufen und Metaboliten im Muskelgewebe sowie die Schwankungsbreiten der einzelnen Steroide in der jeweiligen Schlachtgruppe dargestellt. Das obere Diagramm zeigt die Mediane der Gehalte des MLD der unbehandelten, das untere Diagramm die der behandelten Ochsen.

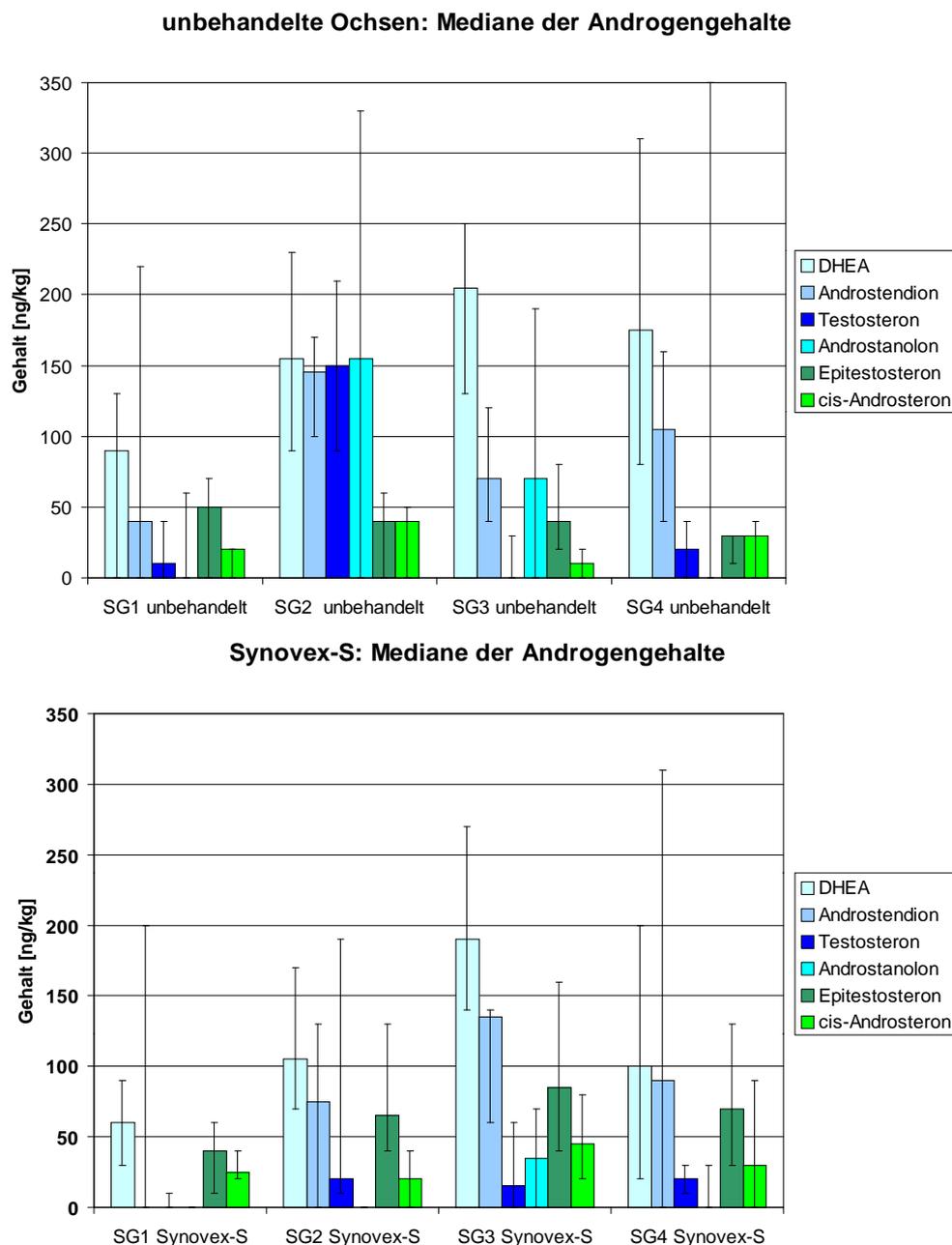


Abbildung 14 – Mediane der Androgengehalte – behandelte und unbehandelte Ochsen

Die Androgene verhielten sich nicht wie die Vorstufen Pregnenolon und Progesteron, deren Mediane eine Erhöhung im Muskelgewebe der behandelten Ochsen gegenüber dem Muskelgewebe der unbehandelten Ochsen in den meisten Schlachtgruppen zeigten. Ein verstärktes Vorliegen von Androgenen war bei den behandelten Ochsen nicht zu beobachten.

Progesteron stellt in der Steroidbiosynthese eine Vorstufe der Androgene dar. Die Steroidbiosynthese findet aber zum größten Teil in bestimmten Organen wie der Nebennierenrinde und bei männlichen Individuen den Testes statt. Diese Organe sezernieren Steroide. Diese werden über das Blut in die Zielgewebe transportiert. Wäre eine Umwandlung der Steroide im Gewebe möglich, so könnte aus dem Implantat freigesetztes Progesteron als Vorstufe für die Androgensynthese dienen und damit eine Erhöhung des Androgenspiegels im Muskelgewebe bewirken.

Da Progesteron selbst nicht anabol wirkt, wäre diese Metabolisierung zu Androgenen eine weitere Erklärung für die anabole Wirkung von Präparaten aus Estrogenen in Kombination mit Gestagenen. Der Mechanismus der Gestagenwirkung ist noch sehr unzureichend geklärt. Anscheinend können Gestagene aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit den Androgenen mit Androgenrezeptoren reagieren (LONE, 1997). Über eine Umwandlung von Progesteron im Blut oder den Zielgeweben in Androgene ist nichts bekannt. Allerdings findet bei einigen Steroiden eine Umwandlung in den Zellen der Zielgewebe statt. Testosteron wird in Androstanolon umgewandelt und Androstendion zu Estrogenen aromatisiert (INOUE et al., 1990; SNOW, 1993).

In SG 2 der unbehandelten Ochsen waren höhere Mediane von Androstendion, Testosteron und Androstanolon als in den anderen Schlachtgruppen zu vermerken. Allerdings traten bei allen Gruppen starke Schwankungen der Gehalte im MLD der einzelnen Ochsen auf, so daß diese Erhöhung auf individuell starke Steroidproduktionen der Ochsen der SG 2 zurückzuführen sein kann.

In allen Schlachtgruppen sowohl der behandelten als auch der unbehandelten Ochsen war DHEA das dominierende Steroidhormon. Es wies Gehalte zwischen 20 und 270 ng/kg bei den behandelten und <20 bis 310 ng/kg bei den unbehandelten Ochsen auf. Die geringen Androgengehalte der untersuchten MLD aller Ochsen sind auf deren physiologische Bedingungen zurückzuführen. Die Androgenproduktion, die hauptsächlich in den Hoden abläuft, findet bei Kastraten nur in der Nebennierenrinde statt. Diese produziert bei beiden Geschlechtern Corticoide, Androgene und in sehr geringen Mengen Estrogene (THIELE, 1979). DHEA ist das am stärksten sezernierte steroidale Produkt der Nebennierenrinde (EBELING & KOIVISTO, 1994). Sowohl bei den behandelten als auch bei den unbehandelten Ochsen war das gleiche Verhalten des Medians der DHEA-Gehalte mit der Zunahme des Alters und des Schlachtgewichtes zu erkennen. Bei den behandelten und bei den unbehandelten Ochsen erfolgt eine Zunahme des Medians der DHEA-Gehalte bis zur SG 3 und anschließend eine leichte Abnahme. Von FRITSCHE et al. (1998a) wurde keine Abhängigkeit des DHEA-Gehaltes von Alter oder Schlachtgewicht bei Bullen und Ochsen im untersuchten Alter von 179 Tagen bis zu 676 Tagen bzw. einem Schlachtgewicht von 200 kg bis 650 kg festgestellt. Bei Menschen wurde eine Altersabhängigkeit der DHEA-Sulfat Konzentration ermittelt. Dabei steigt die Konzentration von DHEA-Sulfat im Serum bis zu einem Alter von 25 Jahren an und nimmt dann wieder ab (REGELSON et al., 1994). Der bei den Ochsen beobachtete Anstieg

erfolgt bis zu einem Alter der Ochsen von 12 Monaten und einem mittleren Schlachtgewicht von 565 kg der behandelten und 507 kg der unbehandelten Ochsen.

Auch FRITSCHKE et al. (1999) konnten keine Unterschiede im DHEA-Gehalt des Muskels zwischen Synovex-S behandelten und unbehandelten Ochsen feststellen. Die Muskeln der behandelten Ochsen wiesen einen DHEA-Gehalt von 232 ± 26 ng/kg auf, die unbehandelten einen Gehalt von 248 ± 41 ng/kg. Auch bei der hier durchgeführten Untersuchung konnten keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Ochsen festgestellt werden, obwohl eine größere Anzahl von Ochsen untersucht wurde. Diese erhielten im Falle der SG 3 im Gegensatz zu den von FRITSCHKE et al. (1999) untersuchten Ochsen ein Synovex-S-Implantat mehr. Die von FRITSCHKE et al. (1999) untersuchten Ochsen wurden erst 80 Tage nach Erhalt des letzten Implantates geschlachtet, während bei dieser Untersuchung zwischen Implantation und Schlachtung bei SG 1 bis SG 3 nur 42 Tage lagen.

Die anderen untersuchten Steroide zeigten bei den behandelten Ochsen ein ähnliches Verhalten mit dem Alter. Eine Zunahme der Mediane der Gehalte im Muskelgewebe erfolgte ebenso bis zu SG 3 bei Androstendion, dem direkten Folgeprodukt von DHEA in der Steroidbiosynthese. Es ist nach DHEA das am stärksten von der Nebennierenrinde gebildete Androgen. Ebenso stiegen die Mediane der Metaboliten Epitestosteron und cis-Androsteron bis zu SG 3 an. Testosteron und Androstanolon waren nur in sehr geringen Mengen vertreten. Ein Anstieg war nicht zu beobachten.

Das Bild, das sich bei der Betrachtung der Mediane der Androgengehalte der unbehandelten Ochsen zeigt, ist weniger einheitlich. In SG 2 waren sehr hohe Gehalte von Androstendion, Testosteron und Androstanolon zu verzeichnen, die nur durch eine starke individuelle Steroidproduktion einiger Tiere dieser Gruppe zu erklären sind. cis-Androsteron und Epitestosteron zeigten keine Tendenz zu erhöhten Gehalten in einer der Schlachtgruppen.

Die ermittelten Gehalte der Androgene liegen im Rahmen der von FRITSCHKE et al. (1999) ermittelten Gehalte für mit Synovex-S behandelte und unbehandelte Ochsen, obwohl es sich um Ochsen anderer Rassen (Angus x Hereford / Charolais) handelt und die Schlachtung statt nach 80 Tagen 42 Tage nach der Implantation erfolgte. Allerdings war das dominierende Androgen bei den Untersuchungen von Fritsche et al. (1999) Androstendion mit mittleren Gehalten von 446 ± 126 ng/kg für unbehandelte und 303 ± 58 ng/kg für behandelte Ochsen bei der Untersuchung von jeweils neun behandelten und neun unbehandelten Ochsen. Die hier ermittelten Gehalte lagen für die unbehandelten Ochsen zwischen <20 und 220 ng/kg und für die behandelten Ochsen zwischen <20 und 310 ng/kg. Die Androstendiongehalte von Rindermuskeln wurden von verschiedenen Autoren ermittelt. Allerdings dienten diese Untersuchungen dem Nachweis einer Behandlung mit Testosteron (SCIPPO et al., 1994). Auch physiologische Gehalte wurden bestimmt (GAIANI & CHIESA, 1986), allerdings nur bei männlichen Tieren und nicht bei Kastraten, so daß diese Gehalte nicht für einen Vergleich herangezogen werden können. Die von FRITSCHKE & STEINHART (1998) ermittelten physiologischen Gehalte von Ochsen lagen trotz unterschiedlicher Rassen der Ochsen und teilweise abweichenden Schlachtgewichten der hier untersuchten Ochsen mit 50 ng/kg bis 920 ng/kg im Rahmen dieser Untersuchungen.

Für Testosteron und Androstanolon, die bei nicht kastrierten Tieren hauptsächlich von den Testes gebildet werden, wurden sowohl bei behandelten als auch bei den unbehandelten Ochs sehr geringe Gehalte bestimmt. Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Ochs waren nicht erkennbar.

Auch bei den Gehalten der Abbauprodukte der Androgene Epitestosteron und cis-Androsteron traten keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Ochs auf.

Glucocorticoide Cortison und Cortisol

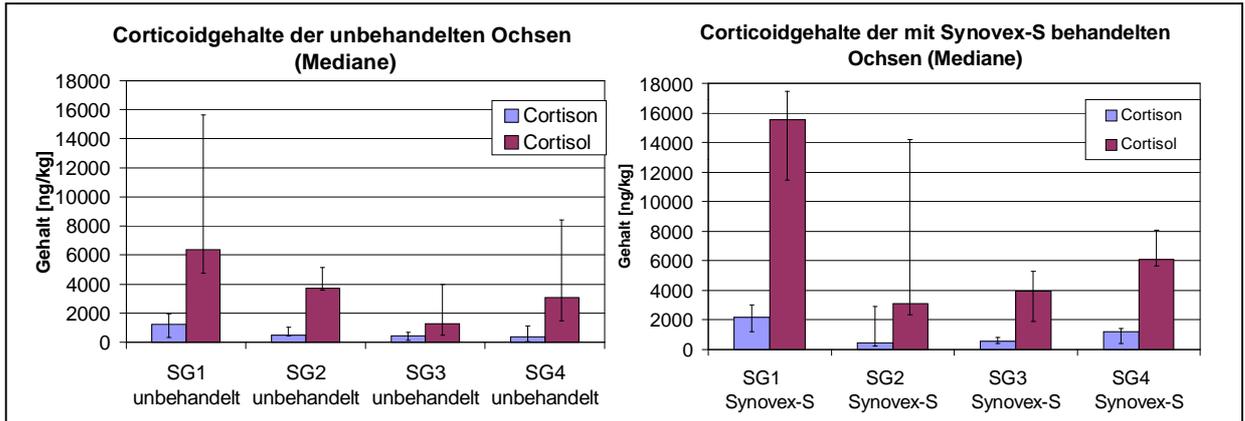


Abbildung 15 – Mediane der Corticoidgehalte der mit Synovex-S behandelten und der unbehandelten Ochs

Abbildung 15 zeigt die Mediane der Corticoidgehalte der unbehandelten und behandelten Ochs mit den Schwankungsbreiten der beiden Corticoide. In SG 1 waren die Corticoidgehalte; insbesondere der Cortisolgehalt der behandelten Ochs gegenüber

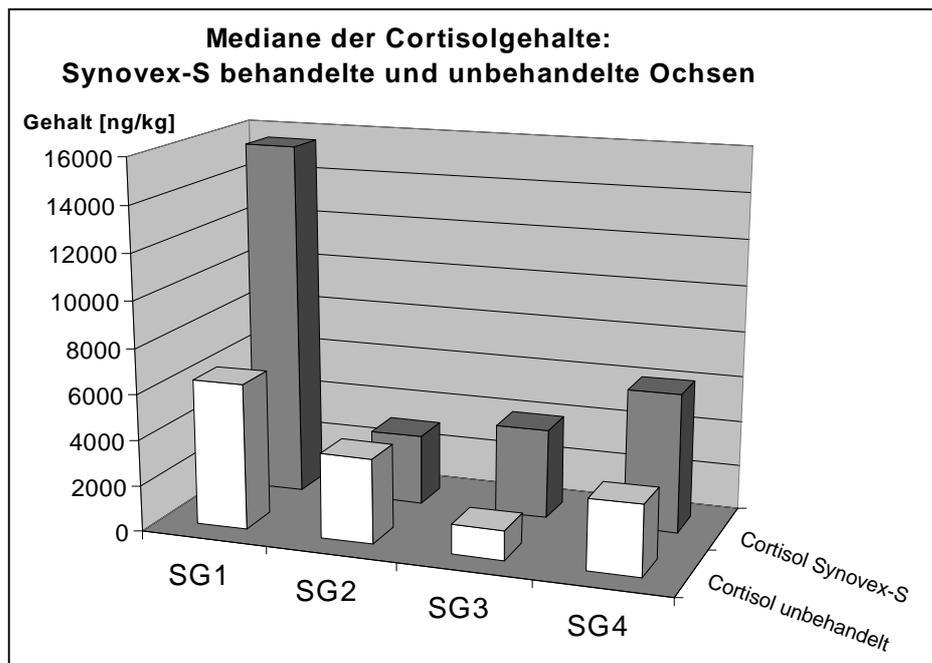


Abbildung 16 – Mediane der Cortisolgehalte der behandelten und unbehandelten Ochs

den unbehandelten Ochsenerhöht. Allerdings gab es auch unbehandelte Ochsenerhöht, die höhere Corticoidgehalte als durch die Mediane symbolisiert aufwiesen, was deutlich an den Schwankungsbreiten erkennbar ist.

Vergleicht man die Cortisolgehalte der behandelten und unbehandelten Ochsenerhöht, so ergibt sich das in **Abbildung 16** dargestellte Bild. Die behandelten Ochsenerhöht zeigten in allen Schlachtgruppen bis auf SG 2 höhere Mediane der Cortisolgehalte.

Dabei spiegelt sich, anders als bei den Androgenen, das Verhalten des Progesterons als Vorstufe des Cortisols wieder. Auch bei Cortisol zeigt sich bei den unbehandelten Ochsenerhöht eine Abnahme des Medians bis SG 3 und eine anschließende leichte Zunahme zu SG 4.

Ähnliches zeigt sich in **Abbildung 17**. Dargestellt sind hier die Mediane der Cortisongehalte der behandelten und unbehandelten Ochsenerhöht. Diese waren, ebenso wie die Mediane der Cortisolgehalte, bis auf SG 2 für die behandelten Ochsenerhöht gegenüber den unbehandelten Ochsenerhöht erhöht. Wie auch bei Cortisol war eine starke Erhöhung des Medians der ersten Schlachtgruppe zu erkennen. Es folgte eine starke Abnahme zu SG 2 und dann ein Anstieg bis SG 4. Auch der Median der Cortisongehalte der unbehandelten Ochsenerhöht von SG 1 war erhöht und nahm zu SG 2 stark ab.

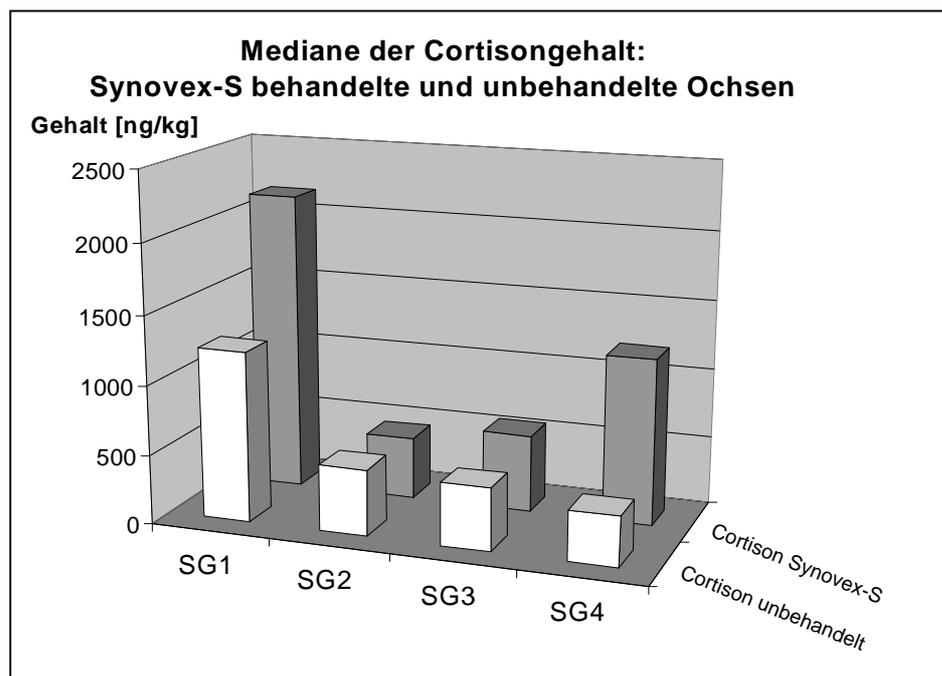


Abbildung 17 – Mediane der Cortisongehalte der behandelten und unbehandelten Ochsenerhöht

FRITSCHER et al. (1999) stellten leicht erhöhte Cortisongehalte bei Synovex-S behandelten Ochsenerhöht fest. Diese zeigten 160 Tage nach der Implantation einen Cortisongehalt von 703 ± 141 ng/kg im Gegensatz zu den unbehandelten Ochsenerhöht mit einem Gehalt von 398 ± 77 ng/kg. Die Cortisolgehalte der Muskulatur der behandelten Ochsenerhöht unterschied sich mit 8621 ± 1275 ng/kg kaum von dem der unbehandelten Ochsenerhöht mit 11489 ± 2921 ng/kg. Behandelte und unbehandelte Ochsenerhöht unterschieden sich durch das Verhältnis von Cortison zu Cortisol im Muskel. Bei den unbehandelten

Ochsen machte Cortison $3,76 \pm 0,59$ % des Cortisolgehaltes aus, während dieser Anteil bei den behandelten Ochsen $8,24 \pm 1,0$ % ausmachte. Auch bei dem Cortison/Cortisol-Verhältnis in der Muskulatur von Bullen und Ochsen konnte ein Unterschied festgestellt werden. So zeigten Bullen 1,6 mal höhere Cortison/Cortisol-Verhältnisse (FRITSCHE & STEINHART, 1998). Als Grund hierfür wurde die Beeinflussung von Enzymen, die Glucocorticoide metabolisieren, durch Sexualhormone genannt (ERIKSSON, 1974).

Die von FRITSCHE et al. (1999) zu einem Zeitpunkt nach der Behandlung mit Synovex-S festgestellten Unterschiede im Cortison/Cortisol-Verhältnis können bei Untersuchungen über einen längeren Zeitraum nicht bestätigt werden, so daß hierauf nicht grundsätzlich eine Unterscheidung zwischen behandelten und unbehandelten Ochsen basieren kann. Alle untersuchten Ochsen wiesen, unabhängig von der Behandlung, ein sehr ähnliches Cortison/Cortisol-Verhältnis auf. Die ermittelten Cortisongehalte lagen zwischen 40 und 1960 ng/kg für die unbehandelten Ochsen und zwischen 230 und 3040 ng/kg für die mit Synovex-S behandelten Ochsen. Die behandelten Ochsen wiesen Cortisolgehalte von 1880 bis 17460 ng/kg und die unbehandelten von 480 bis 15670 ng/kg auf.

7.1.3 Muskelgewebe – unpolarer Extrakt

Zunächst wurde wie unter 4.2 beschrieben eine polare Extraktion des Muskelgewebes mit einem Methanol/Wasser-Gemisch durchgeführt und analysiert. Die Ergebnisse sind unter 7.1.2 dargestellt. Der verbliebene Rückstand wurde, wie unter 6.2 beschrieben, mit Ethylacetat und anschließend mit *n*-Hexan extrahiert. Dieser Extrakt wurde nun nicht wie unter 6.2 beschrieben weiter gereinigt, sondern wie die Extrakte der Fettgewebe behandelt. Diese Methode der Reinigung wurde der für die Reinigung des unpolaren Extraktes des Muskelgewebes (6.2.3) vorgezogen, da keine Freisetzung von Steroidfettsäureestern notwendig ist und diese Methode weniger zeitaufwendig ist. In **Abbildung 18** sind die Steroidhormonmuster der unpolaren Extrakte des Muskelgewebes anhand der Mediane der in den Gruppen ermittelten Gehalte dargestellt. Die Steroidgehalte der einzelnen Extrakte sowie die Mediane sind in Anhang 9.12.3 angegeben. Die Skalierung in **Abbildung 18** wurde so gewählt, daß einige Schwankungsbreiten nicht vollständig dargestellt sind. Der unpolare Extrakt der SG 2 wurde nicht untersucht, da Probleme bei der Derivatisierung der Probenextrakte auftraten und für eine Wiederholung die Probenmenge zu gering war.

Vergleicht man die Steroidhormonmuster der unpolaren Extrakte mit denen der polaren Extrakte (**Abbildung 11**), so stellt man fest, daß diese sich ähneln. Wieder treten starke Schwankungen in den Gehalten der einzelnen Steroide innerhalb einer Schlachtgruppe auf. Die unpolaren Extrakte wiesen annähernd so große Steroidgehalte wie die polaren Extrakte auf (siehe 6.2.4.2). Pregnenolon war sowohl in den polaren als auch in den unpolaren Extrakten das dominierende Steroid. Die Progesterongehalte waren für die unbehandelten Ochsen im polaren und unpolaren Extrakt ungefähr gleich hoch. Die Erhöhung des Progesterongehaltes in den polaren Extrakten der behandelten Ochsen könnte auf eine Erhöhung des Progesterongehaltes im Blut zurückzuführen sein, die bei der Behandlung von Rindern mit Progesteron auftritt (SANTARIUS & RAPP, 1990). Die Rückstände von Progesteron in Gefäßen müßten mit polarem Lösungsmittel leicht extrahierbar sein und somit mit dem polaren Extrakt erfaßt werden.

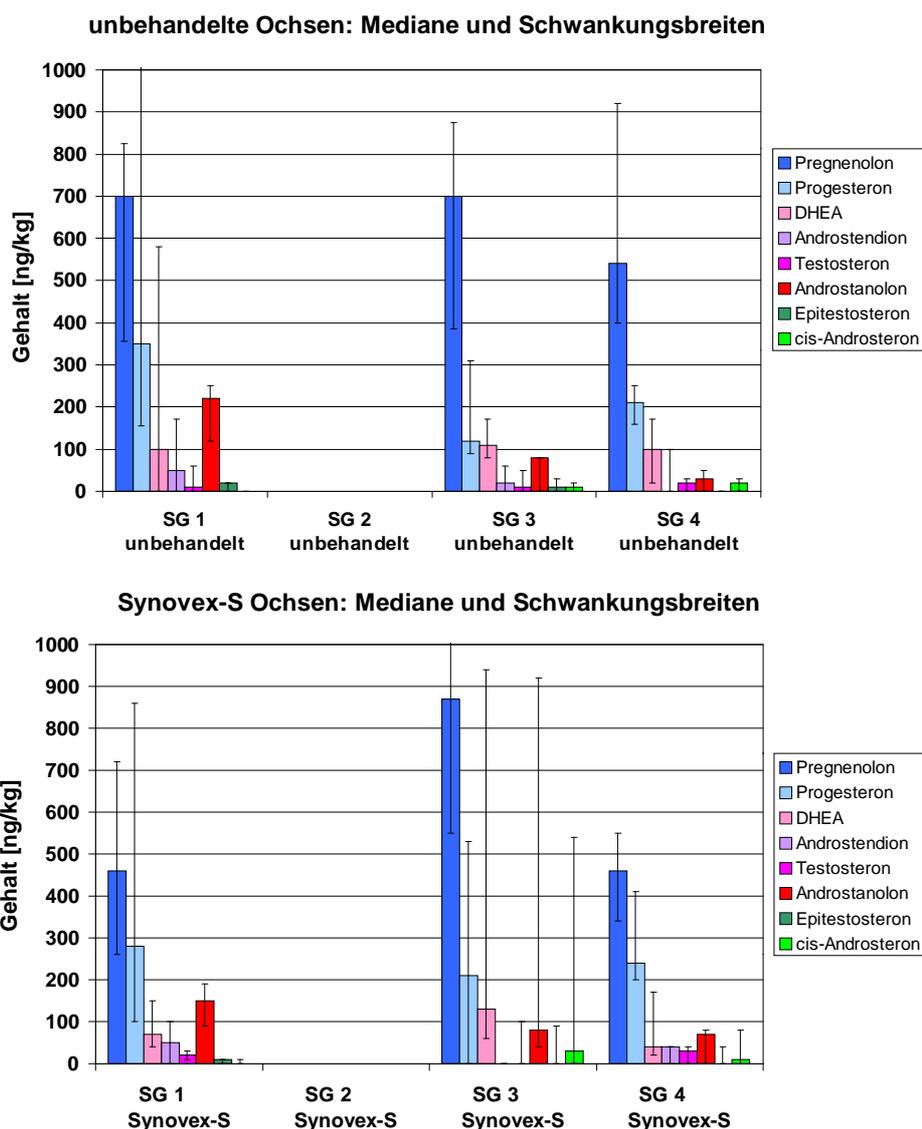


Abbildung 18 – Steroidhormonmuster der unpolaren Extrakte des Muskelgewebes; oben: unbehandelte Tiere; unten: mit Synovex-S behandelte Tiere

Die Gehalte und das Muster der Androgene, deren Vorstufen und Metaboliten unterscheiden sich nur wenig von denen des polaren Extraktes. Es lag eine Tendenz zu geringeren Gehalten im unpolaren Extrakt vor. Mögliche Gründe für das Vorliegen der Steroide im unpolaren Extrakt wurden schon unter 6.2.4.2 diskutiert. Durch die Isolierung der Steroide mit Hilfe der Kieselgelsäule (siehe 6.3) konnten die Corticoide aufgrund ihrer Polarität nicht erfaßt werden (siehe 6.3.2).

Die Steroidhormonmuster des unpolaren Extraktes bieten keinen Anhaltspunkt für die Differenzierung von mit Synovex-S behandelten und unbehandelten Ochs. Es erfolgt keine Akkumulation von Steroiden durch die Behandlung mit Synovex-S in fettreichen Zellen. Selbst das verabreichte lipophile Progesteron wird bei den behandelten Ochs nicht im intramuskulären Fett angereichert.

7.1.4 Muskelgewebe – Gesamtsteroide

Der hier als Gesamtsteroidgehalt angegebene Steroidgehalt ist die Summe aus dem Steroidgehalt des polaren Extraktes eines Muskels sowie dem Steroidgehalt des unpolaren Extraktes, der aus demselben Probenhomogenat hergestellt wurde. Die Gesamtsteroidgehalte sowie die Mediane der Steroidgehalte sind in Anhang 9.12.4 angegeben.

In **Abbildung 19** sind die Steroidhormonmuster dargestellt, die sich bei der Betrachtung der Summe der Steroidgehalte der polaren und unpolaren Extrakte ergeben. Von SG 2

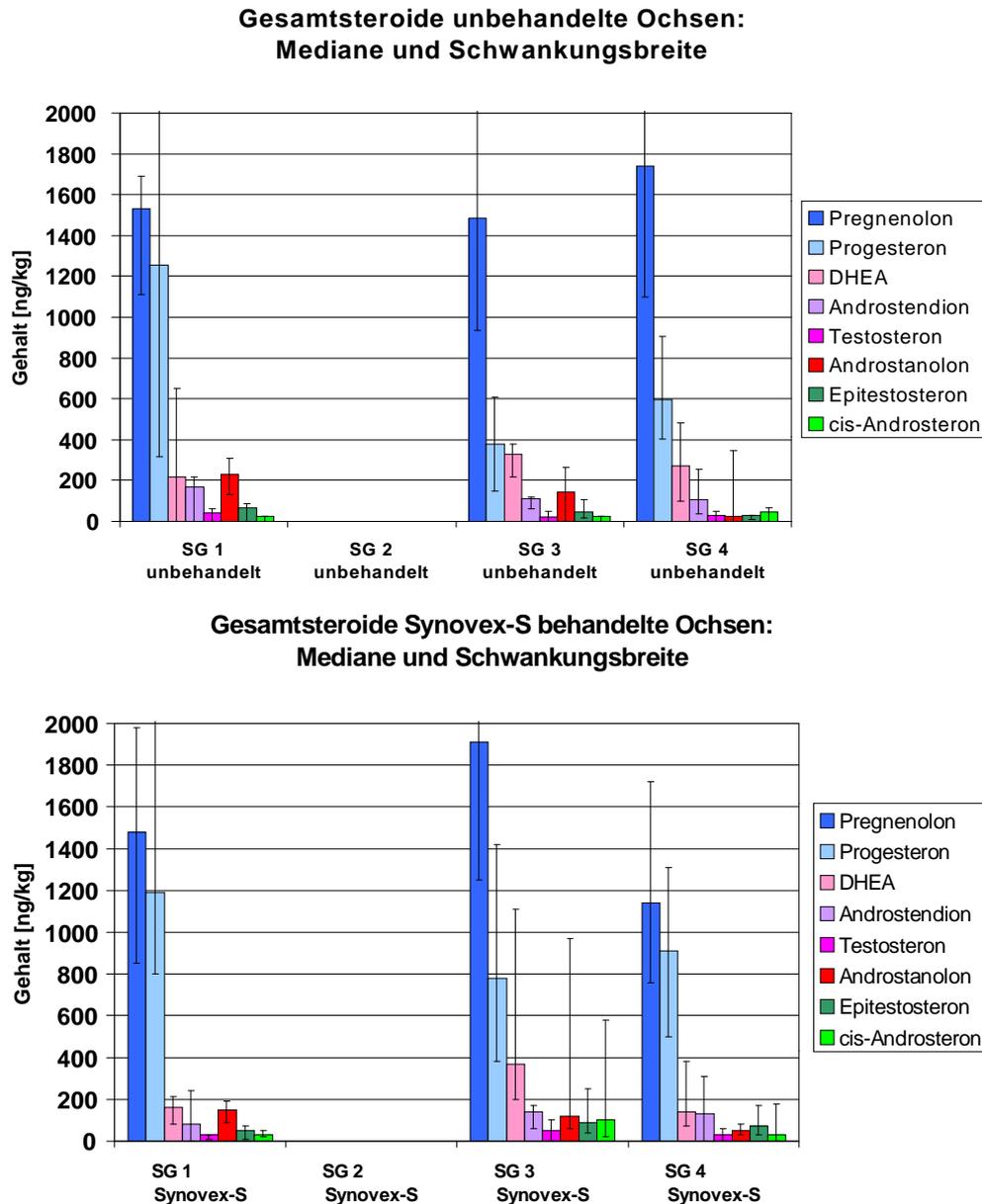


Abbildung 19 – Steroidhormonmuster der Gesamtsteroidgehalte des Muskelgewebes; oben: unbehandelte Ochs; unten: Synovex-S behandelte Ochs

konnten keine Gesamtsteroidgehalte dargestellt werden, da von diesen Proben keine unpolaren Extrakte erstellt wurden (siehe 7.1.2).

Die Steroidhormonmuster der Gesamtsteroidgehalte boten in etwa das gleiche Bild wie die Steroidmuster des polaren und unpolaren Extraktes. Besonders deutlich wird, daß Pregnenolon die höchsten Gehalte von allen ermittelten Steroiden aufwies.

Eine leichte Erhöhung des Progesterongehaltes war wiederum bei den behandelten Ochs zu erkennen. Aber auch bei den Gesamtsteroiden waren die Gehalte der einzelnen Steroide in den Gruppen mit sehr starken Schwankungen behaftet. Diese waren bei Pregnenolon und Progesteron zum Teil so groß, daß die höchsten Gehalte in den Gruppen nicht mit dargestellt werden konnten.

Wie bei den Medianen der Steroidgehalte des polaren Extraktes war auch bei den Gesamtsteroidgehalten der unbehandelten Ochs ein Anstieg der Pregnenolongehalte von SG 3 zu SG 4 zu verzeichnen. Die möglichen Gründe für den Anstieg des Pregnenolongehaltes zu SG 4 wurden schon unter 7.1.2 genannt.

Bei den behandelten Ochs verhielten sich die Pregnenolongehalte in Hinblick auf die Schlachtgruppen in den beiden Extrakten sowie bei den Gesamtsteroiden gleich. Es erfolgte eine Abnahme des Pregnenolongehaltes zu SG 4.

7.1.5 Statistische Betrachtung - Unterscheidung von unbehandelten und mit Synovex-S behandelten Ochs durch Untersuchung des Muskelgewebes

Die erhöhten Mediane der Pregnenolon- und Progesterongehalte der polaren Extrakte schienen darauf hin zu deuten, daß Unterschiede in den Steroidhormongehalten der behandelten und unbehandelten Ochs bestehen, die eine Differenzierung der beiden

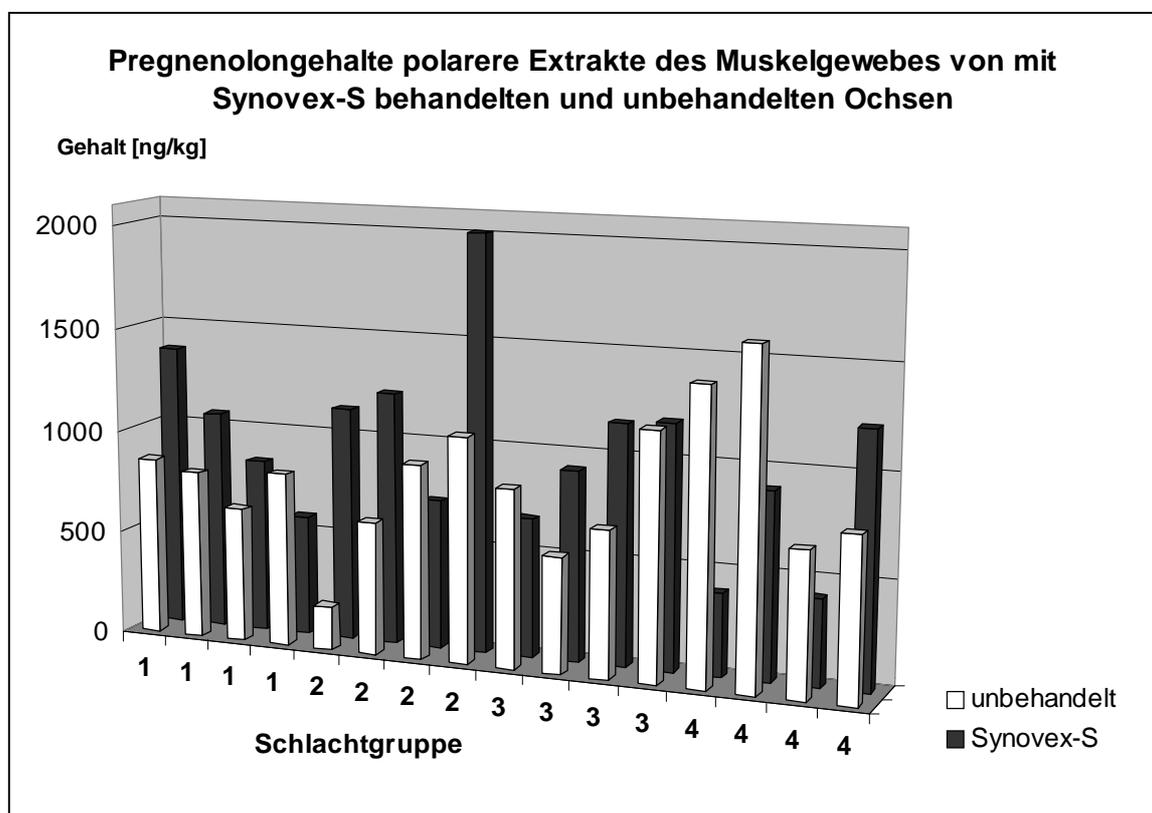


Abbildung 20 – Pregnenolongehalte des polaren MLD-Extraktes der einzelnen Ochs

Gruppen zulassen (siehe **Abbildung 12** und **13**). Bei Betrachtung der Einzelwerte fällt aber auf, daß sehr starke Schwankungen in den Steroidgehalten der behandelten und der unbehandelten Ochsen auftraten. Dies ist in **Abbildung 20** beispielhaft an den Pregnenolongehalten des polaren Extraktes aller untersuchter Ochsen dargestellt.

Um festzustellen, ob statistische Unterschiede zwischen den unbehandelten und den mit Synovex-S behandelten Ochsen einer Schlachtgruppe bestehen, wurde ein Kruskal-Wallis-Test für die einzelnen Steroide durchgeführt (siehe 4.4). Die bei den Medianen erkennbaren Unterschiede gerade im polaren Extrakt des Muskelgewebes zwischen unbehandelten und behandelten Ochsen konnten statistisch nur teilweise belegt werden. Trotz Erhöhung der Mediane einzelner Steroide wie z.B. Pregnenolon bei den behandelten Ochsen treten innerhalb einer Gruppe zu starke Schwankungen auf, um diese Unterschiede statistisch zu belegen.

Bei Betrachtung des polaren Extraktes war bei den Androgenen, deren Vorstufen und Metaboliten mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests nicht zu zeigen, daß die bestimmten Gehalte der behandelten und unbehandelten Ochsen nicht aus einer Grundgesamtheit stammen. Für Pregnenolon und Progesteron, bei denen die Medianwerte für die behandelten und unbehandelten Ochsen Tendenzen zu höheren Gehalten bei den behandelten Ochsen zeigten, konnte in SG 2 und SG 3 gezeigt werden, daß diese Gehalte nicht einer Grundgesamtheit entstammen. Des weiteren ließ sich für Cortison in SG 4 und Cortisol in SG 1 und SG 3 zeigen, daß die ermittelten Gehalte nicht aus einer Grundgesamtheit stammen und die Gehalte bei den behandelten Ochsen erhöht waren. Allerdings liegt bei allen Ergebnissen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % vor, so daß nicht von einem signifikanten Ergebnis gesprochen werden kann. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 12** dargestellt.

Tabelle 12 – Polarer Extrakt des Muskelgewebes: Kruskal-Wallis-Test zum Nachweis erhöhter Steroidgehalte bei den behandelten Ochsen

Pregnenolon	Prüfgröße $H > \chi^2$	Signifikanzniveau
SG 2	3,0 > 2,7	0,900
Progesteron		
SG 3	3,0 > 2,7	0,900
Cortison		
SG 4	3,0 > 2,7	0,900
Cortisol		
SG 1	3,0 > 2,7	0,900
SG 3	3,0 > 2,7	0,900

Statistisch nachweisbare Unterschiede treten also nur bei wenigen Steroiden und auch nur vereinzelt in den Schlachtgruppen auf.

Sowohl für den unpolaren Muskelextrakt als auch für den Gesamtsteroidgehalt ist für kein Steroid nachweisbar, daß die ermittelten Gehalte in den Muskelgeweben der behandelten und unbehandelten Ochsen nicht aus einer Grundgesamtheit entstammen.

7.1.6 Statistische Betrachtungen – Korrelationen zwischen Steroidgehalten, Fettgehalt und Ausschlachtgewicht

Fettgehalt - Steroidgehalt

Von FRITSCHE et al. (1998b) wurde ein Zusammenhang zwischen dem Fettgehalt des Muskelgewebes und dem Steroidgehalt vermutet. Proben mit hohem sichtbarem Fettgehalt wiesen doppelt so hohe Gehalte von Pregnenolon und Progesteron und ebenfalls erhöhte Gehalte an Androgenen auf. Die Corticoidgehalte nahmen mit zunehmendem Fettgehalt ab. Diese Untersuchung fand an einer geringen Anzahl von Proben statt, die zum Teil einen höheren Fettgehalt dadurch aufwiesen, daß das Auflagenfett nicht entfernt wurde. Um Proben mit geringerem Fettgehalt untersuchen zu können, wurde vor der Untersuchung das Auflagenfett sowie das sichtbare, in den Muskel eingelagerte Fett abgetrennt. Es wurde keine Bestimmung des intramuskulären Fettgehaltes durchgeführt.

Die Fettgehalte aller Muskelproben wurden im Rahmen dieser Untersuchungen ermittelt (siehe 7.1.1). Die Muskelproben lagen alle ohne anliegendes Auflagenfett vor. Mit Hilfe der ermittelten intramuskulären Fettgehalte sollten Zusammenhänge zwischen der Fetteinlagerung im Gewebe und dessen Steroidgehalten untersucht werden. Durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho (siehe 4.4) sollten Zusammenhänge zwischen Fettgehalt und Steroidgehalt ermittelt werden. Die Rangkorrelation nach Spearman-Rho wurde durchgeführt, da für die Berechnung der Korrelation der Variablen keine Normalverteilung vorliegen muß. Die behandelten und die unbehandelten Ochsen wurden für die Korrelationsanalyse getrennt, da die Verabreichung eines Synovex-S-Implantats Einfluß auf den Fettgehalt von Muskelgewebe haben kann (ONO et al., 1996), der in diesen Untersuchungen allerdings nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 7.1.1). Die Korrelationen der ermittelten Fettgehalte wurden mit den Steroidgehalten im polaren und im unpolaren Extrakt sowie mit den Gesamtsteroidgehalten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 13 a** und **b** zu sehen.

Tabelle 13 a – Korrelationen des Fettgehaltes des Muskelgewebes und des Ausschlachtgewichtes mit den Steroidgehalten der unbehandelten Ochsen

<i>Steroid</i>	polarer Extrakt		unpolarer Extrakt		Gesamtsteroidgehalt	
	Fett^a (r)	SG^b (r)	Fett^a (r)	SG^b (r)	Fett^a (r)	SG^b (r)
<i>Pregnenolon</i>	0,477	0,305	0,214	0,014	0,350	0,280
<i>Progesteron</i>	-0,313	-0,193	0,511	-0,249	-0,567	-0,140
<i>DHEA</i>	0,732**	0,601*	0,123	0,053	0,289	0,161
<i>Androstendion</i>	0,072	-0,01	-0,290	-0,187	-0,262	-0,225
<i>Testosteron</i>	-0,198	-0,174	-0,270	-0,218	-0,254	-0,231
<i>Androstanolon</i>	0,177	0,038	-0,716**	-0,820**	-0,267	0,155
<i>Epitestosteron</i>	0,224	-0,220	0,355	-0,423	-0,321	-0,268
<i>cis-Androsteron</i>	0,042	0,228	0,386	0,385	0,231	0,490
<i>Cortisol</i>	-0,379	-0,432	-	-	-	-
<i>Cortison</i>	-0,366	-0,370	-	-	-	-
SG	0,831**	-	0,816**	-	0,816**	-

^a intramuskulärer Fettgehalt ^b Ausschlachtgewicht * p < 0,05 (2-seitig) ** p < 0,01 (2-seitig)

r Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho

Offensichtlich besteht eine sehr starke lineare Abhängigkeit zwischen dem Ausschlachtgewicht und dem intramuskulären Fettgehalt der unbehandelten Ochsen. Der Zusammenhang der beiden Parameter ist hoch signifikant. Für die Korrelation zwischen Schlachtgewicht und Fettgehalt ergibt sich für die Gruppe des polaren Extraktes ein anderer Korrelationskoeffizient als für den unpolaren Extrakt und den Gesamtsteroidgehalt, da die beiden zuletzt genannten Gruppen nicht SG 2 einschließen (siehe 7.1.3 und 7.1.4).

Ein starker, hoch signifikanter Zusammenhang besteht ebenfalls zwischen DHEA-Gehalt des polaren Extraktes und intramuskulärem Fettgehalt. Zwischen DHEA-Gehalt und Ausschlachtgewicht besteht ein Zusammenhang mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. FRITSCHKE et al. (1998a) hatten keinen Zusammenhang zwischen DHEA-Gehalt und dem Alter von Ochsen und Bullen, welches mit ansteigendem Schlachtgewicht einhergeht, gesehen. Diese Korrelationen treten nicht zwischen dem DHEA-Gehalt des unpolaren Extraktes und nicht zwischen dem berechneten gesamten DHEA-Gehalt und dem Ausschlachtgewicht bzw. Fettgehalt auf. Dies deutet darauf hin, daß das DHEA, das nicht in irgendeiner Form gebunden vorliegt, eine Beziehung zum Körpergewicht und Fettgehalt des Muskels aufweist. Untersuchungen an menschlichem Plasma ergaben, daß im allgemeinen der DHEA-Gehalt mit dem Alter abnimmt (LAPCÍK et al., 1995; BIRKENHÄGER-GILLESE et al., 1994; EBELING & KOIVISTO, 1994). FEHÉR & BODROGI (1982) stellten allerdings fest, daß die DHEA Konzentration im Fettgewebe sehr viel höher ist als im Plasma. Die Altersabhängigkeit im Fettgewebe wurde noch nicht untersucht.

Weiterhin besteht scheinbar ein Zusammenhang zwischen dem Androstanolongehalt des unpolaren Extraktes und dem intramuskulären Fettgehalt. Mit zunehmendem Fettgehalt nimmt der Androstanolongehalt des unpolaren Extraktes ab. Der Androstanolongehalt des polaren Extraktes bleibt aber unbeeinflusst, ebenso wie der gesamte Androstanolongehalt.

Interessanterweise tritt keine Korrelation der unpolaren Steroide Pregnenolon, Progesteron und Androstendion mit dem intramuskulären Fettgehalt in den unterschiedlichen Extrakten auf.

Die gleiche Korrelationsanalyse wurde für die behandelten Ochsen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 13 b** dargestellt.

Tabelle 13 b – Korrelation von Fettgehalt des Muskelgewebes und Ausschlachtgewicht mit den Steroidgehalten der behandelten Ochsen

<i>Steroid</i>	polarer Extrakt		unpolarer Extrakt		Gesamtsteroidgehalt	
	Fett^a (r)	SG^b (r)	Fett^a (r)	SG^b (r)	Fett^a (r)	SG^b (r)
<i>Pregnenolon</i>	0,210	0,418	0,452	-0,081	0,350	-0,091
<i>Progesteron</i>	-0,068	-0,094	-0,182	-0,098	-0,567	-0,273
<i>DHEA</i>	0,647**	0,066	0,053	-0,242	0,289	0,084
<i>Androstendion</i>	0,565*	0,332	-0,526	-0,411	-0,262	0,400
<i>Testosteron</i>	0,634**	0,383	-0,080	0,022	-0,254	0,237
<i>Androstanolon</i>	0,493	0,176	-0,432	-0,523	-0,267	-0,509
<i>Epitestosteron</i>	0,464	0,417	-0,417	-0,338	-0,321	0,323
<i>cis-Androsteron</i>	0,268	0,256	0,632*	0,380	0,231	0,333
<i>Cortisol</i>	-0,654**	-0,589*	-	-	-	-
<i>Cortison</i>	-0,604*	-0,422	-	-	-	-
SG	0,418	-	0,573	-	0,573	-

^a intramuskulärer Fettgehalt ^b Ausschlachtgewicht * p < 0,05 ** p < 0,01 r Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho

Es tritt bei diesen Ochsen nur eine schwache Korrelation zwischen Schlachtgewicht und Fettgehalt der Muskelproben auf, die sich an den berechneten Korrelationskoeffizienten zeigt (siehe 4.4). Wie schon ONO et al. (1996) feststellten, besteht ein Zusammenhang zwischen der Synovex-S Behandlung und der Fetteinlagerung in das Muskelgewebe. Die Behandlung scheint die natürliche Fetteinlagerung in das Muskelgewebe zu beeinflussen, so daß nur noch ein schwacher positiver linearer Zusammenhang zwischen Ausschlachtgewicht und Fetteinlagerung besteht.

Eine positive lineare Abhängigkeit bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ besteht wiederum zwischen DHEA-Gehalt des polaren Extraktes und Fettgehalt des Muskelgewebes. Allerdings tritt bei den behandelten Ochsen diese Abhängigkeit nicht zwischen DHEA-Gehalt im polaren Extrakt und Ausschlachtgewicht auf.

Der cis-Androsterongehalt des unpolaren Extraktes zeigt ebenfalls eine positive lineare Abhängigkeit mit dem Fettgehalt auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Ein negativer Zusammenhang besteht zwischen Cortisolgehalt des polaren Extraktes und Fettgehalt des Muskelgewebes ($p < 0,01$) bzw. Cortisolgehalt und Ausschlachtgewicht ($p < 0,05$). Der Cortisolgehalt des polaren Extraktes korreliert ebenso negativ mit dem Fettgehalt des polaren Extraktes ($p < 0,05$). Dies liegt vermutlich an der hohen Polarität dieser Steroide, die schlecht in Fett löslich sind. Unverständlich ist in diesem Fall allerdings, warum dieser Zusammenhang nicht auch bei den unbehandelten Ochsen auftritt. Diese zeigen zwar auch eine leichte negative Abhängigkeit vom intramuskulären Fettgehalt und Schlachtgewicht, diese ist aber nicht signifikant.

7.2 Auf dem MLD aufliegendes Fettgewebe

Die Steroidhormonmuster des auf dem MLD aufliegenden Fettgewebes (siehe 3.1) wurden mit Hilfe der entwickelten Methode bestimmt. Die ermittelten Steroidgehalte sowie die Mediane der Steroide in den Schlachtgruppen sind im Anhang 9.12.5 angegeben. Die Corticoide Cortison und Cortisol konnten aufgrund der gewählten Methode nicht bestimmt werden (siehe 6.3). Die Steroidhormonmuster, bestehend aus den Medianen der einzelnen Steroide in den Schlachtgruppen; sind mit den Schwankungsbreiten in **Abbildung 21** dargestellt. Das obere Diagramm zeigt die Steroidhormonmuster der unbehandelten Ochsen, das untere Diagramm die der behandelten Ochsen. Die oberen Grenzen der Schwankungsbreiten von Pregnenolon konnten aufgrund der gewählten Skalierung nicht in allen Fällen dargestellt werden.

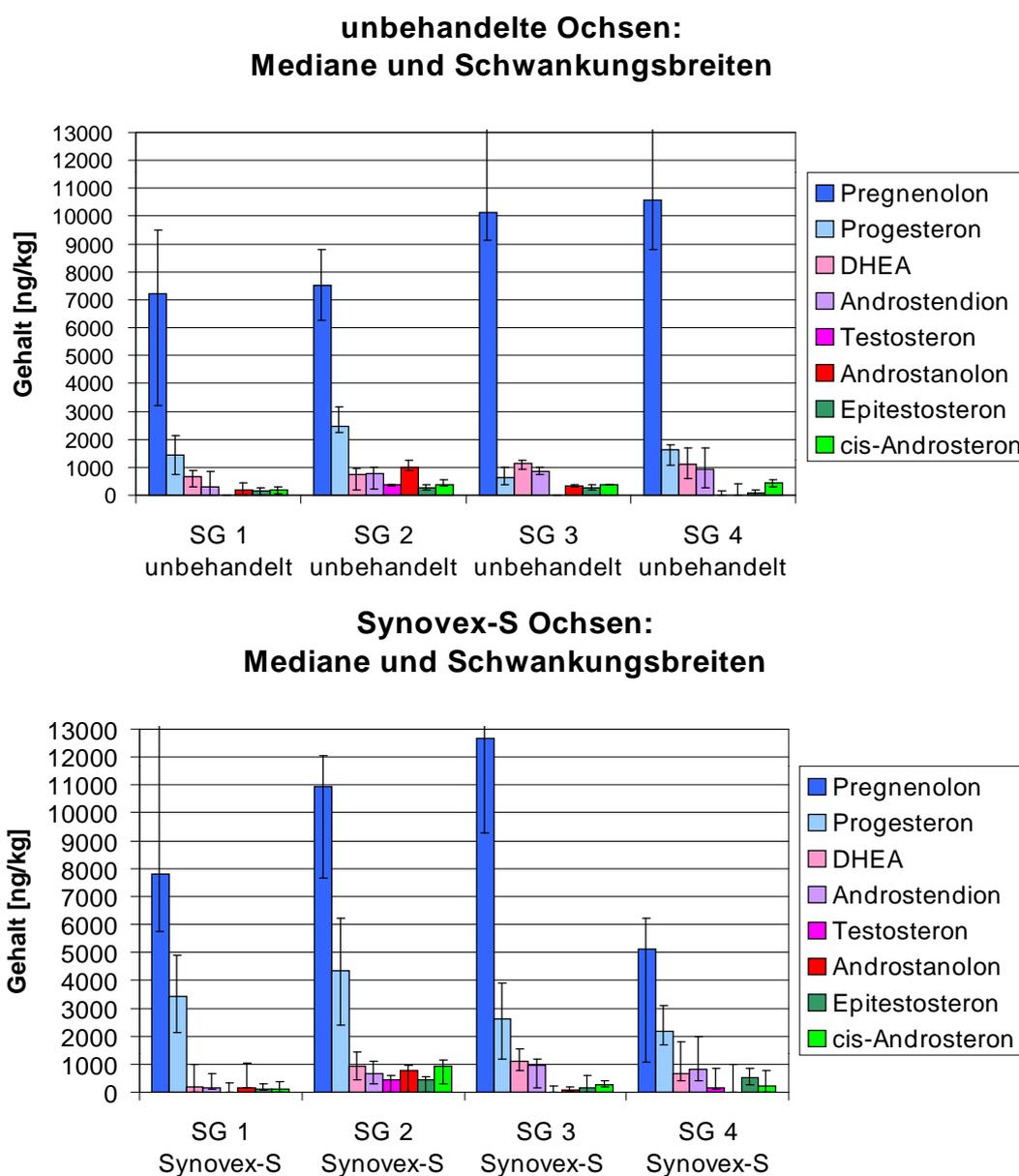


Abbildung 21 – Steroidhormonmuster des Fettgewebes: Mediane und Schwankungsbreiten; oben: unbehandelte Ochsen; unten Synovex-S behandelte Ochsen

Die Steroidhormonmuster der behandelten und unbehandelten Ochsen einer Schlachtgruppe unterschieden sich nur geringfügig. Pregnenolon war sowohl bei den behandelten als auch bei den unbehandelten Ochsen in allen Schlachtgruppen das Steroid mit dem höchsten Gehalt im Fettgewebe. Es folgte Progesteron, dessen Gehalt im Fettgewebe der behandelten Ochsen leicht gegenüber dem der unbehandelten Ochsen erhöht war. Die Androgene, ihre Vorstufen und Metaboliten lagen in sehr viel geringeren Mengen als Pregnenolon im Fettgewebe vor. Der Pregnenolongehalt war bei einigen Ochsen sogar um den Faktor 10 oder mehr gegenüber den Androgengehalten erhöht.

Fettgewebe gehört nicht zu den klassischen Zielgeweben der Steroide, obwohl im menschlichen Fettgewebe bereits Rezeptoren für Corticoidhormone nachgewiesen wurden. Das Vorliegen von anderen Steroidrezeptoren wurde noch nicht beschrieben (REBUFFÉ-SCRIVE et al., 1990). Fettgewebe soll aber eine Speicherfunktion für Steroide aufweisen (GAIANI & CHIESA, 1986; WÄHNER et al., 1993). Die Speicherung speziell von Pregnenolon wurde allerdings noch nicht beschrieben. Fraglich ist die Funktion einer solchen Speicherung im Fettgewebe. Bei Pregnenolon handelt es sich um eine Vorstufe aller Steroide, von der keine physiologische Wirkung bekannt ist. Pregnenolon könnte aufgrund dieser Funktion als Vorstufe gespeichert werden, wodurch ein Steroidreservoir für die weitere Metabolisierung entstehen würde. Dabei ist unklar, ob eine weitere Metabolisierung des Pregnenolons im Fettgewebe stattfinden würde. Zwar zeigten LONGSCOPE et al. (1976a; 1976b), daß das Fettgewebe eine Rolle im Steroidmetabolismus spielt, die genaue Funktion des Fettgewebes im Steroidstoffwechsel ist allerdings noch nicht geklärt. Der Ablauf gewisser Prozesse des Steroidstoffwechsels im Fettgewebe ist allerdings bekannt. LAVALLÉE et al. (1996) beschreiben umfangreiche intrazelluläre Reaktionen, die in verschiedenen Zielgeweben stattfinden. Diese sind hauptsächlich enzymatischer Natur, wobei die Muster der Steroid-metabolisierenden Enzyme organspezifisch sein sollen (BARTSCH, 1993). Eine Funktion des Fettgewebes in der Steroidbiosynthese ist die Aromatisierung von Androgenen zu Estrogenen (KILLINGER et al., 1990, WILSON & FOSTER, 1992; BARTSCH, 1993). Weiterhin wurde mehrfach die hormonsensitive Lipase (E.C. 3.1.1.13) in Rinderfettgewebe nachgewiesen. Dieses Enzym setzt aus Steroidfettsäureestern Steroide frei (LEE et al., 1988). Dies deutet darauf hin, daß Steroidfettsäureester in Fettgeweben gespeichert werden und durch dieses Enzym wieder freigesetzt werden können. Allerdings konnten bislang in der Literatur und in den eigenen Untersuchungen Steroidfettsäureester nicht in nennenswerten Mengen im Fettgewebe von Rindern nachgewiesen werden (siehe 6.3.6). Da das nachgewiesene Pregnenolon ohne Bindung an eine Fettsäure vorliegt, sollte es eine geringe physiologische Halbwertszeit besitzen. Unter Umständen wirkt aber auch die Einlagerung in das Fettgewebe als Schutz vor Konjugation und schneller Ausscheidung. Ein für die Akkumulation des Pregnenolons verantwortlicher Faktor könnte auch dessen geringe Polarität sein.

Die Entwicklung des Pregnenolon- und Progesterongehaltes im Fettgewebe in Abhängigkeit von der Anzahl der Implantate soll im folgenden detailliert betrachtet werden.

Pregnenolon und Progesteron

In **Abbildung 22** sind die medianen Pregnenolongehalte des Fettgewebes der behandelten und unbehandelten Ochsener der einzelnen Schlachtgruppen dargestellt. Deutlich war ein starker Anstieg des Medians der Pregnenolongehalte der unbehandelten

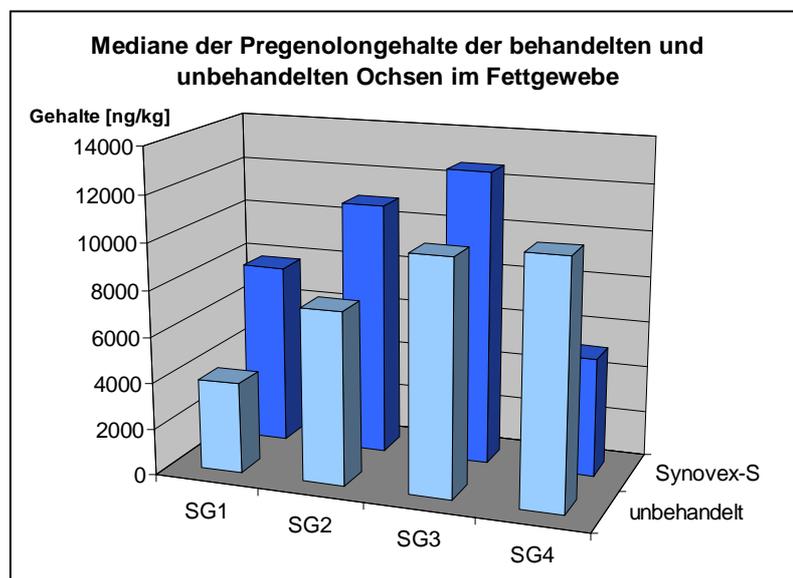


Abbildung 22– Mediane der Pregnenolongehalte der behandelten und unbehandelten Ochsener im Fettgewebe

Ochsener von SG 1 bis zu SG 3 und ein schwacher Anstieg von SG 3 zu SG 4 zu verzeichnen. Dieser Anstieg scheint, ebenso wie im Muskelgewebe, auf das zunehmende Alter zurückzuführen zu sein (siehe 7.1). Dabei kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Anstieg der Pregnenolongehalte auf eine verstärkte Produktion dieses Steroids mit zunehmendem Alter oder auf eine gleichbleibende Produktion und eine Akkumulation zurückzuführen ist. Die Pregnenolongehalte stiegen bei den behandelten Ochsener ebenso deutlich wie bei den unbehandelten von SG 1 bis SG 3 an. Dabei waren die Mediane der Pregnenolongehalte der behandelten Ochsener deutlich gegenüber denen der unbehandelten Ochsener erhöht. Die ermittelten Pregnenolongehalte lagen bei den unbehandelten Ochsener zwischen 2190 ng/kg und 14400 ng/kg und bei den behandelten Ochsener der SG 1 bis SG 3 zwischen 5730 ng/kg und 18470 ng/kg.

Von SG 3 zu SG 4 erfolgte bei den behandelten Ochsener eine rapide Abnahme des Pregnenolongehaltes. Diese Abnahme war auch schon bei den behandelten Ochsener von SG 3 zu 4 im Muskelgewebe erkennbar. Für diese Abnahme könnte auch hier der schon diskutierte Rückkopplungseffekt (siehe 7.1.2) verantwortlich gemacht werden. Durch die ständige Verabreichung von Progesteron und 17β -Estradiol kann sich der Körper der Ochsener auf die zugeführte Menge eingestellt und die Eigenproduktion von Steroiden gesenkt haben, so daß nach dem Absetzen des Präparates nur noch eine geringe Eigenproduktion stattfindet. Diese Begründung wäre für das Absinken des Pregnenolongehaltes aber nur dann folgerichtig, wenn aus dem applizierten Progesteron Pregnenolon im Körper gebildet werden könnte. Regt andererseits die Verabreichung des Präparates die Eigenproduktion der Vorstufe Pregnenolon an, so würde nach Absetzen

des Präparates der Pregnenolongehalt dann unter das natürliche Niveau sinken, da jetzt der auslösende Effekt für die Eigenproduktion fehlt.

Es liegen keine Literaturwerte für Pregnenolongehalte im Fettgewebe vor. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, daß generell seltener Steroidgehalte im Fettgewebe als im Muskelgewebe von Rindern ermittelt wurden, da die Bestimmung weitaus aufwendiger und bis auf wenige Steroide bisher nicht möglich war. Zum anderen wurden aufgrund der untergeordneten physiologischen Rolle von Pregnenolon bezüglich seiner Wirksamkeit kaum Pregnenolongehalte des Muskelgewebes bestimmt.

Die Mediane der Progesterongehalte verhielten sich bei behandelten und unbehandelten Ochsena ähnlich (**Abbildung 23**). Ein Maximum der Gehalte war bei SG 2 zu verzeichnen, dann erfolgt eine Abnahme. Die medianen Gehalte der behandelten Ochsena waren gegenüber denen der unbehandelten Ochsena erhöht und waren bei SG 1 bis SG 3 mit 3440 ng/kg gegenüber 1440 ng/kg in SG 1, 4350 ng/kg gegenüber 2450 ng/kg in SG 2 und 2630 ng/kg gegenüber 620 ng/kg in SG 3 fast immer mehr als doppelt so hoch. Bei SG 4 näherten sich die Mediane für die behandelten und unbehandelten Ochsena an. Der Median der Progesterongehalte lag für die unbehandelten Ochsena bei 1630 ng/kg und bei den behandelten Ochsena bei 2170 ng/kg. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme des Progesterongehaltes bei den behandelten Ochsena der SG 4 ist die geringere Freisetzung von Progesteron aus dem Implantat durch Überschreiten des Wirkungsmaximums. Allerdings war auch schon von SG 2 zu SG 3 eine Abnahme des Progesterongehaltes bei den behandelten Ochsena zu verzeichnen, die aber auch bei den unbehandelten Ochsena zu erkennen war.

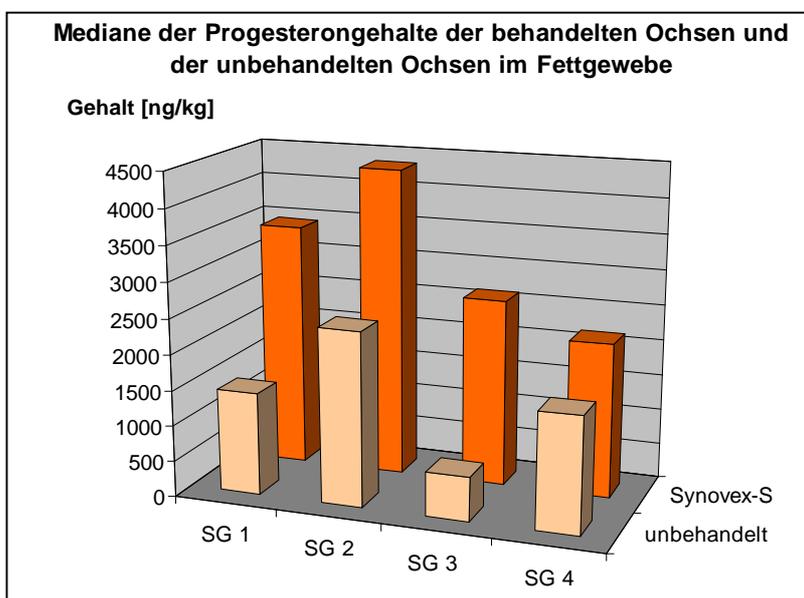


Abbildung 23 – Mediane der Progesterongehalte der behandelten und unbehandelten Ochsena im Fettgewebe

Progesterongehalte in Fettgeweben von Rindern wurden des öfteren untersucht (KUSHINSKY, 1983, HOFFMANN, 1983; LONE, 1997; TSUJIOKA & ITO, 1992), um Belastungen durch eine Progesteronbehandlung zu ermitteln. Durch Verabreichung von

radioaktiv markiertem Progesteron konnte festgestellt werden, daß das verabreichte Progesteron im Fettgewebe der Rinder akkumuliert (ESTERGREEN et al., 1977; MCCRACKEN, 1964; SMITH et al., 1975).

Die publizierten Ergebnisse bezüglich einer Erhöhung der Progesterongehalte aufgrund einer Behandlung mit Progesteron sind jedoch, wie auch die Angaben für das Muskelgewebe, widersprüchlich. So ermittelten TSUJIOKA & ITO (1992) geringere Progesterongehalte im Fettgewebe von Ochsen 30 Tage und 60 Tage nach der Implantation von Synovex-S im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Progesterongehalte des Fettgewebes der behandelten Ochsen betragen 2960 ± 600 ng/kg nach 30 Tagen bzw. 2620 ± 270 ng/kg nach 60 Tagen gegenüber 4550 ± 790 ng/kg bei den Kontrolltieren. KUSHINSKY (1983) hingegen ermittelte höhere Progesterongehalte in den Fettgeweben behandelter Ochsen als in denen unbehandelter. Dabei waren die Progesterongehalte der behandelten Ochsen mit 3400 ± 1320 ng/kg nach 61 Tagen und 3670 ± 2250 ng/kg nach 90 Tagen nur wenig gegenüber den Progesterongehalten der Fettgewebe der unbehandelten Ochsen mit 2480 ± 1610 ng/kg erhöht. Die ermittelten Gehalte innerhalb des hier untersuchten Tierversuchs sind in etwa so hoch wie die von KUSHINSKY (1983) und TSUJIOKA & ITO (1992) angegebenen (siehe Anhang 9.12.5). Es sind jedoch deutlichere Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Ochsen zu erkennen.

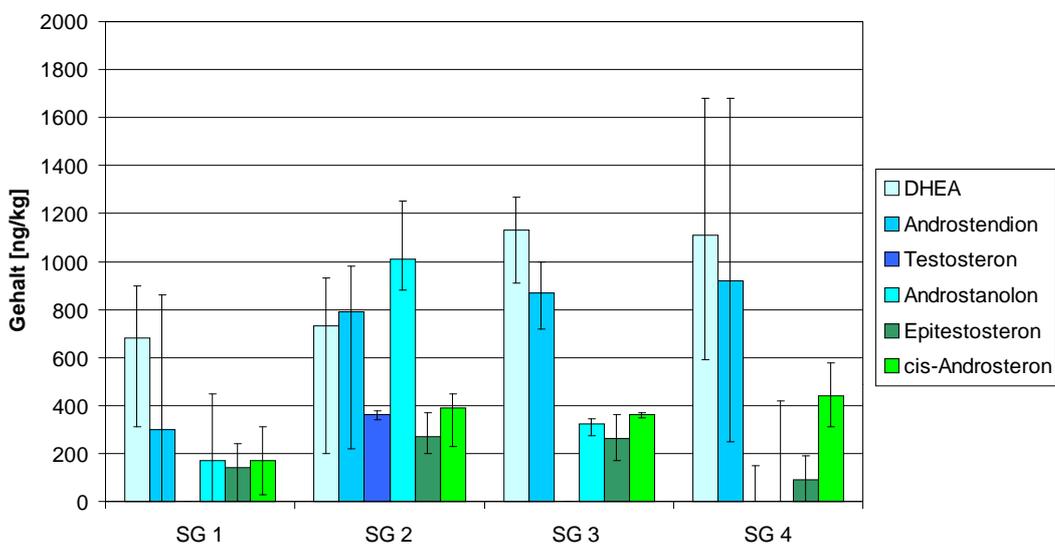
Die COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1989) gibt ebenfalls Progesterongehalte für Rinderfettgewebe an, um eine Differenzierung von behandelten und unbehandelten Rindern zu ermöglichen. Der von der COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1989) angegebene Progesterongehalt für das Fettgewebe von unbehandelten Ochsen wurde von KUSHINSKY (1983) ermittelt. Da die Progesterongehalte von Geweben trächtiger Kühe die höchsten innerhalb aller Rindergewebe darstellen und trächtige Kühe auch zum Zweck der menschlichen Ernährung geschlachtet werden dürfen, müssen diese Gehalte für die Festlegung von Höchstwerten herangezogen werden (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1989) (siehe 7.1.2). Dieser Höchstwert wurde unter Einbeziehung der dreifachen Standardabweichung auf 700.000 ng/kg festgelegt. Damit wäre aufgrund der Untersuchung des Fettgewebes keiner der hier untersuchten Ochsen als behandelt eingestuft worden. In Anbetracht des Faktors 350, der zwischen den höchsten ermittelten Progesterongehalten und der vorgeschlagenen Höchstgrenze liegt, ist fraglich, ob es überhaupt möglich ist, Ochsen, die mit Progesteron unter Einhaltung der vom Hersteller angegebenen Implantationsverfahren behandelt wurden, als solche zu identifizieren.

Mit dem von der COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1989) angegebene Grenzgehalt kann also Fleisch von Rindern, die mit Synovex-S behandelt wurden, im allgemeinen nicht als solches erkannt werden. Mit Hilfe dieses Gehaltes können allenfalls falsche Anwendungen von Implantaten aufgedeckt werden, falls zufällig die Implantationsstelle analysiert wird.

Androgene, deren Vorstufen und Metaboliten

In **Abbildung 24** sind die Mediane der Gehalte der Androgene, ihrer Vorstufen und Metaboliten sowie die Schwankungsbreiten der einzelnen Steroide dargestellt. Das obere

unbehandelte Ochs:
Mediane der Androgengehalte im Fettgewebe



Synovex-S Ochs:
Mediane der Androgengehalte im Fettgewebe

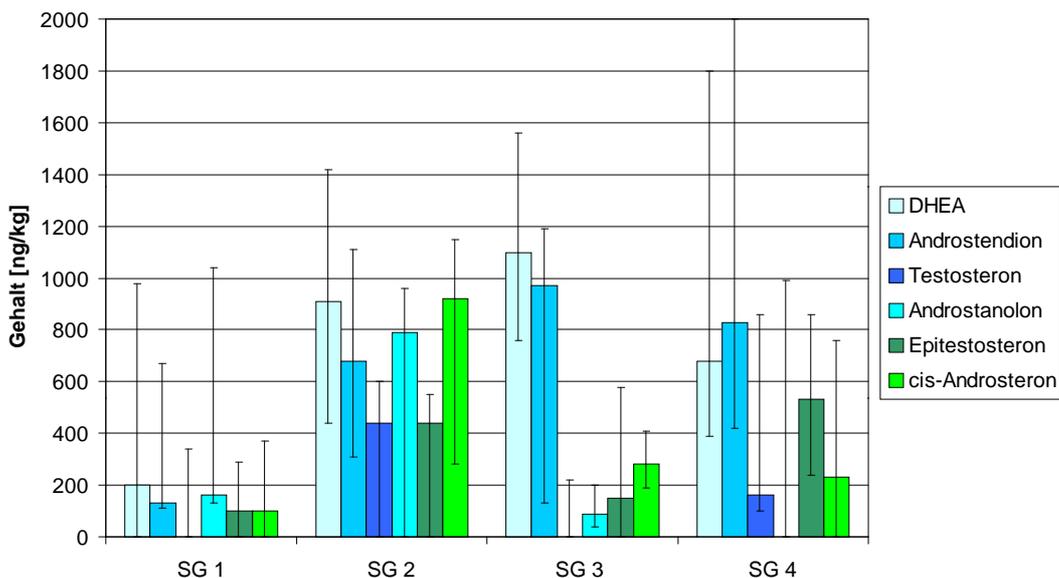


Abbildung 24 – Mediane der Androgengehalte im Fettgewebe

Diagramm zeigt die Mediane der Gehalte im Fettgewebe der unbehandelten, das untere die der behandelten Ochs.

Die Androgengehalte der mit Synovex-S behandelten Ochs waren im Fettgewebe ebenso wie im Muskelgewebe nicht gegenüber denen der unbehandelten Ochs erhöht. Dies deutet darauf hin, daß das durch das Implantat zugeführte Progesteron nicht als Vorstufe für die Androgensynthese im Gewebe dient (siehe 7.1.2). Auch die

Steroidhormonmuster der behandelten und unbehandelten Ochsen einer Schlachtgruppe unterschieden sich kaum.

Die am stärksten vertretenen Steroide waren DHEA und Androstendion. Da die Androgenproduktion bei Kastraten nur in der Nebennierenrinde stattfindet, ist das von diesem Organ hauptsächlich sezernierte Steroid DHEA auch im Fettgewebe der untersuchten Ochsen das dominierende Androgen (EBELING & KOIVISTO, 1994). In ähnlich hohen Gehalten liegt Androstendion, das Folgeprodukt des DHEA im Metabolismus, vor. Androstendion kann im Fettgewebe weiblicher Säugetiere zu Estron aromatisiert (CARR, 1998) werden. Da auch im Fettgewebe männlicher Rinder Estrogene vorliegen (MEYER et al., 1985b), kann eine Aromatisierung auch bei männlichen Individuen möglich sein.

GAIANI & CHIESA (1986) untersuchten Androstendiongehalte in Fett- und Muskelgewebe von Kälbern, Bullen und Färsen. In allen untersuchten Kategorien lagen die höchsten Androstendiongehalte im Fettgewebe vor. Bei männlichen Rindern wurden dabei Gehalte bis zu 17450 ng/kg ermittelt, bei den weiblichen Gehalte bis zu 2562 ng/kg. Damit übersteigen selbst die von GAIANI & CHIESA (1986) bei weiblichen Rindern ermittelten Gehalte von Androstendion im Fettgewebe die hier ermittelten. Der höchste Androstendiongehalt im Fettgewebe der untersuchten Ochsen war 2000 ng/kg. Dies kann allerdings darauf zurückzuführen sein, daß es sich bei dem untersuchten Fettgewebe um Auflagefett handelte, während GAIANI & CHIESA (1986) Nierenfettgewebe untersuchten. Nierenfettgewebe könnte aufgrund seiner Nähe zur Nebennierenrinde höhere Androgengehalte enthalten als Auflagefett der Rückenmuskulatur.

Des weiteren wurde von GAIANI & CHIESA (1986) der Testosterongehalt im Fettgewebe ermittelt. Die Testosterongehalte im Fettgewebe der weiblichen Rinder waren dabei fast um den Faktor 10 kleiner als die der männlichen Tiere. Das Fettgewebe der Färsen enthielt 607 ng/kg Testosteron und das der Bullen 5263 ng/kg. Die ermittelten Testosterongehalte des Fettgewebes der hier untersuchten Ochsen waren sehr gering. Bei der Hälfte der Ochsen war kein Testosteron im Gewebe nachweisbar, der höchste ermittelte Gehalt betrug 860 ng/kg.

Auch Androstanolon war nur in sehr geringen Mengen im Fettgewebe nachweisbar. Der höchste nachgewiesene Gehalt betrug 1250 ng/kg. Androstanolon konnte nicht bei allen Ochsen im Fettgewebe nachgewiesen werden. Die geringen Gehalte der androgenen Wirkformen Androstanolon und Testosteron im Fettgewebe sind wahrscheinlich dadurch erklärbar, daß Fettgewebe kein Zielgewebe für Androgene darstellt und die Androgenproduktion von Ochsen relativ gering ist.

Die Metaboliten cis-Androsteron und Epitestosteron lagen in allen Schlachtgruppen bei behandelten und unbehandelten Ochsen in geringen Gehalten im Fettgewebe vor. Ihr Vorkommen in Rinderfettgewebe wurde bislang nicht untersucht.

7.2.1 Statistische Betrachtung - Unterscheidung von behandelten und unbehandelten Ochsen durch Untersuchung des Fettgewebes

Um festzustellen, ob statistische Unterschiede zwischen den Steroidgehalten der Fettgewebe der unbehandelten und der mit Synovex-S behandelten Ochsen einer Schlachtgruppe bestehen, wurde ein Kruskal-Wallis-Test für die einzelnen Steroide durchgeführt (siehe 4.4 und 7.1.5). In **Tabelle 14** sind die Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 14 – Kruskal-Wallis-Test zum Nachweis von Unterschieden zwischen unbehandelten und mit Synovex-S behandelten Ochs en im Fettgewebe

Pregnenolon	Prüfgröße $H > \chi^2$	Signifikanzniveau p	Verhältnis*
SG 2	4,1 > 3,8	0,950	ub < b
SG 4	5,3 > 3,8	0,950	b < ub
Progesteron			
SG 1	4,1 > 3,8	0,950	ub < b
SG 2	3,0 > 2,7	0,900	ub < b
SG 3	5,3 > 5,2	0,975	ub < b
Androstanolon			
SG 2	3,0 > 2,7	0,900	b < ub
SG 3	5,3 > 5,2	0,975	b < ub
Epitestosteron			
SG 4	5,3 > 5,2	0,975	ub < b

*Verhältnis der Steroidgehalte der behandelten (b) zu den unbehandelten (ub) Ochs en

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % läßt sich sagen, daß die Pregnenolongehalte der behandelten und unbehandelten Ochs en der SG 2 nicht einer Grundgesamtheit entstammen. Dabei sind die Gehalte in den Fettgeweben der behandelten Ochs en gegenüber den unbehandelten erhöht. In SG 1 und SG 3 läßt sich mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests kein Unterschied in den Pregnenolongehalten der behandelten und unbehandelten Ochs en feststellen. In SG 4 läßt sich wiederum ein Unterschied statistisch belegen. Hier sind die Gehalte des Fettgewebes der behandelten Ochs en geringer als die der unbehandelten. Diese Tatsache kann möglicherweise auf die Überschreitung der maximalen Wirkzeit des Implantates zurückgeführt werden.

Die an den Medianen der Progesterongehalte erkennbare Erhöhung der Progesterongehalte im Fettgewebe der behandelten Ochs en läßt sich auch mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests statistisch belegen. In SG 1 und SG 3 ist die Erhöhung mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % bzw. 2,5% gegeben. In SG 2 ist der Progesterongehalt der mit Synovex-S behandelten Ochs en mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % gegenüber den unbehandelten Ochs en erhöht.

Die Androstanolongehalte in den Fettgeweben der behandelten Ochs en sind niedriger als in denen der unbehandelten. Dies ist in SG 2 und SG 3 der Fall, wird aber in SG 3 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2,5 % deutlicher als in SG 2.

In SG 4 zeigt sich ein statistisch belegbarer Unterschied in den Epitestosterongehalten im Fettgewebe der behandelten und unbehandelten Ochs en. Mit 2,5 % Irrtumswahrscheinlichkeit liegen in den Fettgeweben der unbehandelten Ochs en geringere Progesterongehalte vor.

Zwar sind die genannten Unterschiede in den Steroidgehalten im Fettgewebe der behandelten und unbehandelten Ochs en in einzelnen Schlachtgruppen erkennbar, doch läßt sich anhand keines Steroids ein Unterschied in allen untersuchten Schlachtgruppen mit geringer Irrtumswahrscheinlichkeit statistisch feststellen.

7.2.2 Statistische Betrachtungen – Korrelationen zwischen Steroidgehalten des Fettgewebes und Schlachtgewicht

Aufgrund der möglichen Funktion des Fettgewebes als Steroidspeicher ist ein Zusammenhang zwischen Steroidgehalten des Fettgewebes und dem Alter der Tiere denkbar. Da das konkrete Alter der einzelnen Ochsen unbekannt ist, soll eine Korrelation mit dem Ausschlachtgewicht durchgeführt werden. Ermittelt wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho für nicht normalverteilte Variable anhand der Ränge. Die Korrelationskoeffizienten sind in **Tabelle 15** angegeben.

Tabelle 15 – Korrelation von Steroidgehalten des Fettgewebes und Ausschlachtgewicht

<i>Steroid</i>	unbehandelte Ochsen	Synovex-S behandelte Ochsen
	<i>SG^b</i> (r)	<i>SG^b</i> (r)
<i>Pregnenolon</i>	0,680**	-0,324
<i>Progesteron</i>	-0,182	-0,400
<i>DHEA</i>	0,682**	0,503*
<i>Androstendion</i>	0,409	0,614*
<i>Testosteron</i>	0,304	0,273
<i>Androstanolon</i>	-0,214	-0,440
<i>Epitestosteron</i>	-0,031	0,427
<i>cis-Androsteron</i>	0,591*	0,171

^b Ausschlachtgewicht * p < 0,05 (2-seitig) ** p < 0,01 (2-seitig) r Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho

Eine stark positive Korrelation besteht zwischen den Parametern Ausschlachtgewicht und Pregnenolongehalt sowie Ausschlachtgewicht und DHEA-Gehalt bei den unbehandelten Ochsen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %. Der positive Zusammenhang zwischen Ausschlachtgewicht und DHEA-Gehalt besteht ebenso mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %, wenn auch nicht so stark bei den behandelten Ochsen. Allerdings tritt ein sehr schwacher negativer Zusammenhang zwischen Ausschlachtgewicht und Pregnenolongehalt bei den behandelten Ochsen auf. Dies könnte auf die Abnahme des Pregnenolongehaltes in SG 4 zurückzuführen sein.

Zwischen dem Ausschlachtgewicht und Progesteron besteht weder bei den behandelten noch bei den unbehandelten Ochsen ein signifikanter linearer Zusammenhang. Das gleiche ist für Testosteron, Androstanolon und Epitestosteron der Fall.

Der Androstendiongehalt zeigt einen starken positiven linearen Zusammenhang auf einem Signifikanzniveau von 0,05 mit dem Ausschlachtgewicht bei den behandelten Ochsen. Ein Korrelationskoeffizient von 0,409, der auf einen schwachen positiven linearen Zusammenhang hindeutet, tritt auch bei den unbehandelten Ochsen auf. Allerdings besteht keine Signifikanz auf einem Niveau von 0,05.

Bei den unbehandelten Ochsen scheint ein positiver, auf einem Niveau von 0,05 signifikanter linearer Zusammenhang zwischen Ausschlachtgewicht und cis-Androsteron zu bestehen. Bei den behandelten Ochsen tritt keine Korrelation auf.

Da nicht nur die Parameter „Steroidgehalt“ und „Ausschlachtgewicht“ einander beeinflussen, ist die physiologische Deutung der Korrelationskoeffizienten nicht in allen Fällen möglich.

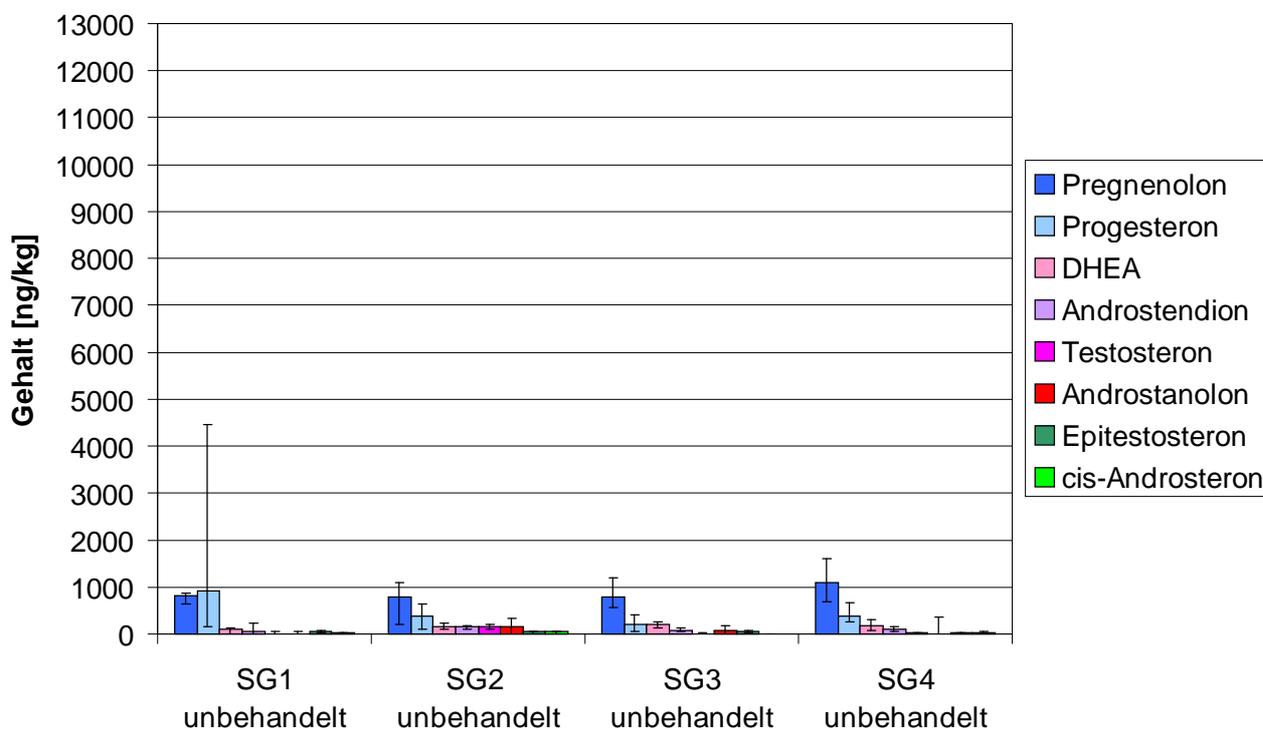
7.3 Vergleich der Steroidgehalte von Muskel- und Fettgewebe

Steroidhormonmuster wurden bisher fast ausschließlich in Muskelgewebe von Rindern bestimmt (HARTWIG et al., 1995; HARTMANN & STEINHART, 1997a; FRITSCHKE et al., 1998a; FRITSCHKE et al., 1998b; FRITSCHKE et al., 1999), bis auf wenige Arbeiten die sich unter anderem mit den Steroidhormonmustern in Rinderplasma beschäftigen (SCIPPO et al., 1994). Die Gehalte einzelner Steroide in Fettgewebe wurden schon häufig ermittelt (GAIANI & CHIESA, 1986; FRANK et al., 1983; HENRICKS et al., 1983), es fand aber noch keine Bestimmung von Steroidhormonmustern in Fettgewebe statt.

Vergleicht man die ermittelten Steroidhormonmuster der Muskel- und Fettgewebe der Synovex-S behandelten und unbehandelten Ochsen, so ergibt sich das in **Abbildung 25** und **26** dargestellte Bild. Die Säulen stellen die Mediane der Steroidgehalte der jeweiligen Gruppe dar, die Striche über den Säulen symbolisieren die Schwankungsbreiten. Auffällig ist die starke Erhöhung der Steroidgehalte im Fettgewebe. Besonders stark erhöht waren die Gehalte von Pregnenolon im Fettgewebe gegenüber dem Muskelgewebe. Es tritt ein Faktor von 2,6 bis 35 zwischen den Pregnenolongehalten von Muskel- und Fettgewebe bei den unbehandelten Ochsen auf und ein Faktor zwischen 1,2 und 17 bei den behandelten. Die unbehandelten Ochsen neigen also zu einer stärkeren Akkumulation von Pregnenolon im Fettgewebe als die behandelten. Es fand keine verstärkte Akkumulation in einer bestimmten Schlachtgruppe statt. Die Progesterongehalte wiesen Faktoren von 0,4 bis 37 zwischen den Muskel- und Fettgewebe der unbehandelten Ochsen auf, während die behandelten Ochsen Faktoren zwischen 1,2 und 18 zeigten. Wiederum bestehen keine Unterschiede zwischen den Schlachtgruppen.

Von einigen Autoren wurden bereits Gehalte einzelner Steroide in Muskel und Fettgewebe von Rindern ermittelt und diese miteinander verglichen. Bei männlichen Mastkälbern waren die Gesamtöstrogengehalte im Fettgewebe gegenüber dem Muskelgewebe um den Faktor 6 erhöht (MEYER et al., 1985b). Trenbolon wurde bei Ochsen nach einer Behandlung in bis zu fünfmal größeren Gehalten in Fettgewebe nachgewiesen (HOFFMANN & EVERS, 1986). HOFFMANN & RATTENBERGER (1977) zeigten, daß Färsen eine ungefähr doppelt so hohe Konzentration von Testosteron im Fettgewebe wie im Muskelgewebe aufweisen, während bei Bullen ein 14fach erhöhter Gehalt im Fettgewebe ermittelt wurde. GAIANI & CHIESA (1986) berichten von Androstendiongehalten, die bei männlichen Kälbern um den Faktor 40 und bei Bullen um den Faktor 28 in Nierenfett gegenüber Muskelgewebe erhöht waren, während die Faktoren für weibliche Kälber bei 11 und für Färsen bei 20 lagen. Ein ähnliches Verhältnis zeigten die Faktoren zwischen Muskel- und Nierenfettgewebe für Testosteron. Die Testosterongehalte waren dabei im Fettgewebe weniger stark erhöht als die Androstendiongehalten. Die Faktoren zwischen Muskel- und Fettgewebe lagen für männliche Kälber bei 21, für Bullen bei 7 und für weibliche Kälber und Färsen bei 6 und 9. Die hier in den Geweben dieses Tierversuchs untersuchten Androgene lagen in vielen Fällen nur im Fettgewebe in nennenswerten Mengen vor, oft waren sie aber auch nicht im Fettgewebe nachweisbar.

Muskel: unbehandelte Ochsen



Fettgewebe: unbehandelte Ochsen

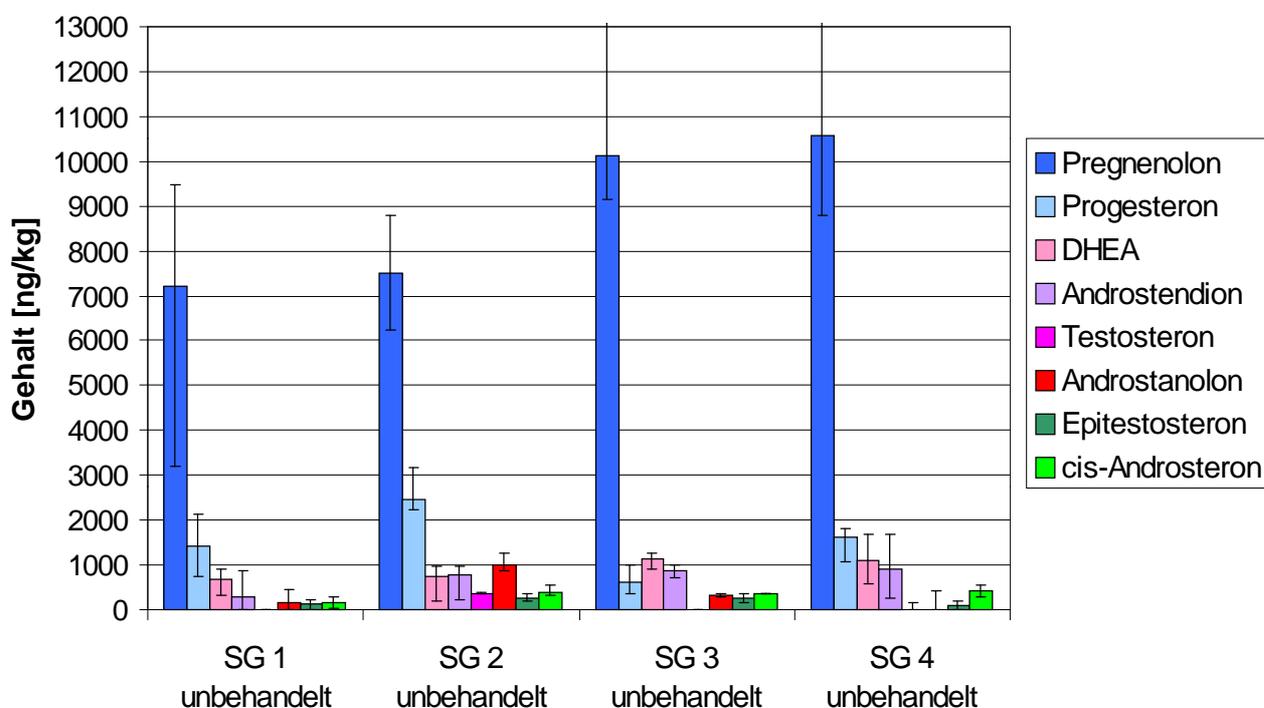
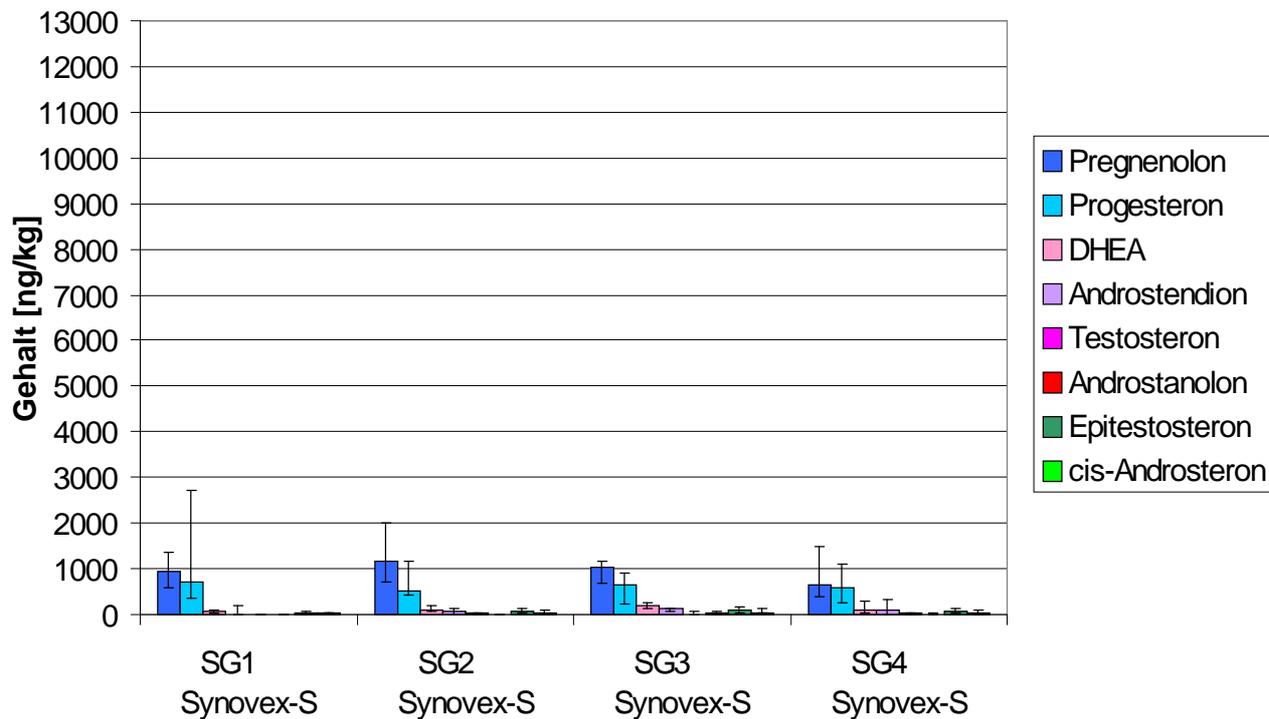


Abbildung 25 – Vergleich der Steroidhormonmuster des Muskel- und Fettgewebes der unbehandelten Ochsen

Muskel: Synovex-S behandelte Ochs



Fettgewebe: Synovex-S behandelte Ochs

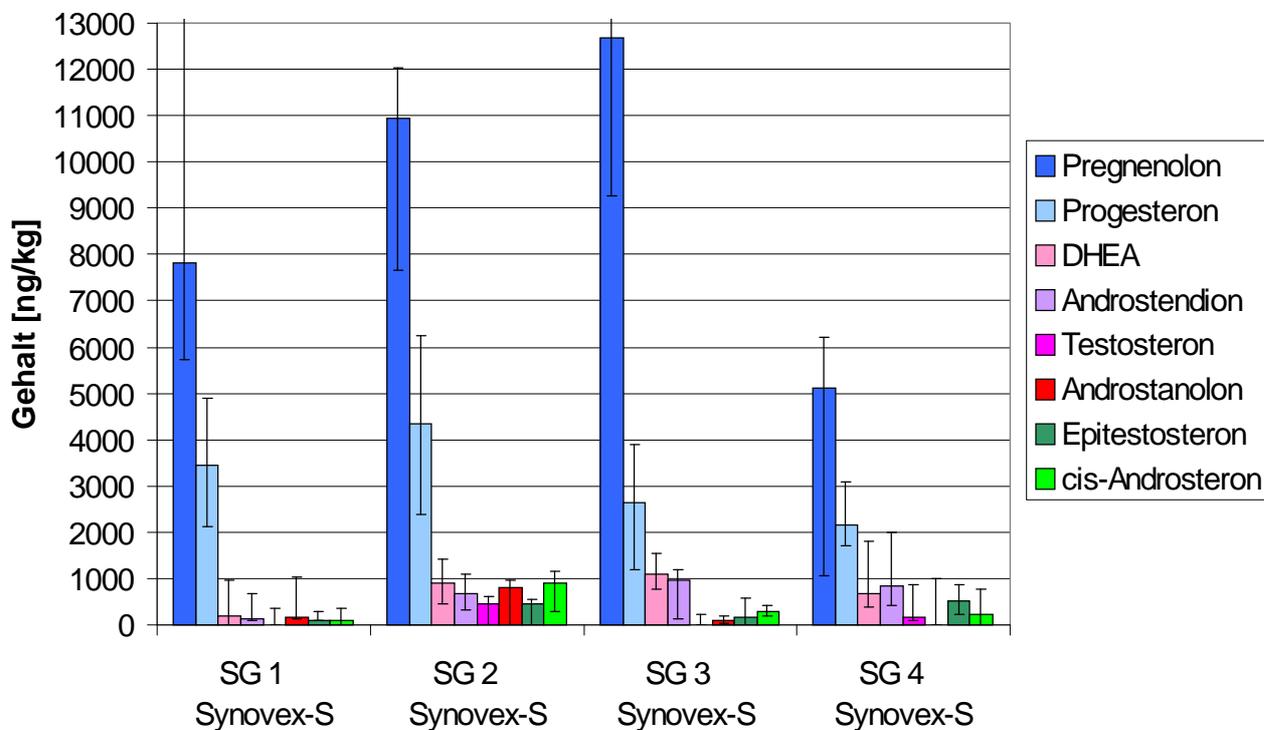


Abbildung 26 – Vergleich der Steroidhormonmuster von Muskel- und Fettgewebe der Synovex-S behandelten Ochs

Es fand also nicht in allen Fällen eine Anreicherung im Fettgewebe statt. In einigen Fällen waren die Gehalte im Fettgewebe bis zu einem Faktor von 36 gegenüber dem Muskelgewebe erhöht.

Es läßt sich hinsichtlich der Größe der Faktoren zwischen Muskel- und Fettgewebe weder ein Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Ochsen noch zwischen den Schlachtgruppen feststellen.

Um festzustellen, ob eine unselektive, ungerichtete Akkumulation im Fettgewebe stattfindet, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Ist dies der Fall, so werden die Steroide, die die höchsten Gehalte im Muskelgewebe zeigen auch am stärksten im Fettgewebe vorliegen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 16** dargestellt. Es könnte dann einen linearen Zusammenhang zwischen den Steroidgehalten der Gewebetypen geben. Ermittelt wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho. Geprüft wurde auf 2-seitige Signifikanz. Hierfür werden die Steroidgehalte des polaren Extraktes des Muskelgewebes herangezogen, da diese, ebenso wie die Steroidgehalte des Fettgewebes, von den Ochsen aller Schlachtgruppen ermittelt wurden.

Tabelle 16 – Korrelation von Steroidgehalten des Fettgewebes und Steroidgehalten des polaren Extraktes des Muskelgewebes der unbehandelten Ochsen

Steroid	Korrelationskoeffizient
<i>Pregnenolon</i>	0,358
<i>Progesteron</i>	0,241
<i>DHEA</i>	0,358
<i>Androstendion</i>	0,398
<i>Testosteron</i>	-0,065
<i>Androstanolon</i>	-0,317
<i>Epitestosteron</i>	0,304
<i>cis-Androsteron</i>	0,189

Erstaunlich ist, daß keiner der Steroidgehalte des polaren Extraktes des Muskelgewebes nennenswert mit den Steroidgehalten des Fettgewebes korreliert. Es besteht zwischen den Variablen kein signifikanter linearer Zusammenhang ($p < 0,05$). Das weist darauf hin, daß kein ungerichteter Austausch der Steroide zwischen Muskel- und Fettgewebe stattfindet, so daß Steroide, die in größeren Mengen im Muskelgewebe vorliegen, diese Erhöhung auch im Fettgewebe zeigen. In diesem Fall müßten sich die Steroidgehalte des Muskelgewebes in denen des Fettgewebes widerspiegeln. Es wäre also möglich, daß Steroide gezielt zwischen Muskel- und Fettgewebe ausgetauscht werden und dabei eine Steuerung erfolgt. Diese scheint dann individuell unterschiedlich zu sein.

7.4 Einfluß der Synovex-S Behandlung auf die Steroidhormonmuster und -gehalte von Muskel und Fettgewebe

Die Steroidhormonmuster der behandelten Ochsen sind weder im Muskel- noch im Fettgewebe wesentlich gegenüber denen der unbehandelten Ochsen verändert. Zwar treten leichte Erhöhungen des Pregnenolon- und Progesterongehaltes sowohl im Muskel- als auch im Fettgewebe der behandelten Ochsen auf, diese sind aber nur im Fettgewebe statistisch nachweisbar. Anhand der ermittelten Daten wäre keine Zuordnung eines Ochsen, von dem nicht bekannt ist, ob er mit Synovex-S behandelt wurde, zu der behandelten oder der unbehandelten Gruppe möglich. Offensichtlich beeinflusst die Behandlung den natürlichen Steroidmetabolismus kaum.

Dies zeigt, daß die Anwendung von Synovex-S bei bestimmungsgemäßem Gebrauch keine Gefahren für die Konsumenten von Rindfleisch verursacht. Die bei diesem Versuch eingehaltene Frist von etwa 42 Tagen zwischen Implantation von Synovex-S und Schlachtung ist relativ kurz gewählt, so daß das Implantat noch die größten möglichen Steroidmengen freisetzt. Beschrieben werden Fristen zwischen 60 und 150 Tagen zwischen Implantation und Schlachtung (HEINRITZI, 1974; KUSHINSKY, 1983; LONE, 1997). Durch die Verabreichung von drei Implantaten ist davon auszugehen, daß die Ochsen relativ hohen Steroiddosen ausgesetzt waren. In vielen Fällen werden Steroid-Implantate erst zum „Finishing“ der Ochsen eingesetzt. Das bedeutet, daß sie die Steroid-Implantate erst in der Endphase der Mast vor der Schlachtung erhalten. Die hier untersuchten Ochsen wurden schon relativ jung einer Steroidbehandlung ausgesetzt, die sich bis kurz vor die Schlachtung hinzog. Selbst bei diesen untersuchten Ochsen, die aus den genannten Gründen relativ hohen Steroiddosen ausgesetzt waren, konnte keine wesentliche Beeinflussung des Steroidhormonhaushaltes beobachtet werden. Aus diesem Grund ist nicht davon auszugehen, daß Synovex-S behandelte Ochsen anderer Implantationsfristen höhere Steroidgehalte im Gewebe aufweisen. Problematisch könnte sich der Verbleib von Implantationsstellen, die nicht bei der Schlachtung von den anderen verwertbaren Schlachtkörperbestandteilen abgetrennt werden, auswirken. Diese enthalten sehr große Steroidmengen, die dann Fleischverarbeitungsprodukte kontaminieren können (DAXENBERGER et al., 2000).

Nicht bestimmt wurden die Estrogengehalte der Gewebe. Da 17β -Estradiol in dem verabreichten Synovex-S Implantat vorhanden war, könnte eine Anreicherung dieses Steroids oder seiner Metaboliten in den Geweben auftreten. Einige der Gewebeproben wurden auf das Vorliegen von Estrogenen untersucht, diese waren aber mit den eingesetzten Methoden nicht nachweisbar. Der negative Nachweis von Estrogenen deckt sich mit Literaturangaben. Des öfteren wurde von Estrogengehalten in den Geweben männlicher Rinder berichtet, die unterhalb der Grenze des praktischen Arbeitsbereiches des hier angewendeten Verfahren lagen (FRITSCHKE et al., 1999; LONE, 1997). Daraufhin wurden keine weiteren Estrogenbestimmungen durchgeführt. Es liegen also Estron in Gehalten unter 20 ng/kg, 17β -Estradiol und 17α -Estradiol unter 40 ng/kg und Estriol unter 60 ng/kg im Muskelgewebe vor (HARTMANN & STEINHART, 1997a). Im Fettgewebe ist davon auszugehen, daß die Estrogene in Gehalten unter 100 ng/kg vorliegen. Die COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1989) gibt einen Gehalt von 1300 ng/kg Estron im Muskelgewebe und 9000 ng/kg im Fettgewebe als Richtwert für die Behandlung von Rindern mit Estrogenen an. Estrogengehalte dieser Größenordnung wären bei den durchgeführten Untersuchungen erkannt worden.

Die genannten Ergebnisse lassen darauf schließen, daß aus wissenschaftlicher Sicht mit der Argumentation einer möglichen Gesundheitsgefährdung der Verbraucher kein Grund für die EU vorliegt, die Einfuhr von Fleisch mit Synovex-S behandelte Rinder aus den USA zu verbieten. Bei bestimmungsgemäßer Anwendung von Implantaten zur Verabreichung natürlich vorkommender Steroide sind keine höheren Steroidexpositionen durch den Verzehr von Rindfleisch zu erwarten als durch den Verzehr von Fleisch unbehandelter Rinder.

8 Zusammenfassung

8.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Steroidhormonmuster und –gehalte des Muskel- und Fettgewebes von Ochsen, die mit dem in den USA zugelassenen Präparat Synovex-S behandelt wurden, mittels GC-MSD untersucht. Ziel war es festzustellen, ob diese Behandlung mit dem Anabolikaimplantat Änderungen im Steroidhormonmuster und -gehalt der Gewebe im Vergleich zu Kontrolltieren hervorruft. Hierzu wurden nicht nur die Steroidhormonmuster und –gehalte der ungebunden vorliegenden Steroide untersucht sondern ebenso die der Steroidfettsäureester.

Hierzu wurde zunächst eine Methode für die Extraktion und Bestimmung von Steroidfettsäureestern in Muskelgewebe entwickelt. Die unpolare Extraktion wurde in Anschluß an die polare Extraktion mit Methanol/Wasser zur Erfassung der ungebundenen Steroide mit Ethylacetat und *n*-Hexan durchgeführt. Die Bestimmung der Steroidfettsäureester erfolgte nach deren Hydrolyse als ungebundene Steroide. Zur Freisetzung der Steroide aus den Estern wurde die Umesterung eingesetzt. Die weitere Reinigung des Probenextraktes erfolgte über flüssig-flüssig-Extraktion und Festphasenextraktion. Steroidfettsäureester liegen, wenn überhaupt, nur in sehr geringen Gehalten im Muskelgewebe vor. Es stellte sich jedoch heraus, daß durch polare Extraktion keine vollständige Extraktion der ungebundenen Steroide aus dem Muskelgewebe möglich ist. Durch Extraktion mit unpolaren Lösungsmitteln (Ethylacetat/*n*-Hexan) im Anschluß an die polare Extraktion konnte nochmals eine vergleichbare Steroidmenge extrahiert werden. Die Steroidhormonmuster des polaren und des unpolaren Extraktes unterschieden sich kaum. Die durch polare Extraktion ermittelten Steroidhormongehalte stellen also nur ca. 50 % des extrahierbaren Steroidhormongehaltes dar.

Für die Bestimmung von Steroidhormonmustern in Fettgewebe wurde eine Methode entwickelt, die auf der Abtrennung von Steroiden und Steroidfettsäureestern mit Hilfe der Säulenchromatographie an Kieselgel basiert. Die Proben wurden nach dem Auslassen des Fettgewebes in der Mikrowelle mit *n*-Hexan und Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wurde über eine Kieselgelsäule gegeben und die Fraktion der Steroidfettsäureester einer Umesterung unterworfen. Die Fraktionen wurden über mehrere Schritte der Festphasen- und flüssig-flüssig-Extraktion gereinigt. Es konnten, wie auch in Muskelgewebe, keine signifikanten Mengen an im Steroidfettsäureestern in Fettgewebe nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung von Muskelgewebe aus einem vorliegenden Tierversuch konnten keine wesentlichen Unterschiede in den Steroidhormonmustern und –gehalten zwischen behandelten und unbehandelten Ochsen festgestellt werden. In den polaren Extrakten des Muskelgewebes der mit Synovex-S behandelten Ochsen war eine schwache, wenngleich auch statistisch nicht nachweisbare Erhöhung des Pregnenolon- und Progesterongehaltes zu verzeichnen. Während die Erhöhung des Progesterongehaltes auf die Freisetzung von Progesteron aus dem Implantat zurückgeführt werden kann, ist unklar, wie es zu einer Erhöhung des Pregnenolongehaltes kommen kann. Möglich ist ein Rückkopplungseffekt, bei dem durch Verabreichung von Progesteron die Vorstufe Pregnenolon verstärkt gebildet wird. Eine Erhöhung des Pregnenolon- und

Progesterongehaltes war in den unpolaren Extrakten hingegen nicht erkennbar. Ebenso konnten keine Unterschiede in den Mustern und Gehalten der Androgene und Corticoide sowohl im polaren als auch im unpolaren Extrakt der behandelten und unbehandelten Ochsen festgestellt werden.

Die festgestellte Erhöhung des Pregnenolon- und Progesterongehaltes im Muskelgewebe der behandelten Ochsen lag bei diesen auch im Fettgewebe vor. Bei einigen Schlachtgruppen traten statistisch signifikante Unterschiede auf. Da die Gehalte aller Steroide jedoch starken individuellen physiologischen Schwankungen unterworfen waren, war keine Differenzierung zwischen behandelten und unbehandelten Ochsen auf Basis der Steroidhormongehalte oder -muster des Fettgewebes möglich.

Bei Vergleich der Steroidhormonmuster und -gehalte des Muskelgewebes mit denen des Fettgewebes wurde festgestellt, daß die Steroidhormongehalte im Fettgewebe stark erhöht sind. Es treten Faktoren bis zu etwa 40 zwischen den einzelnen Steroidhormongehalten des Muskel- und Fettgewebes auf. Besonders stark erhöht sind die Pregnenolongehalte im Fettgewebe gegenüber dem Muskelgewebe. Die Steroidhormonmuster in Muskel- und Fettgewebe waren vergleichbar.

Anhand der ermittelten Steroidmuster und -gehalte konnte keine Differenzierung von behandelten und unbehandelten Ochsen vorgenommen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß das von der EU ausgesprochene Importverbot von Rindfleisch aus den USA aufgrund der aufgeführten gesundheitlichen Risiken für den Verbraucher im Falle der Anwendung von Synovex-S Implantaten in der Rindermast nicht haltbar ist.

8.2 Summary

Steroid hormone patterns and contents of beef and adipose tissue from steers treated with Synovex-S were determined by GC-MSD. Synovex-S treatment of steers is allowed in the USA but forbidden in the EU just as the import of beef from treated steers. The aim of this study was the comparison of steroid hormone patterns and contents of tissues from treated and untreated steers and the determination of a possible influence of the treatment on natural steroid hormone patterns. Steroid fatty acid esters as storage derivatives of steroids were included in the investigations.

A method for the extraction of steroid fatty acid esters from beef was developed. Steroids were extracted with methanol/water followed by the extraction of steroid fatty acid esters with ethylacetate and n-hexane, an unpolar extraction step. Steroid fatty acid esters were determined after hydrolysis as free steroids. Transesterification was used to hydrolyse steroid fatty acids. Samples were cleaned up by liquid-liquid extraction and solid phase extraction. No steroid fatty acid esters but free steroids were determined in the unpolar beef extract. The steroid content and pattern of the non polar extract was comparable with the content and pattern of the polar extract. With polar solvents only about 50 % of steroids were extracted from beef.

The determination of free and esterified steroids from adipose tissue based on a separation using a silica column. Fatty samples were melted by microwaves, diluted in n-hexane and ethylacetate and applied to the column. Free steroids were separated from their fatty acid esters by an elution step. The fraction containing steroid fatty acid esters

was transesterificated. Further clean up was carried out by liquid-liquid and solid phase extraction. No significant amounts of steroid fatty acid esters were detected in adipose tissue.

No considerable differences between steroid hormone patterns of Synovex-S treated and untreated steers were determined. The polar extracts of beef from treated steers showed slightly higher progesterone and pregnenolone contents. However, statistical proof for differences in progesterone and pregnenolone contents between treated and untreated cattle was not possible. Higher progesterone contents in beef from treated steers may be due to the progesterone release of the implant. A possible reason for higher pregnenolone contents is a feedback mechanism which causes the formation of pregnenolone as a result of progesterone treatment. No higher contents of progesterone and pregnenolone were determined in non polar extracts from beef. Furthermore, beef from treated and untreated steers showed no differences in androgen, gestagen and corticoid contents and patterns.

Just as in beef, pregnenolone and progesterone contents were higher in adipose tissue of treated steers. In contrast to beef, significant statistical differences were determined. However, a differentiation of treated and untreated cattle by means of steroid contents or patterns was not possible because of high individual differences in steroid synthesis.

Steroid contents of adipose tissue were higher compared to beef. Single steroids had factors up to 40 between muscle and adipose tissue. Pregnenolone and progesterone dominated in adipose tissue. Steroid hormone patterns of beef and adipose tissue were comparable.

Synovex-S treated and untreated steers cannot be distinguished by means of steroid hormone patterns and contents. Therefore, a potential health risk for the consumer associated with beef from treated steers is no reason to maintain the ban of US beef by the EU.

9 Anhang

9.1 Schlachtgewichte der Ochsen

9.1.1 Lebendgewicht am Anfang des Versuchs und am Schlachttag

Schlachtgruppe 1	Startgewicht x [kg]	s [kg]	Schlachtgewicht x [kg]	s [kg]
unbehandelte Ochsen	297,0	13,4	351,9	11,6
Synovex-S Ochsen	297,6	13,7	371,8	14,9
Schlachtgruppe 2				
unbehandelte Ochsen	297,0	9,9	45,5	22,5
Synovex-S Ochsen	298,6	10,9	497,7	14,9
Schlachtgruppe 3				
unbehandelte Ochsen	297,8	10,2	506,9	11,8
Synovex-S Ochsen	299,1	7,2	565,3	8,4
Schlachtgruppe 4				
unbehandelte Ochsen	313,8	16,4	586,6	14,7
Synovex-S Ochsen	303,9	11,5	597,2	12,8

x Mittelwert (n = 4) s Standardabweichung

9.1.2 Ausschlachtgewichte

unbehandelte Ochsen [Kennung]	Ausschlachtgewicht [kg]	Synovex-S Ochsen [Kennung]	Ausschlachtgewicht [kg]
Schlachtgruppe 1		Schlachtgruppe 1	
833	204,56	818	222,46
834	207,26	828	226,36
866	218,26	831	189,86
867	192,96	839	225,76
Schlachtgruppe 2		Schlachtgruppe 2	
815	232,46	821	291,46
826	274,76	823	297,36
842	262,96	875	270,16
882	285,76	880	312,96
Schlachtgruppe 3		Schlachtgruppe 3	
822	302,16	816	333,56
825	315,36	817	328,26
863	303,46	864	349,06
879	315,76	873	342,46
Schlachtgruppe 4		Schlachtgruppe 4	
832	368,86	819	343,36
837	335,76	862	346,66
846	331,96	874	384,96
869	334,56	878	352,76

Kennung = Nummer zur Identifizierung der Ochsen

9.2 Standardlösungen

9.2.1 Standardsubstanzen Steroide

Trivialname	systematischer Name	Hersteller
cis-Androsteron	5 α -Androstan-3 α -ol-17-on	Serva Art.-Nr.13620
DHEA	5-Androsten-3 β -ol -17-on	Sigma Art.-Nr.D-4000
Epitestosteron	4-Androsten-17 α -ol-3-on	Sigma Art.-Nr. E-5878
Androstanolon	5 α -Androstan-17 β -ol-3-on	Sigma Art.-Nr. A-8380
Androstendion	4-Androsten-3,17-dion	Serva Art.-Nr. 13600
Testosteron	4-Androsten-17 β -ol-3-on	Serva Art.-Nr. 35800
Pregnenolon	5-Pregnen-3 β -ol-20-on	Sigma Art.-Nr.P-9129
Progesteron	4-Pregnen-3,20-dion	Serva Art.-Nr. 33530
Cortison	4-Pregnen-17 α ,21-diol-3,11,20-trion	Merck Art.-Nr. 8960.0001
Cortisol	4-Pregnen-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dion	Merck Art.-Nr. 24608.0250
17 α -Estradiol	3,17 α -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien	Aldrich Art.-Nr. 28.577-3
17 β -Estradiol	3,17 β -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien	Serva Art.-Nr. 31100
Estron	3-Hydroxy-17-oxo-1,3,5(10)-estratrien	Serva Art.-Nr. 31150
Estriol	3,16 α ,17 β -Trihydroxy-1,3,5(10)-estratrien	Sigma Art.-Nr. E-1253
Methyltestosteron IS*	17 α -Methyltestosteron	Serva Art.-Nr. 29560
Medroxyprogesteron IS*	6 α -Methyl-17 α -Hydroxyprogesteron	Sigma Art.-Nr. 6013

IS* = interner Standard

9.2.2 Standardsubstanzen Steroidfettsäureester

Trivialname	systematischer Name	Hersteller
Cholesteroleat	5-Cholesten-3 β -ol-3-acetat	Sigma Art.-Nr. T-3006
Cortisonacetat	4-Pregnen-17 α ,21-diol-3,11,20-trion	Sigma Art.-Nr.C-3130
Estradiolstearat	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 β -Diol-17-stearat	Steraloids, Inc. L1253
Testosteronbenzoat	4-Androsten-3-on-17 β -benzoat	Sigma Art.-Nr.T-1750
Testosteronenanthat	4-Androsten-3-on-17 β -enanthat	Serva Art.-Nr. 35800

9.2.3 Standardlösungen für Messungen am GC-FID

- Testosteron 10 mg/ 100 mL in Methanol
- 17 β -Estradiol 10 mg/ 100 mL in Methanol
- Cortison 10 mg/ 100 mL in Methanol
- Cholesterol 10 mg/ 100 mL in *n*-Hexan
- Pregnenolon 10 mg/ 100 mL in Methanol
- Progesteron 10 mg/ 100 mL in Methanol
- Methyltestosteron 10 mg/ 100 mL in Methanol

9.2.4 Standardlösungen für die Versuche zur Hydrolyse von Steroidfettsäureestern

- Cholesteroleat 10 mg/ 100 mL in *n*-Hexan
- Estradiolstearat 10 mg/ 100 mL in *n*-Hexan
- Cortisonacetat 10 mg/ 100 mL in Methanol
- Testosteronbenzoat 10 mg/ 100 mL in *n*-Hexan
- Testosteronenathat 10 mg/ 100 mL in *n*-Hexan

9.2.5 Standardlösungen für GC-MS im SIM-Mode

Alle Standardlösungen in Methanol. Eingesetzt wurden die in den letzten Spalten genannten Verdünnungen.

• Androgen/Gestagen/Metaboliten-Mischstandard:

Steroid	Stammlösung	1:6,666 Verdünnung
DHEA	0,90 ng/ μ L	0,1350 ng/ μ L
Androstanolon	1,11 ng/ μ L	0,1665 ng/ μ L
Androstendion	0,99 ng/ μ L	0,1485 ng/ μ L
Testosteron	0,92 ng/ μ L	0,1380 ng/ μ L
Pregnenolon	1,07 ng/ μ L	0,1605 ng/ μ L
Progesteron	0,97 ng/ μ L	0,1455 ng/ μ L
cis-Androsteron	0,98 ng/ μ L	0,1470 ng/ μ L
Epitestosteron	0,35 ng/ μ L	0,0520 ng/ μ L

• Corticoid-Standards:

Steroid	Stammlösung	1:2 Verdünnung
Cortison	1,0 ng/ μ L	0,5000 ng/ μ L
Cortisol	1,0 ng/ μ L	0,5000 ng/ μ L

• Estrogen-Mischstandard:

Steroid	Stammlösung	1:20 Verdünnung
17 α -Estradiol	0,90 ng/ μ L	0,0450 ng/ μ L
17 β -Estradiol	0,92 ng/ μ L	0,0460 ng/ μ L
Estron	0,94 ng/ μ L	0,0470 ng/ μ L
Estriol	0,90 ng/ μ L	0,0450 ng/ μ L

• **Interner Standard für Androgen/Gestagen/Metaboliten-Bestimmung:**

Steroid	Stammlösung	1:2,5 Verdünnung
Methyltestosteron	1,0 ng/μL	0,4 ng/μL

• **Interner Standard für Corticoid-Bestimmung:**

Steroid	Stammlösung	1:2 Verdünnung
Medroxyprogesteron	1,0 ng/μL	0,5 ng/μL

• **Pregnenolon/Progesteron-Lösung für die Bestimmung in Fettgewebe:**

Steroid	Stammlösung	1:10 Verdünnung
Pregnenolon	11,75 ng/μL	1,175 ng/μL
Progesteron	10,00 ng/μL	1,000 ng/μL

9.2.6 Erstellung der Kalibriergeraden

9.2.6.1 Durchführung

An jedem Meßtag wurde die Linearität des Verfahrens mit einer Kalibrierreihe bestehend aus Standardsubstanzen bestimmt. Die Korrelationskoeffizienten größer 0,99 zeigten, daß bei jeder Messung eine Linearität im gemessenen Konzentrationsbereich gegeben war. Die Quantifizierung mit Hilfe der Auswerte-Software erfolgte über den Standard mit der der Probe ähnlichsten Konzentration.

Androgene/Gestagene/Metaboliten

Die Erstellung der Kalibriergeraden für die Messung der Androgenen/Gestagene/Metaboliten erfolgte, indem 20 μL, 40 μL und 80 μL der 1:6,666 Verdünnung der Androgene/Gestagene/Metaboliten-Stammlösung in Spitzgläschen gegeben wurden. Es wurden jeweils 50 μL des Methyltestosteron-Standardlösung zugegeben. Die Lösungen wurden unter Stickstoff getrocknet und mit 40 μL Derivatisierungsreagenz umgesetzt.

Für die Bestimmung der Androgene/Gestagene/Metaboliten in Fettgewebe wurden 20 μL, 40 μL und 80 μL der 1:6,666 Verdünnung der Androgene/Gestagene/Metaboliten-Stammlösung in Spitzgläschen gegeben. Zusätzlich wurden 20 μL, 40 μL und 80 μL der Pregnenolon/Progesteron-Standardlösung zugegeben. Für die Methodvalidierungen wurden weiterhin 160 mL und 320 mL der Standardlösungen eingesetzt. Es wurden 50 μL der Lösung des internen Standards Methyltestosteron zugefügt, die Lösungen unter Stickstoff getrocknet und mit 40 μL Derivatisierungsreagenz derivatisiert.

Corticoide

Die Erstellung der Kalibriergeraden für die Messung der Corticoide erfolgte, indem 20 μL, 40 μL und 80 μL der verdünnten Corticoide-StammLösung in Spitzgläschen gegeben wurden. Es wurden jeweils 50 μL des Medroxyprogesteron-Standardlösung zugegeben. Die Lösungen wurden unter Stickstoff getrocknet und mit 40 μL Derivatisierungsreagenz umgesetzt.

Estrogene

Die Erstellung der Kalibriergeraden für die Messung der Estrogene erfolgte, indem 50 µL, 100 µL und 200 µL der Verdünnung der Estrogene-Stammlösung in Spitzgläschen gegeben wurden. Es wurden jeweils 50 µL des Methyltestosteron-Standardlösung zugegeben. Die Lösungen wurden unter Stickstoff getrocknet und mit 40 µL Derivatisierungsreagenz umgesetzt.

9.2.6.2 Konzentrationen

A Muskelgewebe

Die Angabe der Steroidgehalte erfolgt in ng/2 mL da dieser Gehalt dem auf 1 kg Muskelgewebe bezogenen Gehalt entspricht.

Umrechnung der Standardgehalte in ng/kg Muskelgewebe bei einem Einsatz von 20 g Muskelgewebe:

Standardkonzentration [ng/µL] x Standardvolumen [µL] x 50 = Gehalt im Gewebe (bezogen auf 1 kg)

Standardsubstanz	Kalibrierstandard 1: Gehalt in ng/2mL (ng/kg)	Kalibrierstandard 2: Gehalt in ng/2mL (ng/kg)	Kalibrierstandard 3: Gehalt in ng/2mL (ng/kg)
IS Methyltestosteron	1000,0	1000,0	1000,0
IS Medroxyprogesteron	1250,0	1250,0	1250,0
cis-Androsteron	294,0	588,0	1176,0
DHEA	135,0	270,0	540,0
Epitestosteron	105,0	210,0	420,0
Androstanolon	166,5	333,0	666,0
Androstendion	148,5	297,0	594,0
Testosteron	138,0	276,0	552,0
Pregnenolon	160,5	321,0	642,0
Progesteron	145,5	291,0	582,0
Cortison	500,0	1000,0	2000,0
Cortisol	500,0	1000,0	2000,0
17α-Estradiol	112,5	225,0	450,0
17β-Estradiol	115,0	230,0	460,0
Estron	117,5	235,0	470,0
Estriol	112,5	225,0	450,0

B Fettgewebe

Für das Fettgewebe werden die Gehalt in ng/8 mL angegeben, da dieser Gehalt dem Steroidgehalt bezogen auf 1 kg Fettgewebe entspricht.

Umrechnung der Standardgehalte in ng/kg Muskelgewebe bei einem Einsatz von 20 g Muskelgewebe:

Standardkonzentration [ng/μL] x Standardvolumen [μL] x 200 = Gehalt im Gewebe (bezogen auf 1 kg)

Standardsubstanz	Kalibrierstandard 1: Gehalt in ng/2mL (ng/kg)	Kalibrierstandard 2: Gehalt in ng/2mL (ng/kg)	Kalibrierstandard 3: Gehalt in ng/2mL (ng/kg)
IS Methyltestosteron	4000,0	4000,0	4000,0
cis-Androsteron	1176,0	2352,0	4704,0
DHEA	540,0	1080,0	2160,0
Epitestosteron	420,0	840,0	1680,0
Androstanolon	666,0	1332,0	2664,0
Androstendion	594,0	1188,0	2376,0
Testosteron	552,0	1104,0	2208,0
Pregnenolon	5342,0	1068,0	21368,0
Progesteron	6873,0	9164,0	18328,0
17α-Estradiol	450,0	900,0	1800,0
17β-Estradiol	460,0	920,0	1840,0
Estron	470,0	940,0	1880,0
Estriol	450,0	900,0	1800,0

9.2.6.3 Dotierung und Ermittlung von Wiederfindungsraten

Die Dotierung erfolgte sowohl für das Fett- als auch für das Muskelgewebe mit dem mittleren Standardvolumen der Kalibrierung.

Dotiert wurde eine Probe einer Doppelbestimmung. Die Dotierung erfolgte im Falle des Muskelgewebes nach der Trennung des polaren Extraktes vom Rückstand. Der unpolare Extrakt konnte dann ebenfalls dotiert werden. Im Falle des Fettgewebes wurde in den *n*-Hexan -Extrakt dotiert.

An jedem Analysentag wurde zur Kontrolle eine dotierte Probe analysiert.

Die Berechnung der Wiederfindungsraten erfolgte über die Summe des Gehalts des zur Dotierung verwendeten Standardvolumen und dem in der undotierten Probe ermittelten Gehalt im Verhältnis zu dem in der dotierten Probe ermittelten Gehalt:

$$\text{WFR [\%]} = \frac{(\text{Gehalt (dot. Probe [ng/kg])} - \text{Gehalt (undot. Probe [ng/kg]))} \times 100}{\text{Gehalt des zugesetzten Standards [ng/kg]}}$$

8.2.6.3.1 Linearer Meßbereich im Muskelgewebe (nach HARTMANN & STEINHART, 1997a)

Androgene/Metaboliten:	50 ng/kg bis 1600 ng/kg
Pregnenolon und Progesteron:	100 ng/kg bis 4300 ng/kg
Estradiol:	50 ng/kg bis 750 ng/kg
Estron:	50 ng/kg bis 560 ng/kg
Estriol:	70 ng/kg bis 540 ng/kg
Cortison:	500 ng/kg bis 1900 ng/kg
Cortisol:	500 ng/kg bis 6000 ng/kg

Der lineare Meßbereich für die Bestimmung von Steroiden im Fettgewebe ist in Kapitel 6.4.4.1 angegeben.

9.2.6.4 Grenze des praktischen Arbeitsbereiches für die Steroidbestimmung in Muskelgewebe

In Anlehnung an die Grenze des praktischen Arbeitsbereiches (GdpA) nach HARTMANN & STEINHART (1997a) wurde für die Bestimmung im Muskelgewebe 20 ng/kg für die Androgene, Gestagene und Metaboliten als GdpA angesehen. Für die Corticoide wurden 100 ng/kg als GdpA angesehen. Für die Estrogene konnte keine GdpA abgeschätzt werden, da sie in keiner Probe nachweisbar waren. Laut HARTMANN & STEINHART (1997a) lag die GdpA für die Estrogene je nach Substanz zwischen 20 ng/kg und 60 ng/kg.

9.3 Validierung der Methode für die Bestimmung von Steroidhormonmustern in Fettgewebe

Die Berechnung der Wiederfindungsraten erfolgte wie unter 9.2.6.3 beschrieben.

Steroid	undotierte Proben: Gehalt [ng/kg]						
	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7
cis-Androsteron	814	1128	1154	1311	154	210	509
DHEA	839	894	876	772	182	790	734
Epitestosteron	384	809	437	362	312	177	278
Androstanolon	569	748	458	856	184	496	214
Androstendion	541	1489	1503	1473	630	1527	1649
Testosteron	313	470	340	666	236	256	209
Pregnenolon	7751	8556	8845	7829	7231	6392	8737
Progesteron	31141	47879	59736	47735	40017	39515	48011

Steroid	dotierte Proben: Gehalt [ng/kg]							Gehalt des zugesetzten Standards [ng/kg]
	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	
cis-Androsteron	2057	1913	1917	2278	2226	1805	2217	2352
DHEA	1367	1516	1239	1532	1422	1198	1368	1080
Epitestosteron	760	692	714	645	747	644	719	840
Androstanolon	1382	1167	1348	2132	1045	1049	925	1332
Androstendion	1804	2308	2566	2719	2067	2694	2256	1188
Testosteron	706	1095	774	1330	617	722	641	1104
Pregnenolon	11099	12568	11775	11360	12763	10712	12165	10684
Progesteron	48769	55717	62956	51968	50819	45825	52516	9164

9.4 Geräte und Meßbedingungen

9.4.1 GC-FID

Gerät:	Carlo Erba Strumentazione HRGC 5300
Injektor:	Split 1:10 Injektortemperatur: 300 ° C Injektionsvolumen: 1 µL (Solvent-Flush-Technik)
Säule:	Kapillarsäule Länge: 30 m Innendurchmesser: 0,25 mm stat. Phase: DB-5 fused silica Filmdicke: 0,25 µm
mobile Phase:	Helium Flußrate: 1,5 mL/min
Temperaturprogramm:	250° C Aufheizrate: 10 ° C/min bis 290 ° C Haltezeit: 15 min
Detektor:	FID Detektortemperatur: 300 ° C Brenngase: Preßluft/Wasserstoff
Auswertung:	PC, Auswertungssoftware Chromstar, Version 4.05

9.4.2 GC-MSD

Gaschromatograph:

Gerät:	GC 3400 (Varian GmbH, Darmstadt, BRD)
Injektor:	Typ 1075 Split/Splitless Capillary Injektor (Varian) Injektortemperatur: 250 ° C 1min splitless, dann Split 1:10 Injektionsvolumen: 1 µL (Solvent-Flush-Technik)
Vorsäule:	Kapillare Länge: 3 m Innendurchmesser: 0,25 mm stat. Phase: fused silica deaktiviert
Säule:	Kapillarsäule Länge: 30m Innendurchmesser: DB-5 MS fused silica Filmdicke: 0,25 µm
mobile Phase:	Helium Flußrate: 1,3 mL/min
Temperaturprogramm:	130° C 1 min Aufheizrate: 10° C/min bis 290° C Haltezeit: 20 min

Massenspektrometer:

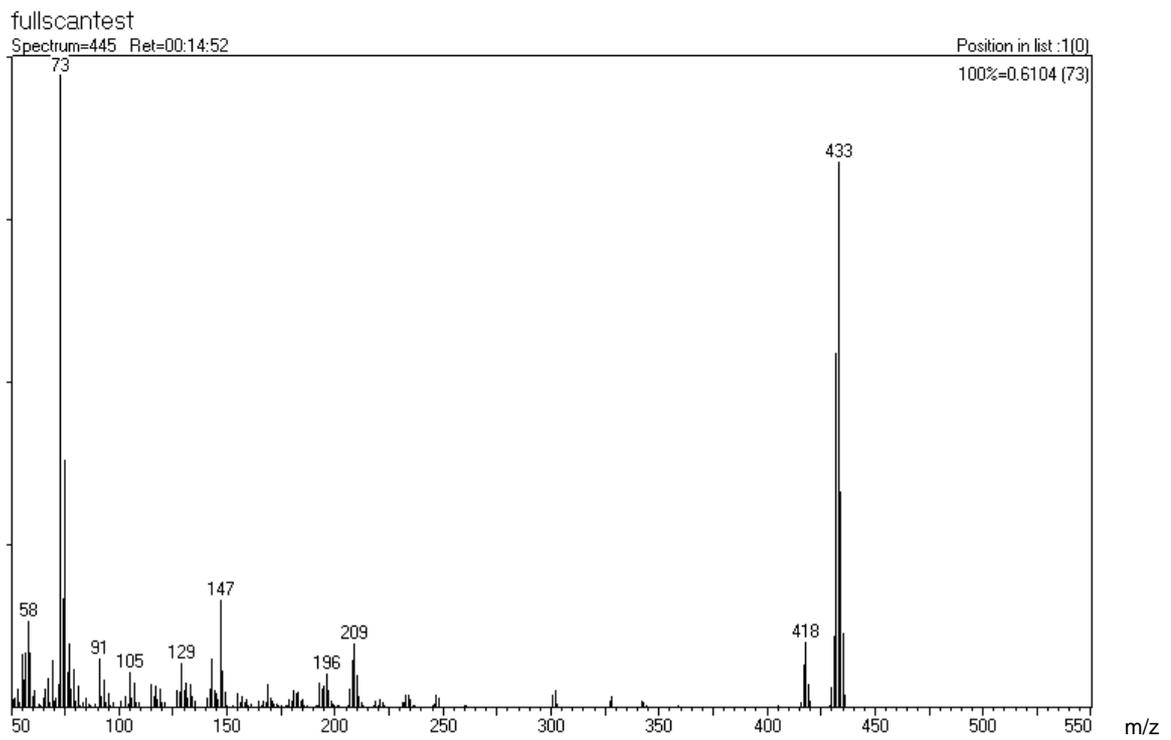
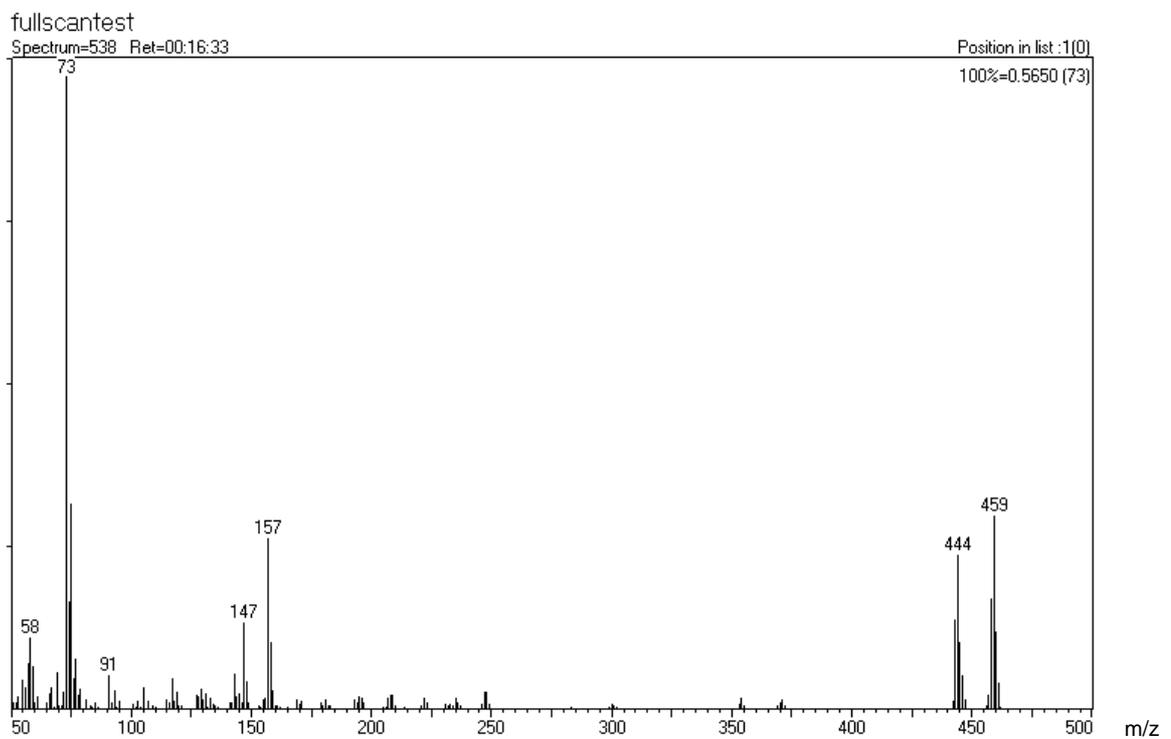
Gerät:	INCOS 50 B (Finnigan MAT, Bremen, BRD) mit angeschlossenem Datensystem Onyx, Version 4.10
Kopplungstechnik:	direkt über Transferline (290 ° C)
Ionisierungsbedingungen:	Elektronenstoßionisation (EI)
	Ionisierungsenergie 70 eV
	Temperatur der Ionenquelle: 180 ° C
Meßtechnik:	SIM-Technik: alle Massenfragmente über die gesamte Meßzeit

9.5 SIM-Massen der Steroid-Enolether

In der folgenden Tabelle sind für alle untersuchten Steroide die beiden für die Quantifizierung ausgewählten Massen aufgelistet. Die Reihenfolge der Androgene, Gestagene und Corticoide ist die der Elution.

Steroidhormon	1.Masse (m/z)	2.Masse (m/z)
Androgene/Gestagene		
cis-Androsteron	434,8	419,8
Dehydroepiandrosteron	432,8	417,8
Epitestosteron	432,8	417,8
Androstanolon	434,8	405,8
Androstendion	430,8	415,8
Testosteron	432,8	417,8
Methyltestosteron (IS)	446,8	431,8
Pregnenolon	460,8	445,8
Progesteron	458,9	443,9
Corticoide		
Cortison	630,8	615,8
Cortisol	632,8	617,8
Medroxyprogesteron (IS)	560,8	545,8

Die folgende Darstellung zeigt beispielhaft das Massenspektrum des Testosterontrimethylsilylenolethers und des Progesterontrimethylsilylenolethers.

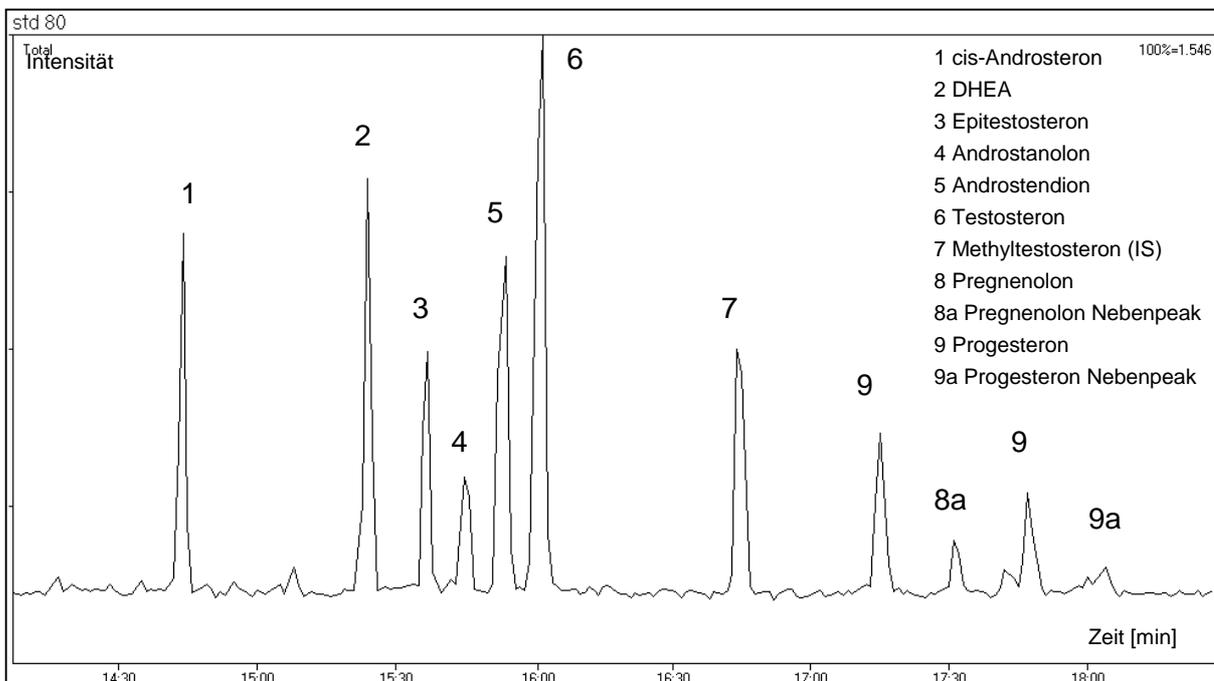
Testosteron-(TMS)₂**Progesteron-(TMS)₂**

Die Massen in den Spektren sind gerundet angegeben.

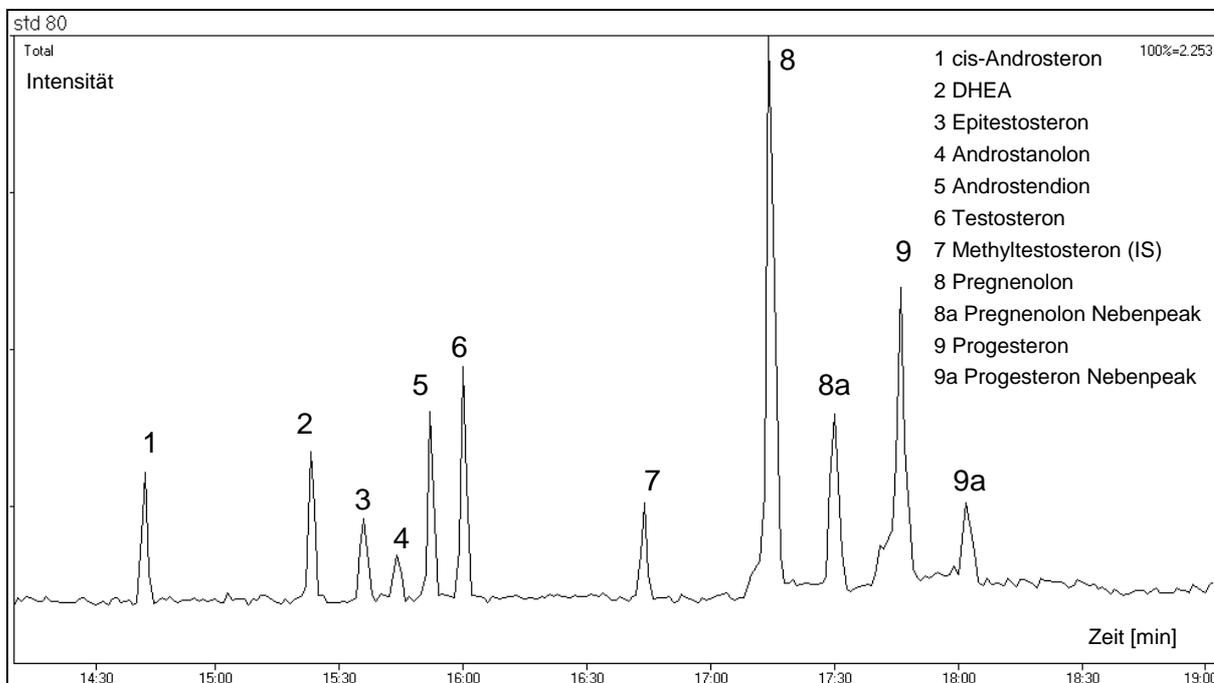
9.6 Chromatogramme der Standardlösungen

Die folgenden Chromatogramme wurden im SIM-Modus aufgenommen.

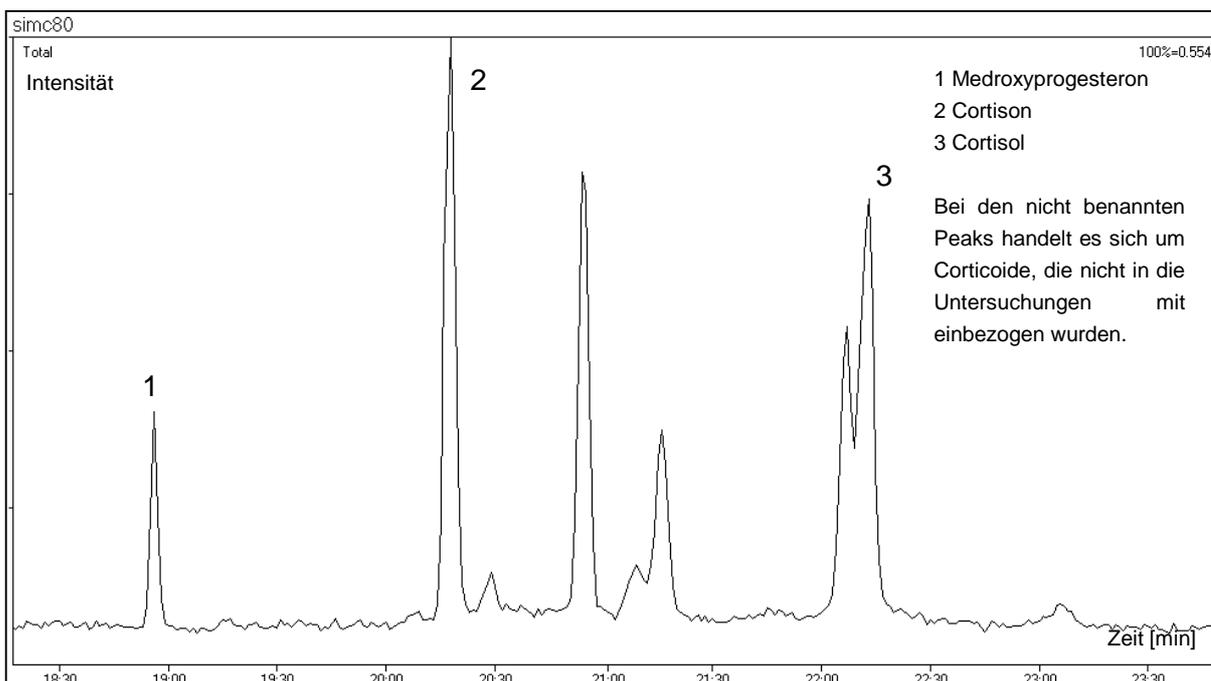
Standardlösung für die Messung von Steroiden in Muskelgewebe



Standardlösung für die Messung von Steroiden in Fettgewebe



Standardlösung für die Messung von Corticoiden im Muskelgewebe



9.7 Methode zur Bestimmung von Steroidhormonen (Corticoide, Androgene, Estrogene, Gestagene) in Muskelgewebe

9.7.1 Chemikalien

- | | |
|-------------------------------|------------------------------------|
| • Methanol | reinst: destilliert über NaOH |
| • Wasser | deionisiert |
| • <i>n</i> -Hexan | destilliert |
| • RP-8 Kartuschen | 500 mg; Varian Art.-Nr. 1210-2029 |
| • Si-Kartusche | 500 mg; Varian Art.-Nr. 1210-2037 |
| • Ethylacetat | nanograde: Promochem Art.-Nr. 3427 |
| • NH ₂ -Kartuschen | 500 mg; Varian Art.-Nr. 1210-2041 |
| • Standardlösungen | siehe 8.2.2 |

9.7.2 Geräte (Doppelbestimmung)

- Messer, Schneidebrett, Löffel, Porzellanschale
- Moulinette, Ultra-Turrax
- Laborwaage
- Wasserbad (60° C)
- 2 × Zentrifugengläser 250 mL mit Ausguß, Zentrifuge
- Scheidetrichter, Rundkolben, Spitzkolben silanisiert

- 8 mL-Schraubdeckelgläschen mit teflonbeschichteter Deckeldichtung; silanisiert
- Varian VAC ELUT Apparatur zur Festphasenextraktion (Varian; Darmstadt)
- Wasserstrahlpumpe
- Hähne und 20 mL Reservoirs mit Adapter für die Fertiggartuschen
- Ultraschallbad
- Heizblock
- Stickstoffbegasungsanlage

9.7.3 Durchführung

9.7.3.1 Probenvorbereitung

Eine ausreichende Menge Fleisch möglichst gefroren kleinschneiden, homogenisieren (Moulinette).

9.7.3.2 Extraktion der Steroidhormone aus dem Gewebe

- 20 g Probe in 250 mL Zentrifugenglas einwiegen
- 70 mL Methanol zugeben
- 20 mL Wasser zugeben; Homogenisierung mit Turrax (Eiskühlung)
- 15 Minuten auf 60° C im Wasserbad erhitzen und anschließend mit Hilfe eines Eisbades abkühlen
- 10 Minuten bei 3000 U/Minute zentrifugieren

9.7.3.3 Entfettung

- jeweils zwei Scheidetrichter übereinander hängen; in jeden Scheidetrichter 20 mL *n*-Hexan einfüllen
- in die oberen Scheidetrichter die Überstände aus den Zentrifugengläsern quantitativ dekantieren
- ggf. Dotierung (siehe 8.2.6.3)
- 1 Minute durch Schütteln extrahieren
- untere Methanol/Wasser Phase in den unteren Scheidetrichter ablassen
- 1 Minute durch Schütteln extrahieren
- Methanol/Wasser-Phasen in 250 mL Rundkolben sammeln
- Methanol am Vakuumrotationsverdampfer (100-150 mbar) bei 45° C entfernen und Wasserphase auf 15 bis 30 mL einengen

9.7.3.4 Fraktionierung über RP-8 Fertiggartusche

- Säule mit 4 mL Methanol benetzen und anschließend mit 6 mL Wasser konditionieren
- Probenaufgabe mit Hilfe des 20 mL Reservoirs
- Spülen der Rundkolbens mit 2 × 2 mL Wasser
- Reinigung der Extrakte: 2 mL Methanol/Wasser 40:60 V:V
- **Elution Corticoide:** 2,5 mL Methanol/Wasser 60:40 V:V
- **Elution unpolare Steroide:** 2,5 mL Methanol in Spitzgläschen
- beide Fraktionen im Heizblock unter Stickstoff zur Trockne bringen

9.7.3.5 Extraktion der Estrogene

- **unpolare Steroide** in 200 μL CHCl_3 aufnehmen
- 1 Minute Ultraschallbad
- 1,8 mL *n*-Hexan zugeben
- 2 mL KOH (0,25 M) zugeben
- 1 Minute kräftig schütteln
- etwa 4 Minuten zentrifugieren
- wenige Tropfen Ethanol zur Phasentrennung (bis etwa 10 Tropfen)
- 2 Minuten kleine Zentrifuge
- untere KOH-Phase in Spitzgläschen pipettieren; Vorlage 500 μL 1 M HCl, **Hexanphase** enthält **andere unpolare Steroide**
- pH-Wert der wässrigen Phase prüfen (neutral bis leicht sauer)
- **wässrige Phase: Estrogene** 4 \times mit 2 mL Diethylether ausschütteln (in Flachgläschen sammeln; zur Erzielung der Phasentrennung je 1 Minute zentrifugieren)
- **organische Phase: Estrogene** Diethylether unter Stickstoffstrom entfernen
- wässrige Phase verwerfen

9.7.3.6 Reinigung der Androgen/Gestagen-Fraktion mittels Si-Fertigkartuschen

- Konditionierung: 2 \times 2 mL *n*-Hexan/Ethylacetat (90:10 V:V)
- Probenaufgabe
- Waschen mit 2 \times 1 mL *n*-Hexan/Ethylacetat (90:10 V:V)
- Elution mit 2,6 mL *n*-Hexan/Ethylacetat (25:75 V:V) in Spitzgläschen
- mit Stickstoff im Heizblock zur Trockne bringen
- Extrakt bis zur Derivatisierung bei -18°C lagern

9.7.3.7 Reinigung der Estrogen-Fraktion mittels Amino-Fertigkartuschen

- Rückstand in 2 mL Ethylacetat/Methanol (80:20 V:V) aufnehmen
- Desaktivierung: 4 mL Ethylacetat mit 2,6 % Wasser
- Konditionierung: 4 mL Ethylacetat/Methanol (80:20 V:V)
- Probenaufgabe (ab hier auffangen)
- Waschen und Elution mit 3 \times 1 mL Ethylacetat/Methanol (80:20 V:V)
- mit Stickstoff im Heizblock zur Trockne bringen
- Extrakt bis zur Derivatisierung bei -18°C lagern

9.7.3.8 Reinigung der Corticoid -Fraktion mittels Si-Fertigkartuschen

- Desaktivierung: je 4 mL Ethylacetat mit 2,6 % Wasser
- suspendieren des trockenen Extraktes mit Hilfe eines Ultraschallbades in 2 mL Ethylacetat mit 2,6 % Wasser
- Probenaufgabe (ab hier auffangen)
- Waschen und mit je 2 \times 1 mL Ethylacetat mit 2,6 % Wasser
- mit Stickstoff im Heizblock zur Trockne bringen

9.8 Methode zur Bestimmung von Steroidhormonen und deren Fettsäureestern in Muskelgewebe

9.8.1 Chemikalien

Siehe 9.7.1 Zusätzlich:

- **Natriummethylatlösung** Natriummethylat 10 ig in Methanol;
gemischt 4: 6 V:V mit n-Methyl-tert-butylether
- **Chloroform** p.a.
- **Dichlormethan** p.a.

9.8.2 Geräte (Doppelbestimmung)

Siehe 9.7.2

9.8.3 Durchführung

Wie unter 9.7.3.1., 9.7.3.2 und 9.7.3.3 beschrieben. Die *n*-Hexan-Phase der flüssig-flüssig-Extraktion (9.7.3.3) wird nicht verworfen. Dann weiter wie folgt:

9.8.3.1 Extraktion der Steroidfettsäureester und der unpolaren Steroide

- Rückstand der Methanol/Wasser-Extraktion mit 50 mL Ethylacetat versetzen
- 1 Minute homogenisieren mit Turrax unter Eiskühlung
- 10 Minuten bei 3000 U/Minute zentrifugieren
- Überstand in die Hexanphase der Methanol/Wasser-Extraktion (9.7.3.3) dekantieren
- Rückstand der Ethylacetat-Extraktion mit 50 mL *n*-Hexan versetzen
- 10 Minuten bei 3000 U/Minute zentrifugieren
- Überstand in die Hexanphase der Methanol/Wasser-Extraktion (9.7.3.3) dekantieren
- Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer bei 45° C entfernen

9.8.3.2 Freisetzung der Steroide aus den Fettsäureestern

- Rückstand von 3.2 mit 20 mL Natriummethylatlösung versetzen und im Ultraschallbad suspendieren
- 30 Minuten bei Raumtemperatur reagieren lassen; zwischendurch schwenken
- mit 2 M Salzsäure neutralisieren gegen Methylorange
- in 100 mL Scheidetrichter überführen
- mit 8, 5, 5 und 3 mL Chloroform extrahieren, dabei den Rundkolben mit den ersten 8 mL Chloroform nachspülen
- Chloroform in 100 mL Spitzkolben sammeln und am Rotationsverdampfer entfernen
- jeweils zwei Scheidetrichter übereinander hängen; in jeden Scheidetrichter 20 mL *n*-Hexan einfüllen
- mit 70 mL Methanol in einen Scheidetrichter überführen und 20 mL Wasser zugeben
- 1 Minute durch Schütteln extrahieren
- untere Methanol/Wasser Phase in den unteren Scheidetrichter ablassen
- 1 Minute durch Schütteln extrahieren
- Hexan verwerfen
- Methanol/Wasser-Phasen in den ersten Scheidetrichter geben
- mit 50 mL Dichlormethan extrahieren
- Extraktion mit 2 × 40 mL Dichlormethan

- Dichlormethan in 250 mL Rundkolben sammeln und am Rotationsverdampfer zur Trockne bringen
- Rückstand in 200 µL Chloroform und 2 mL Hexan aufnehmen

9.8.3.3 Entfettung der freigesetzten Steroide mit Hilfe einer Si-Kartusche

- Desaktivierung: je 4 mL Ethylacetat mit 2,6 % Wasser
- Konditionieren mit 4 mL *n*-Hexan
- Probenaufgabe
- Waschen mit 4 mL *n*-Hexan; 4 mL *n*-Hexan/MTBE 5/1; 2 mL *n*-Hexan/MTBE 3/1
- Elution mit 6 mL Ethylacetat mit 2,63% Wasser
- Überführen in 250 mL Rundkolben mit Methanol; 20 mL Wasser zugeben
- Am Rotationsverdampfer auf ca. 20 mL einengen

9.8.3.4 Weitere Reinigung des Extraktes

Wie unter 9.7.3.4 bis 9.7.3.8 beschrieben

9.9 Methode zur Bestimmung von Steroidhormonen (Corticoide, Androgene, Estrogene, Gestagene) in Fettgewebe

9.9.1 Chemikalien, benötigte Lösungen und ihr Verwendungszweck

- **Diethylether** z.A., Merck Art.-Nr. 100921
- **Kieselgel 60** für SC, Ø 0,063-0,200 mm; Merck Art.-Nr. 1.07734
siehe Methode Muskelgewebe

9.9.2 Geräte (Doppelbestimmung)

- Chromatographiesäulen aus Glas; Länge 20 cm; Durchmesser 1,2 cm
- Mikrowelle
- Rollgerät, Assistent 348 RM5; 220V 50 Hz
siehe Methode Muskelgewebe (9.7)

9.9.3 Durchführung

9.9.3.1 Probenvorbereitung

10 g Fett gefroren kleinschneiden und in 250 mL Zentrifugenglas einwiegen

9.9.3.2 Extraktion der Steroidhormone und deren Fettsäureestern aus dem Gewebe

- Zentrifugenglas mit Uhrglas abdecken, Fett 5 Minuten in Mikrowelle bei 50 Watt erhitzen
- Homogenisierung mit Turrax (Eiskühlung), 1 Minute
- ggf. Dotierung (siehe 9.2.6.3)
- 10 Minuten bei 3000 U/Minute zentrifugieren
- *n*-Hexan-Phase in Mischzylinder abpipettieren
- Rückstand im Zentrifugenglas mit 14 mL Ethylacetat versetzen, mit Glasstab homogenisieren, Rückstand absetzen lassen

- Ethylacetat in 50-mL Spitzkolben pipettieren, Ethylacetat mit Hilfe des Rotationsverdampfers abdestillieren
- Rückstand in ca. 5 mL *n*-Hexan aufnehmen und zur *n*-Hexan -Phase im Mischzylinder geben, mehrmals mit wenigen mL *n*-Hexan den Kolben nachspülen
- Mischzylinder schütteln und *n*-Hexan -Phase in zwei Teile teilen
- Mischzylinder mit 10 mL *n*-Hexan spülen, in zwei Teile teilen
- ggf. einen Teil dotieren (siehe 9.2.6.3)

9.9.3.3 Entfettung mittels Kieselgelsäule

Packen der Säule

- Kieselgel 4 Stunden bei 100 ° C trocknen
- 50-100 g Kieselgel in Braungläser einwiegen, 20 % Wasser zugeben
- Gefäß über Nacht auf der Rollmaschine bewegen
- 8 g Kieselgel abwiegen in Becherglas
- 20 mL *n*-Hexan zugeben; Kieselgel suspendieren
- Glassäule zunächst innen mit *n*-Hexan befeuchten, dann Kieselgel hineingeben

Kieselgel-Säule

- Konditionierung: 25 mL *n*-Hexan
- Probenaufgabe
- Waschen: 35 mL *n*-Hexan
 - 20 mL *n*-Hexan /Ethylacetat (90/10 V/V)
 - 20 mL *n*-Hexan /Ethylacetat (75/25 V/V)
- Elution: 25 mL Methanol in 50-mL-Spitzkolben
- Am Rotationsverdampfer auf ca. 5-10 mL einengen
- Zur Bestimmung von Steroid-Fettsäureestern werden alle Waschfraktionen gesondert aufgefangen und wie unter 9.9.3.5 weiter gereinigt

9.9.3.4 Entfettung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion

- jeweils zwei Scheidetrichter übereinander hängen; in jeden Scheidetrichter 20 mL *n*-Hexan einfüllen
- Rückstand im Spitzkolben in oberen Scheidetrichter geben
- 60 mL Methanol in Spitzkolben füllen, 1 Minute Ultraschallbad, in Scheidetrichter füllen
- 20 mL Wasser in Scheidetrichter geben
- 1 Minute durch Schütteln extrahieren, zur Phasentrennung Ethanol zugeben
- untere Methanol/Wasser Phase in den unteren Scheidetrichter ablassen
- 1 Minute durch Schütteln extrahieren
- Methanol/Wasser-Phasen in 250 mL Rundkolben sammeln
- Methanol am Vakuumrotationsverdampfer (100-150 mbar) bei 45° C entfernen und Wasserphase auf 15 bis 30 mL einengen
weiter wie unter 9.7.3.4

9.9.3.5 Freisetzung der Steroide aus den Fettsäureestern

- Die Waschfraktion der Kieselgelsäule (9.9.3.3), die die Fettsäureester enthält, wird am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne gebracht.
- Der Rückstand wird mit 20 mL Natriummethylatlösung versetzt und im Ultraschallbad suspendiert
- 30 Minuten bei Raumtemperatur reagieren lassen; zwischendurch im Ultraschallbad homogenisieren

- mit 2 M Salzsäure neutralisieren gegen Methylorange
- in 100 mL Scheidetrichter überführen
- mit 3 x 10 mL Chloroform extrahieren
- Chloroform in 100 mL Spitzkolben sammeln und am Rotationsverdampfer entfernen weiter wie unter 9.9.3.4 beschrieben

9.10 Derivatisierung zu Silylenolethern

A Chemikalien

- Dithioerythrit p.A., Merck Art.-Nr. 24511
- MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid)
reinst, Merck Art.-Nr. 11805.0005
- TMIS (Trimethyliodsilan)

B Geräte

- Trockenschrank (60 ° C) mit Sandbad
- Braunglas 10 mL mit Teflondichtung

C Durchführung

- Herstellung des Silylierungsreagenz für Enolether:
1 mg Dithioerythrit in Braunglasfläschchen geben, mit 0,5 mL MSTFA versetzen und schütteln. Anschließend 1 µL TMIS zugeben; unter Licht- und Luftausschluß gekühlt lagern (2-3 Wochen haltbar).
- Silylierung:
Zum trockenen Extrakt der Probe bzw. des Standards entsprechende Menge Silylierungsreagenz geben; 15 Minuten bei 60° C im Trockenschrank erwärmen; 12 Stunden bei 4° C ruhen lassen (wichtig für vollständige Corticoid-Umsetzung)
- Messung am GC-MSD im SIM-Modus (siehe 9.5)

9.11 Hydrolyse von Steroidfettsäureestern

9.11.1 Eingesetzte Chemikalien

- Cholesterol Esterase (Sterolester-acylhydrolase) aus der Bauchspeicheldrüse vom Rind (EC 3.1.1.13); Sigma Art.-Nr. C-5921; 0,125 Units/mL in Ammoniumphosphat/di-Natriumphosphat-Puffer, pH 7
- Taurocholol (97 %ig), Natriumsalz; Sigma Art.-Nr. T-4009
- Rinderserumalbumin (Bovine albumine); Serva Art.-Nr. 11930
- Natriummethylat-Lösung; 10 % ig in Methanol gemischt 4:6 V:V mit n-Methyl-tert-butylether

9.11.2 Durchführung

Die Standardlösungen (Kapitel 9.2.4) wurden in 8 mL Spitzgläschen gegeben. Es werden 20 bis 200 µL der Standardlösungen eingesetzt. Das Lösungsmittel wird unter Stickstoff entfernt.

9.11.2.1 Enzymatische Hydrolyse

Es wurde eine Spatelspitze (5-10 mg) des Detergens zugesetzt und 250 µL eines auf pH 7 eingestellten Ammoniumphosphat/di-Natriumphosphat-Puffers zugegeben. Der Ansatz wurde durch Schütteln homogenisiert und 30 Minuten bis 12 Stunden bei 37 ° C inkubiert. Die freigesetzten Steroide wurden 4 x mit 3 mL Dichlormethan extrahiert. Der Extrakt wurde mit 50 µL der Methyltestosteron-Standardlösung (9.2.3) als interner Standard versetzt und zur Trockne gebracht.

9.11.2.2 Umesterung

Es wurde nur die unter 8.2.4 genannte Testosteronenanthat Standardlösung eingesetzt (28 µL). Zugegeben wurden außerdem 20 µL der unter 8.2.3 genannten Pregnenolon-, Progesteron- und Cortison-Standardlösungen. Es wurden zunächst 10 mL, für die Versuche mit Matrix 20 mL Umesterungslösung zugesetzt. Die Lösung wurde über die gesamte Reaktionszeit im Ultraschallbad behandelt. Die Reaktionszeiten variierten zwischen 5 Minuten und 2 Stunden. Anschließend wurde die Lösung mit 2 M Salzsäure neutralisiert und die Steroide mit 3 x 10 mL Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde mit internem Standard versetzt und zur Trockne gebracht.

9.11.2.3 Verseifung

Es wurde nur die unter 9.2.4 genannte Testosteronenanthat Standardlösung eingesetzt (28 µL). Zugegeben wurden außerdem 20 µL der unter 9.2.3 genannten Pregnenolon-, Progesteron- und Cortison-Standardlösungen. Es wurden zunächst 10 mL, für die Versuche mit Matrix 20 mL ethanolischer Kalilauge (0,5 M oder 2 M) zugesetzt und im Ultraschallbad behandelt. Die Reaktionszeit wurde von 10 Minuten bis zu 2 Stunden variiert. Anschließend wurde die Lösung mit 1 M Salzsäure neutralisiert und die Steroide mit 4 x 3 mL Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde mit internem Standard versetzt und zur Trockne gebracht.

9.11.3 Derivatisierung und Auswertung

Die Derivatisierung erfolgt wie unter 9.10 beschrieben. Die Auswertung erfolgt über einen Standard, der das Steroid enthält, das bei der Hydrolyse freigesetzt werden soll. Das Volumen der Standardlösung des zu untersuchenden Steroids wurde so gewählt, daß die absolute Menge des Steroids der maximal freisetzbaren Menge des Steroids aus seinem Ester im Versuchsansatz entspricht. Es werden 50 µL der Methyltestosteronstandardlösung zugegeben. Die Standardlösungen für diese Versuche sind unter 9.2.4 angegeben.

9.11.4 Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Matrixumsetzung

Stationäre Phase:	Kieselgel 60
Mobile Phase:	Toluol/Eisessig (90/30 V/V)
Vergleichslösung:	Rinderfett in Chloroform
Detektion:	Besprühen mit einer 0,2 %igen Lösung von Rhodamin B in konz. Salzsäure

9.12 Steroidgehalte der untersuchten Gewebe

9.12.1 Steroidgehalte der unpolaren Extrakte des Muskelgewebes – umgeestert und nicht umgeestert

Ochse 833

Steroid	upolarer Extrakt [ng/kg]	unpolarer Extrakt; umgeestert [ng/kg]
cis-Androsteron	<20	<20
DHEA	50	40
Epitestosteron	<20	<20
Androstanolon	<20	150
Androstendion	80	80
Testosteron	50	<20
Pregnenolon	510	460
Progesteron	350	510

Ochse 828

Steroid	upolarer Extrakt [ng/kg]	unpolarer Extrakt; umgeestert [ng/kg]
cis-Androsteron	30	30
DHEA	60	50
Epitestosteron	20	20
Androstanolon	130	<20
Androstendion	70	280
Testosteron	70	<20
Pregnenolon	700	590
Progesteron	750	1270

Ochse 818

Steroid	upolarer Extrakt [ng/kg]	unpolarer Extrakt; umgeestert [ng/kg]
cis-Androsteron	60	70
DHEA	60	90
Epitestosteron	<20	20
Androstanolon	150	40
Androstendion	250	450
Testosteron	110	30
Pregnenolon	1040	1050
Progesteron	610	1110

9.12.2 Steroidgehalte der polaren Extrakte des Muskelgewebes (MLD)

Schlachtgruppe 1*unbehandelt*

Steroid	Ochse 834 [ng/kg]	Ochse 833 [ng/kg]	Ochse 866 [ng/kg]	Ochse 867 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	810	860	650	840	825
Progesteron	1210	610	4470	170	910
DHEA	110	70	130	<20	90
Androstendion	<20	<20	80	220	40
Testosteron	<20	<20	20	40	<20
Androstanolon	<20	<20	60	<20	<20
Epitestosteron	70	50	50	<20	50
cis-Androsteron	20	20	20	<20	20
Cortisol	4720	15670	6030	6740	6385
Cortison	540	1960	1920	330	1230

Synovex-S

Steroid	Ochse 831 [ng/kg]	Ochse 828 [ng/kg]	Ochse 839 [ng/kg]	Ochse 818 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	840	1060	580	1370	950
Progesteron	350	2720	570	830	700
DHEA	50	90	70	30	60
Androstendion	<20	200	<20	<20	<20
Testosteron	<20	<20	<20	<20	<20
Androstanolon	<20	<20	<20	<20	<20
Epitestosteron	30	60	50	<20	40
cis-Androsteron	<20	30	40	20	25
Cortisol	11460	17460	14930	16150	15540
Cortison	2380	1210	1950	3040	2165

Schlachtgruppe 2*unbehandelt*

Steroid	Ochse 826 [ng/kg]	Ochse 882 [ng/kg]	Ochse 815 [ng/kg]	Ochse 842 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	640	1090	210	940	790
Progesteron	230	510	110	670	370
DHEA	170	230	90	140	155
Androstendion	140	150	100	170	145
Testosteron	90	190	110	210	150
Androstanolon	<20	330	90	220	155
Epitestosteron	60	40	<20	40	40
cis-Androsteron	50	50	<20	30	40
Cortisol	n.e.	3720	3570	5120	3720
Cortison	n.e.	440	480	1050	480

n.e. nicht ermittelt

Synovex-S

Steroid	Ochse 823 [ng/kg]	Ochse 880 [ng/kg]	Ochse 821 [ng/kg]	Ochse 875 [ng/kg]	Median
Pregnenolon	1220	2010	1130	720	1175
Progesteron	460	1150	550	410	505
DHEA	100	110	70	170	105
Androstendion	70	<20	80	130	75
Testosteron	20	<20	20	190	20
Androstanolon	<20	<20	<20	<20	<20
Epitestosteron	50	130	40	80	65
cis-Androsteron	20	40	20	<20	20
Cortisol	3100	14210	2330	n.e.	3100
Cortison	450	2910	230	n.e.	450

n.e. nicht ermittelt

Schlachtgruppe 3***unbehandelt***

Steroid	Ochse 825 [ng/kg]	Ochse 822 [ng/kg]	Ochse 863 [ng/kg]	Ochse 879 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	560	860	710	1190	785
Progesteron	410	110	300	60	205
DHEA	190	130	220	250	205
Androstendion	120	60	40	80	70
Testosteron	30	<20	<20	<20	<20
Androstanolon	<20	60	190	80	70
Epitestosteron	40	40	20	80	40
cis-Androsteron	<20	<20	<20	20	<20
Cortisol	1850	720	3980	480	1285
Cortison	590	310	670	130	450

Synovex-S

Steroid	Ochse 816 [ng/kg]	Ochse 864 [ng/kg]	Ochse 873 [ng/kg]	Ochse 817 [ng/kg]	Median
Pregnenolon	670	1160	1180	920	1040
Progesteron	220	460	890	840	650
DHEA	140	170	270	210	190
Androstendion	60	170	130	140	135
Testosteron	<20	<20	60	30	<20
Androstanolon	70	50	<20	20	35
Epitestosteron	40	70	160	100	85
cis-Androsteron	20	50	40	80	45
Cortisol	2750	1880	5150	5270	3950
Cortison	390	710	810	410	560

Schlachtgruppe 4**unbehandelt**

Steroid	Ochse 832 [ng/kg]	Ochse 846 [ng/kg]	Ochse 869 [ng/kg]	Ochse 837 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	1410	700	790	1610	1100
Progesteron	250	300	660	470	385
DHEA	190	310	80	160	175
Androstendion	40	130	80	160	105
Testosteron	20	40	20	<20	20
Androstanolon	<20	350	<20	<20	<20
Epitestosteron	<20	30	30	30	30
cis-Androsteron	30	<20	30	40	30
Cortisol	8400	1470	1490	4640	3065
Cortison	1100	440	40	280	360

Synovex-S

Steroid	Ochse 862 [ng/kg]	Ochse 819 [ng/kg]	Ochse 878 [ng/kg]	Ochse 874 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	900	400	1220	420	660
Progesteron	730	440	1110	250	585
DHEA	20	200	140	60	100
Androstendion	120	<20	310	60	90
Testosteron	20	<20	20	<20	20
Androstanolon	<20	<20	30	<20	0
Epitestosteron	30	130	80	60	70
cis-Androsteron	<20	<20	90	30	30
Cortisol	5800	6360	8070	1660	6080
Cortison	1400	1270	1130	390	1200

9.12.3 Steroidgehalte der unpolaren Extrakte des Muskelgewebes (MLD)**Schlachtgruppe 1****unbehandelt**

Steroid	Ochse 834 [ng/kg]	Ochse 833 [ng/kg]	Ochse 866 [ng/kg]	Ochse 867 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	710	830	360	700	705
Progesteron	410	280	1690	150	345
DHEA	80	580	120	<20	100
Androstendion	<20	170	90	<20	45
Testosteron	<20	60	20	<20	<20
Androstanolon	200	260	250	130	225
Epitestosteron	20	<20	20	<20	<20
cis-Androsteron	<20	<20	<20	<20	<20

Synovex-S

Steroid	Ochse 831 [ng/kg]	Ochse 828 [ng/kg]	Ochse 839 [ng/kg]	Ochse 818 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	730	320	270	610	465
Progesteron	860	100	230	330	280
DHEA	160	80	70	50	75
Androstendion	100	40	<20	50	45
Testosteron	30	20	<20	20	20
Androstanolon	170	190	90	120	145
Epitestosteron	<20	<20	<20	<20	<20
cis-Androsteron	<20	<20	<20	<20	<20

Schlachtgruppe 3***unbehandelt***

Steroid	Ochse 825 [ng/kg]	Ochse 822 [ng/kg]	Ochse 863 [ng/kg]	Ochse 879 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	380	870	530	860	695
Progesteron	90	150	310	90	120
DHEA	170	90	80	130	110
Androstendion	<20	60	20	20	20
Testosteron	<20	50	<20	<20	<20
Androstanolon	<20	70	80	80	75
Epitestosteron	<20	<20	<20	30	<20
cis-Androsteron	<20	20	<20	<20	<20

Synovex-S

Steroid	Ochse 816 [ng/kg]	Ochse 864 [ng/kg]	Ochse 873 [ng/kg]	Ochse 817 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	580	1490	1160	550	870
Progesteron	160	250	530	<20	205
DHEA	60	940	190	70	130
Androstendion		<20	<20	<20	<20
Testosteron	<20	100	<20	<20	<20
Androstanolon	70	920	90	40	80
Epitestosteron	<20	<20	90	<20	<20
cis-Androsteron	<20	30	540	30	30

Schlachtgruppe 4***unbehandelt***

Steroid	Ochse 832 [ng/kg]	Ochse 846 [ng/kg]	Ochse 869 [ng/kg]	Ochse 837 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	920	400	480	600	540
Progesteron	160	230	250	190	210
DHEA	130	170	20	60	95
Androstendion	<20	<20	<20	100	<20
Testosteron	30	<20	<20	<20	<20
Androstanolon	<20	<20	<20	50	<20
Epitestosteron	<20	<20	<20	<20	<20
cis-Androsteron	30	<20	<20	30	<20

Synovex-S

Steroid	Ochse 862 [ng/kg]	Ochse 819 [ng/kg]	Ochse 878 [ng/kg]	Ochse 874 [ng/kg]	Median
Pregnenolon	420	550	500	340	460
Progesteron	230	410	200	250	240
DHEA	50	180	40	30	45
Androstendion	40	<20	<20	40	20
Testosteron	40	<20	30	<20	<20
Androstanolon	70	80	<20	30	50
Epitestosteron	<20	40	<20	<20	<20
cis-Androsteron	30	<20	90	<20	<20

9.12.4 Gesamtsteroidgehalte des Muskelgewebes (MLD)**Schlachtgruppe 1*****unbehandelt***

Steroid	Ochse 834 [ng/kg]	Ochse 833 [ng/kg]	Ochse 866 [ng/kg]	Ochse 867 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	600	1400	1250	1080	1165
Progesteron	1220	980	1540	510	1100
DHEA	140	80	120	150	130
Androstendion	470	230	1110	490	480
Testosteron	120	50	140	490	130
Androstanolon	260	<20	250	<20	125
Epitestosteron	70	130	60	200	100
cis-Androsteron	50	60	80	50	55

Synovex-S

Steroid	Ochse 831 [ng/kg]	Ochse 828 [ng/kg]	Ochse 839 [ng/kg]	Ochse 818 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	990	1710	690	3170	1350
Progesteron	1450	2400	910	1800	1625
DHEA	30	100	140	60	80
Androstendion	180	270	300	380	285
Testosteron	80	<20	80	110	80
Androstanolon	110	130	160	150	140
Epitestosteron	20	40	30	20	25
cis-Androsteron	40	70	80	70	70

Schlachtgruppe 3**unbehandelt**

Steroid	Ochse 825 [ng/kg]	Ochse 822 [ng/kg]	Ochse 863 [ng/kg]	Ochse 879 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	940	1730	1250	2050	1490
Progesteron	500	270	610	150	385
DHEA	260	220	300	380	280
Androstendion	120	110	60	100	105
Testosteron	30	50	<20	<20	20
Androstanolon	<20	130	270	160	145
Epitestosteron	80	90	50	220	85
cis-Androsteron	<20	30	20	40	25

Synovex-S

Steroid	Ochse 816 [ng/kg]	Ochse 864 [ng/kg]	Ochse 873 [ng/kg]	Ochse 817 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	1250	2650	2970	550	1950
Progesteron	390	700	1880	<20	545
DHEA	200	1120	1830	70	660
Androstendion	60	170	170	<20	105
Testosteron	<20	100	190	<20	45
Androstanolon	140	960	1550	40	550
Epitestosteron	80	140	360	<20	110
cis-Androsteron	20	80	570	100	90

Schlachtgruppe 4**unbehandelt**

Steroid	Ochse 832 [ng/kg]	Ochse 846 [ng/kg]	Ochse 869 [ng/kg]	Ochse 837 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	2330	1100	1270	2210	1740
Progesteron	410	530	910	660	595
DHEA	320	480	100	220	270
Androstendion	40	130	80	260	105
Testosteron	50	40	20	<20	30
Androstanolon	<20	350	<20	50	25
Epitestosteron	<20	30	30	30	30
cis-Androsteron	60	<20	30	60	45

Synovex-S

Steroid	Ochse 862 [ng/kg]	Ochse 819 [ng/kg]	Ochse 878 [ng/kg]	Ochse 874 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	1320	960	1720	760	1140
Progesteron	960	850	1310	500	905
DHEA	70	380	170	80	125
Androstendion	160	<20	310	90	125
Testosteron	60	<20	50	<20	25
Androstanolon	70	80	30	30	50
Epitestosteron	30	160	80	60	70
cis-Androsteron	30	<20	180	30	30

9.12.5 Steroidgehalte des Fettgewebes

Schlachtgruppe 1*unbehandelt*

Steroid	Ochse 834 [ng/kg]	Ochse 833 [ng/kg]	Ochse 866 [ng/kg]	Ochse 867 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	9490	5670	8730	2190	7200
Progesteron	2140	1020	1850	750	1435
DHEA	680	320	720	130	500
Androstendion	860	150	450	<100	300
Testosteron	<100	<100	<100	<100	<100
Androstanolon	170	170	450	<100	170
Epitestosteron	240	100	170	<100	135
cis-Androsteron	280	100	170	<100	135

Synovex-S

Steroid	Ochse 831 [ng/kg]	Ochse 828 [ng/kg]	Ochse 839 [ng/kg]	Ochse 818 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	9380	6240	5730	18470	7810
Progesteron	2130	4890	2870	4000	3435
DHEA	270	120	980	<100	195
Androstendion	110	150	670	110	130
Testosteron	<100	<100	340	<100	<100
Androstanolon	160	150	1040	130	155
Epitestosteron	100	100	290	<100	100
cis-Androsteron	<100	100	370	100	100

Schlachtgruppe 2*unbehandelt*

Steroid	Ochse 826 [ng/kg]	Ochse 882 [ng/kg]	Ochse 815 [ng/kg]	Ochse 842 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	8790	6250	7380	7630	7505
Progesteron	2380	2230	3160	2520	2450
DHEA	700	200	760	930	730
Androstendion	670	220	980	910	790
Testosteron	380	340	380	340	360
Androstanolon	920	880	1250	1100	1010
Epitestosteron	200	290	240	370	265
cis-Androsteron	380	230	390	450	385

Synovex-S

Steroid	Ochse 823 [ng/kg]	Ochse 880 [ng/kg]	Ochse 821 [ng/kg]	Ochse 875 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	12040	10870	10980	7670	10925
Progesteron	6240	3470	5230	2390	4350
DHEA	1420	800	1010	440	905
Androstendion	1110	630	730	310	680
Testosteron	600	290	580	<100	435
Androstanolon	860	720	960	<100	790
Epitestosteron	550	410	470	<100	440
cis-Androsteron	1110	720	1150	280	915

Schlachtgruppe 3**unbehandelt**

Steroid	Ochse 825 [ng/kg]	Ochse 822 [ng/kg]	Ochse 863 [ng/kg]	Ochse 879 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	14430	10730	9150	9520	10125
Progesteron	590	640	990	350	615
DHEA	910	1090	1170	1270	1130
Androstendion	1000	830	720	900	865
Testosteron	<100	<100	<100	<100	<100
Androstanolon	330	350	280	320	325
Epitestosteron	280	230	170	360	255
cis-Androsteron	350	360	360	370	360

Synovex-S

Steroid	Ochse 816 [ng/kg]	Ochse 864 [ng/kg]	Ochse 873 [ng/kg]	Ochse 817 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	11510	13820	14680	9270	12665
Progesteron	3900	2290	2970	1180	2630
DHEA	1050	1150	1560	760	1100
Androstendion	840	1190	1100	130	970
Testosteron	220	<100	<100	<100	<100
Androstanolon	200	<100	<100	<100	<100
Epitestosteron	180	<100	120	580	150
cis-Androsteron	410	230	320	190	275

Schlachtgruppe 4**unbehandelt**

Steroid	Ochse 832 [ng/kg]	Ochse 846 [ng/kg]	Ochse 869 [ng/kg]	Ochse 837 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	8880	8790	13800	12260	10570
Progesteron	1490	1450	2190	1760	1625
DHEA	1370	590	850	1680	1110
Androstendion	250	330	1510	1680	920
Testosteron	<100	<100	150	<100	<100
Androstanolon	<100	<100	420	<100	<100
Epitestosteron	<100	<100	170	190	<100
cis-Androsteron	370	310	580	500	435

Synovex-S

Steroid	Ochse 862 [ng/kg]	Ochse 819 [ng/kg]	Ochse 878 [ng/kg]	Ochse 874 [ng/kg]	Median [ng/kg]
Pregnenolon	1050	6210	5070	5180	5125
Progesteron	1690	2170	3100	2160	2165
DHEA	870	390	1800	490	680
Androstendion	1030	420	2000	620	825
Testosteron	210	860	110	100	160
Androstanolon	<100	990	<100	<100	<100
Epitestosteron	240	860	310	740	525
cis-Androsteron	320	<100	760	130	225

9.13 Chemikalien

Substanz	Gefahrenmerkmal	R- und S-Sätze
Aceton	F	R: 11; S:9-16-23-33
Calciumchlorid	Xi	R: 36; S: 22-24
Chloroform	Xn	R: 47-20/22-38-40-48; S: 53-36/37
Dichlormethan	Xn	R: 40; S: 23.2-24/25-36/37
Diethylether	F+	R: 12-19; S: 9-16-29-33
Dithioeritryt	Xi	R: 36/37/38; S: 26-36
Ethanol	F	R: 11; S: 7-16
Ethylacetat	F	R: 11; S: 16-23-29-33
Kalilauge, 0,5 M	C	R: 34; S: 26-37/39-45
Kalilauge, 2 M	C	R: 22-35; S: 16-26-27-36/37/39-45
Kaliumhydroxid	C	R: 35; S: 26-37/39-45
Kieselgel	-	S: 22-24/25
Methanol	T, F	R: 11-23/25; S: 2-7-16-24
MSTFA	Xi	R: 10-36/37/38
Natriumhydroxyd	C	R: 35; S: 26-37/39-45
Natriummethylat	F, C	R: 11-14-34; S: 8-16-26-43.11-45
<i>n</i> -Hexan	F, Xn	R: 11-21/22-40 S: 9-16-23
<i>n</i> -Methyl-tert-butylether	F, Xi	R: 11-36/37/38; S: 9-16—26-29-33-36
<i>n</i> -Methyl-trimethylsilyl-trifluoracetamid	Xi	R: 10-36 S:26-36
Salzsäure, 1 M	Xi	R: 36/37/38; S: 2-36
Trimethyliodsilan	F, C	R: 11-34-37; S: 16-26-28
Standardsubstanzen		
17 α -Estradiol	Xn	R: 20/21/22-40; S: 22-36
17 β -Estradiol	T	R: 45-46-61-20/21/22; S: 45-36/37/39-22
Androstanolon	T	R: 61; S: 53-45
Androstendion	Xn	R: 40; S: 22-36
Cholesterol	-	S: 22-24/25
Cholesterololeat	-	-
cis-Androsteron	-	S: 22-24/25
Cortisol	Xn	R: 40; S: 22-36
Cortison	Xn	R: 20/21/22-40; S: 22-36
Cortisonacetat	Xn	R: 40; S: 22-36/37
DHEA	Xn	R: 36/37/38; S: 26-36
Epitestosteron	Xn	R: 20/21/22; S: 22-36
Estradiolstearat		Keine Angaben
Estriol	Xn	R: 20/21/22-40; S: 22-36
Estron	T	R: 45-46-61-20/21/22; S: 45-36/37/39-22
Medroxyprogesteron	Xn	R: 40-48; S: 22
Methyltestosteron	Xn	R: 22; S: 22-24/25
Pregnenolon	-	S: 22-24/25
Progesteron	T	R: 45-46-20/21/22; S: 22-45-36/37/39-3/7/9
Testosteron	T	R: 45-61-20/21/22; S: 45-36/37/39-22
Testosteronbenzoat	Xn	R: 40-48; S: 22-24/25
Testosteronenanthat	T	R: 45-61-20/21/22; S: 45-36/37/39-22

10 Literatur

- AL-AHMAD, H.: Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Cholesterol und dessen Estern in tierischen Geweben, *Dissertation*, Universität Hamburg (1991)
- ANDERSSON, S. H. G., SJÖVALL, J.: A method combining solvent and gel extraction for isolation and preliminary purification of steroids in tissues, *Anal. Biochem.* 134, 309-312 (1983)
- ARDÉVOL, A., VIRGILI, J., SANCHIS, D., ADÁN, C., FERNÁNDEZ-REAL, J. M., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A., REMESAR, X., ALEMANY, M.: A method for the measurement of plasma estrone fatty ester levels, *Analytical Biochemistry* 249, 247-250 (1997)
- AXELSON, M., SJÖVALL, J.: Separation and computerized gas chromatography-mass spectrometry of unconjugated neutral steroids in plasma, *J. Steroid Biochem.* 5, 733-738 (1974)
- BARMAN, T. E.: *Enzyme Handbook II*, Vol. II, Springer Verlag (1969)
- BARTSCH, W.: Anabolic steroids – action on a cellular level, *Wien. Med. Wschr.* 143, 363-366 (1993)
- BELLO, A. C.: Rapid isolation of the steroid fraction in edible oils using a silica cartridge, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 75, 1120-1123 (1992)
- BERGNER-LANG, B., KÄCHELE, M.: Anabolika in Kalbfleisch – Nachweis und Bestimmung, Befunde und Beobachtungen, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 77, 305-313 (1981)
- BETTIN, C., FÜRST, P.: Hormonester im Bereich der Injektionsstelle – Radioimmunologischer Screeningtest und Identifizierung durch kombinierte Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie, *Fleischwirtsch.* 69, 1033-1036 (1989)
- BIEDERMANN, M., GROB, C., MARIANI, C.: Transesterification and on-line LC-GC for determining the sum of free and esterified sterols in edible oils and fats, *Fat Sci. Technol.* 95, 127-133 (1993)
- BIRKENHÄGER-GILLESSE, E. G., DERKSEN, J., LAGAAY, A. M.: Dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) in the oldest old, aged 85 and over, *New York Acad. of Sciences* 719, 543-552 (1994)
- BLEAU, G., ROBERTS, K. D., CHAPDELAIN, A.: The in vitro and in vivo uptake and metabolism of steroids in human adipose tissue, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 39, 236-246 (1974)
- BOGENRIEDER, H. F., COLLATZ, K. G., KÖSSEL, H., OSCHE, G.: Lexikon der Biologie, 8 Bände, 1. Auflage, Herder Verlag, Freiburg, Basel, Wien (1985)
- BORG, W., SHAKLETON, C. H. L., PAHUJA, S. L., HOCHBERG, R. B.: Long-lived testosterone esters in the rat, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92,: 1545-1549 (1995)
- BROCKERHOLT, H., JENSEN, R. O.: *Lipolytic enzymes*, Academic Press, New York, San Francisco, London (1974)

- BROSIUS, F.: *SPSS 10.07: Professionelle Statistik unter Windows*, Bonn (2000)
- BUDDEKE, E.: *Grundriß der Biochemie*, 7.Aufl., Walter de Gruyter Verlag, Berlin (1985).
- BUNDESGESUNDHEITSAMT – ARBEITSGRUPPE „ANABOLIKA“ nach § 35 LMBG: Bestimmung von hormonell wirksamen Stoffen (Anabolika) in Fleisch (Muskelgewebe), Leber, Niere und Fettgewebe (vorläufige Methode), *Bundesgesundheitsblatt* 2, 76-80 (1989)
- CARR, B. R.: Disorders of the ovaries and female reproductive tract, in *Williams Textbook of Endocrinology*, 9. Auflage, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, (1998)
- CLAUS, R., MÜNCH, U., NAGEL, S., SCHOPPER, D.: Concentration of 17 β -oestradiol, oestrone and testosterone in tissues of slaughterweight boars compared to barrows and gilts, *Arch. Lebensmittelhyg.* 40, 123-126 (1989)
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES / DIRECTORATE-GENERAL FOR AGRICULTURE: Levels of natural occurring sex steroids in edible tissue, *Report of the scientific veterinary committee (section public health)*, VI/1533/88-EN-REV, Brüssel (1989)
- CROSS, H. R., SCHANBACHER, B. D., CROUSE, J. D.: Sex, age and breed related changes in bovine testosterone and intramuscular collage, *Meat Sci.* 10, 187-195 (1984)
- DASELEIRE, E. A., DE GUESQUIÈRE, A.; VAN PETEGHAM, C.: Multiresidue analysis of anabolic agents in muscle tissue and urines of cattle by GC-MS, *J. Chromatogr. Sci.* 30, 409-414 (1992)
- DAXENBERGER, A., LANGE, I., MEYER, K., MEYER, H. H. D.: Detection of anabolic residues in misplaced implantation sites in cattle, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 83, 809-819, (2000)
- DEBACKERE, M.: Use of anabolics in beef production, *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 60, 71-75 (1989)
- DLG (Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft e.V.): *Jungrindermast zur Erzeugung von Qualitätsfleisch*, Frankfurt (1991)
- DONIKE, M., ZIMMERMANN, J., BÄRWALD, K.-R., SCHAUZER, W., CHRIST, V., KLOSTERMANN, K., OPPERMANN, G.: Routinebestimmung von Anabolika in Harn, *Dtsch. Z. Sportmedizin* 35, 14-24 (1984)
- DUBOIS, M., TAILLIEUX, X., COLEMONT, Y., LANSIVAL, B., DEGRAEVE, J., DELAHAUT, P.: GC-MS determination of anabolic steroids after multi-immunoaffinity purification, *Analyst* 123, 2611-2616 (1998)
- EBELING, P., KOIVISTO, V. A.: Physiological importance of dehydroepiandrosterone, *Lancet* 343, 1479-14811 (1994)
- ECKERT, R.: *Tierphysiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1986)
- EDELHÄUSER, M.: Eine schnelle Methode zur Bestimmung des Ebergeruchsteroids Androstenon, *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* 85, 80-84 (1989)

- ELIASSON, L., RHYDMER, L.: Relationship between age, oestrus symptoms and performance traits in gilts, *11th International Congress on Animal Reproduction and artificial Insemination*, Dublin, 26.-30. Juni, 535-555 (1988)
- ENGELHARDT, S.: Belastungsreduzierte Aufzucht von Jungsauen und deren Einfluß auf Fruchtbarkeitsleistungen sowie Beziehungen zwischen Fleisch- und Fettansatz, Follikelwachstum und ausgewählten Steroiden in verschiedenen Geweben, *Dissertation*, Universität Leipzig (1992)
- ERIKSSON, H.: Hormonal mechanisms regulating hepatic steroid metabolizing activities, *Eur. J. Biochem.* 46, 603-611 (1974)
- ESTERGREEN, V. L., LIN, M. T. , MARTIN, E. L., MOSS, G. E., BRANEN, A. L., LUEDECKE, L. O., SHIMODA, W.: Distribution of progesterone and its metabolites in cattle tissues following administration of progesterone-4-14C, *J. Anim. Sci.* 46, 642-651 (1977)
- EUROPEAN COMMISSION: *Opinion of the scientific committee on veterinary measure relating to public health: assessment of potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products* (30. April 1999)
- EUROPEAN COMMISSION: *Review of specific documents relating to the SCVPH opinion of 30 April 99 on the potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products* (3. Mai 2000)
- FEHÉR, T., BODROGI, L.: A comparative study of steroid concentrations in human adipose tissue and the peripheral circulation, *Clin. Chim. Acta*, 126, 135-141 (1982)
- FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE (FAS): Chronology of the european union`s hormone ban. <http://www.fas.usda.gov/it/policy/chronology.html> (1999a)
- FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE (FAS): A primer on Beef hormones, <http://www.fas.usda.gov/it/policy/hormones2.html> (1999b)
- FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE (FAS): Chronology of the european union`s hormone ban. <http://www.fas.usda.gov/it/policy/chronology.html> (1999a)
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 2. Aufl., Bibliographisches Institut, Mannheim 1977
- FRANK, R., JOHNSON, W. S., TURNER, L. G., SIECK, R. F. S.: Radioimmunoassay method for determination of estradiol (E2 β) and estrone (E1) in cattle tissues, in *Anabolics in animal production* (Meissonnier, E., Ed.), Office International des Epizooties, 393-409, Paris (1983)
- FRITSCHKE, S., STEINHART, H.: Differences in natural steroid hormone patterns of beef from bulls and steers, *J. Anim. Sci.* 76, 1621-1625 (1998)
- FRITSCHKE, S., SCHMIDT, G., SCHWARZ, F. J., KIRCHGEßNER, M., AUGUSTINI, C., STEINHART, H.: Natural hormone patterns of beef from bulls and steers depending on slaughter age, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207, 183-188 (1998a)
- FRITSCHKE, S., SCHWARZ, F. J., KIRCHGEßNER, M., AUGUSTINI, C., STEINHART, H.: Influence of sampling on steroid hormone patterns of beef from bulls and steers, *Meat Sci.* 50, 257-264 (1998b)

- FRITSCHKE, S., RUMSEY, T. S., MEYER, H. H. D., SCHMIDT, G., STEINHART, H.: Profiles of steroid hormones in beef from steers implanted with Synovex-S (estradiol benzoate and progesterone) in comparison to control steers, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 208, 328-331, (1999)
- GAIANI, R., CHIESA, F.: Physiological levels of androstendione and testosterone in some edible tissues from calves, bulls and heifers, *Meat Sci.* 17, 177-185 (1986)
- GETTYS, T. W., HENRICKS, D. M., SCHANBACHER, B. D.: An assessment of the relationship between tissue growth patterns and selected hormone profiles among sex phenotypes in cattle, *Anim. Prod.* 47, 335-343 (1988)
- GOTTHARD, W.: *Hormone - Chemische Botenstoffe*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, (1993)
- HAMOIR, T., COURTHEYN, D., DEBRABANDER, H., DELAHAUT, P., LEYSSENS, L., POTTIE, G.: Comparison of purification procedures for the isolation and detection of anabolic residues in faeces using gas chromatography-mass spectrometry, *Analyst* 123, 2621-2624 (1998)
- HAMPEL, M. R., PENG, L. H., PEARLMAN, M. R. J., PEARLMAN, W. H.: Acylation of [³H]corticosterone by acini from mammary gland of lactating rats: Localization of the acylated glucocorticoid in the nuclear fraction, *J. Biol. Chem.* 253, 8545-8553 (1978)
- HANCOCK, D. L., WAGNER, J. F., ANDERSON, D. B.: Effects of estrogens and androgens on animal growth, in *Growth regulation in farm animals, advances in meat research Vol. 7* (Pearson, M., Dutson, T. R., Eds.), Elsevier applied science, London, New York (1991)
- HARTMANN, S., STEINHART, H.: Simultaneous determination of anabolic and catabolic steroid hormones in meat by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 704, 105-117 (1997a)
- HARTMANN, S., STEINHART, H.: Necessity of enzymatic hydrolysis in steroid hormone analysis in beef, *Arch. Lebensmittelhyg.* 48, 111-115 (1997b)
- HARTWIG, M.: Bestimmung der geschlechtlichen Herkunft als Qualitätsparameter bei Rindfleisch anhand von Mustern natürlich vorkommender Sexualhormone, Dissertation, Universität Hamburg (1993)
- HARTWIG, M., HARTMANN, S., STEINHART, H.: Bestimmung natürlich vorkommender steroidal Sexualhormone (Androgene/Gestagene) in Rindfleisch, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 201, 533-536 (1995)
- HENRICKS, D. M.: TORRENCE, A. K.: Endogenous estradiol-17 β in bovine tissues, *J. Assoc. of Anal. Chem.* 61, 1280-1283 (1983)
- HENRICKS, D. M.: Assay of naturally occurring estrogens in bovine tissues in *Steroids in Anim. Production*, Intern. Symp. Warsaw, 161-170 (1980)
- HENRICKS, D. M., GRAY, S. L., HOOVER, J. L. B.: Residue levels of endogenous estrogens in beef tissues, *J. Anim. Sci.* 57, 247-255 (1983)
- HEINRITZI, K.: Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von Estron, Estradiol-17 β und Progesteron in verschiedenen Geweben vom Kalb und deren Anwendung im Rahmen von Rückstandsuntersuchungen, *Dissertation*, Technische Universität München (1974)

- HILLBRAND, F. W., ELSAESSER, F.: Concentrations of progesterone in the backfat of pigs during the oestrus cycle and after ovariectomy, *J. Reprod. Fert.* 69, 73-80 (1983)
- HOCHBERG, R. B., BANDY, L., PONTICORVO, L., LIEBERMAN, S.: Detection of a lipoidal substance that yields pregnenolone upon treatment with alkali, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (3): 941-945 (1977)
- HOCHBERG, R. B., BANDY, L., PONTICORVO, L., WECH, M., LIEBERMAN, S.: Naturally occurring lipoidal derivatives of 3 β -hydroxy-5-pregnen-20-one; 3 β ,17 α -dihydroxy-5-pregnen-20-one and 3 β -hydroxy-5-androsten-17-one, *J. Steroid Biochemistry* 11, 1333-1340 (1979)
- HOCHBERG, R. B., PAHUJA, S. L., LARNER, J. M., ZIELINSKI, J. E.: Estradiol-fatty acid esters - Endogenous long-lived estrogens, *New York Acad. of Sciences* 595, 74-92 (1990)
- HOCHBERG, R. B., PAHUJA, S. L., LARNER, J. M., ZIELINSKI, J. E.: Steroidal fatty acid esters, *Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 40, 577-585 (1991a)
- HOFFMANN, B., KARG, H., HEINRITZI, K. H., BEHR, H., RATTENBERGER, E.: Moderne Verfahren der Östrogenbestimmung und deren Anwendung für die Rückstandsproblematik, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 66, 20-37 (1975)
- HOFFMANN, B., RATTENBERGER, E.: Testosterone concentration in tissues from veal calves, bulls and heifers and in milk samples, *J. Anim. Sci.* 46, 639-641 (1977)
- HOFFMANN, B.: Use of radioimmunoassay for monitoring hormonal residues in edible animal products. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 61, 1280-1283 (1978)
- HOFFMANN, B.: Natural occurrence of steroid hormones in food producing animals in *Anabolics in animal production* (Meissonnier, E.), Office International des Epizooties, Paris, 215-231 (1983)
- HOFFMANN, B., BLIETZ, C.: Application of radioimmunoassay (RIA) for the determination of residues of anabolic sex steroids, *J. Anim. Sci.* 57, 239-246 (1983)
- HOFFMANN, B.: Use of radioimmunoassay procedures for the determination of sex hormones in animal tissues, *J. Steroid Biochem.* 19, 947-951 (1983)
- HOFFMANN, B., EVERS, P.: Anabolic agents with sex hormone-like activities: problems of residues, in: *Drug Residues in Animals*, 111-146, Academic Press, Orlando, London (1986)
- HSU, S.-H.; ECKERLIN, R. H., HENION, J. D.: Identification and quantitation of trenbolon in bovine tissue by gas chromatographie-mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 424, 219-229 (1988)
- HUNTER, R. A., MAGNER, T., ALLINGHAM, P. G.: Sustained growth promotion, carcass characteristics, and meat quality of steers treated with oestradiol-17 β , *Aust. J. Agric. Res.* 51, 133-138 (2000)
- INOUE, S., MORIMOTO, I., YAMASHITA, S., IZUMI, M., NAGATAKI, S.: Androgenmetabolism in rat L6 myoblast cells: high formation of 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol from testosterone, *J. Steroid. Biochem.* 35, 77-81 (1990)
- JANOCKO, L., LARNER, J. M., HOCHBERG, R.: The Interaction of C-17 Esters of Estradiol with the Estrogen Receptor, *Endocrinology* 114, 1180-1186 (1984)

- JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA), Fifty-second meeting, Rome, 2-11 February (1999)
- KAHL, S., BITMAN, J., RUMSEY, T.S.: Effect of Synovex-S on growth rate and plasma thyroid concentrations in beef cattle, *J. Anim. Sci.* 46, 232-237 (1978)
- KIRKWOOD, R. N., AHERNE, F. X.: Energy intake, body composition and reproductive performance of the gilt, *J. Anim. Sci.* 60, 1518-1529 (1985)
- KILLINGER, D. W., PEREL, E., DANILESCU, D., KHARLIP, L., LINDSAY, W. R. N.: Influence of adipose tissue distribution on the biological activity of androgens, *New York Acad. of Science* 595, 199-211 (1990)
- KUSHINSKY, S.: Safety aspects of the use of cattle implants containing natural steroids, *International symposium on the safety evaluation of animal drug residue*, Berlin (1983)
- LAPCÍK, O., HAMPEL R., HILL, M., STÁRKA, L.: Plasma levels of epitestosterone from prepuberty to adult life, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 55, 405-408 (1995)
- LARNER, J. M., PAHUJA, S. L., SHACKLETON, C. H., MCMURRAY, W. J., GIORDANO, G., HOCHBERG, R. B.: The isolation and characterization of estradiol-fatty acid esters in human ovarian follicular fluid, *J. Biol. Chem.* 19, 13893-13899 (1993)
- LAVALLÉE, B., PROVOST, P. R., ROY, R., GAUTHIER, M.-C., BÉLANGER, A.: Dehydroepiandrosterone-fatty acid esters in human plasma: formation, transport and delivery to steroid target tissues, *J. Endocrinol.* 150, 119-124 (1996)
- LAUDERDALE, J. W.: Use of MGA (melengestrol acetate) in animal production, in *Anabolics in Animal Production* (Meissonnier, E., Ed.), Office International des Epizooties, Paris, 193-212 (1983)
- LEE, F.-T., ADAMS, J. B., GARTON, A. J., YEAMAN, S. J.: Hormone sensitive lipase is involved in the hydrolysis of lipoidal derivatives of estrogens and other steroid hormones, *Biochim. Biophys. Acta* 963, 258-264 (1988)
- LONE, K. P.: Natural sex steroids and their xenobiotic analogs in animal production: growth, carcass quality, pharmacokinetics, metabolism, mode of action, residues, methods, and epidemiology, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37, 93-209 (1997)
- LONGSCOPE, C., PRATT, J. H., SCHNEIDER, S. H., FINEBERG, S. E.: The in vivo metabolism of androgens by muscle and adipose tissue of normal males, *Steroids* 28, 521-533 (1976a)
- LONGSCOPE, C., PRATT, J. H., SCHNEIDER, S. H., FINEBERG, S.: In vivo studies on the metabolism of estrogens by muscle and adipose tissue of normale males; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43, 1134-1145 (1976b)
- LÖFFLER, G., PETRIDIS, P. E.: *Physiologische Chemie*, 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin (1988)
- MADER, T. L., DAHLQUIST, J. M., SINDT, M. H., STOCK, R. A., KLOPFENSTEIN, T. J.: Effect of sequential implanting with Synovex on steer and heifer performance, *J. Anim. Sci.* 72, 1095-1100 (1994)

- MARGRAF, H. W., MARGRAF, C. O., WEICHSELBAUM, T. E.: Isolation and identification of adrenocortical steroids in human peripheral blood, *Steroids* 2, 155-165 (1963)
- MCCRACKEN, J. A.: Progesterone in the body fat of the dairy cow, *J. Endocrin.* 28, 339-340 (1964)
- MEYER, H. H. D., HERGES, C., LANDWEHR, M., KARG, H.: Möglichkeiten der Erkennung des illegalen Einsatzes von Östradiolbenzoat in der Kälbermast durch Steroidöstrogenbestimmung in Kot und Plasma, *Arch. Lebensmittelhyg.* 36, 27-30 (1985a)
- MEYER, H. H. D., RAPP, M., LANDWEHR, M.: Analytische Erfassung und Bewertung natürlicher Steroidöstrogene im eßbaren Gewebe und in Galle unbehandelter und mit dem Östrogenpräparat „Compudose“ behandelter Mastkälber, *Arch. Lebensmittelhyg.* 36, 5-8 (1985b)
- MEYER, H. H. D.: Kontrolle verschiedener anaboler Sexualhormone in Fleisch und Fleischprodukten: Trennung mittel HPLC und immunologische Bestimmung, *Arch. Lebensmittelhyg.* 41, 4-7 (1990)
- MEYER, H. H. D., KARG, H.: Aktualisierte Wertung der Masthilfsmittel Trenbolonacetat, Zeranol und Melengestrolacetat (Überlegungen zum „Hormonstreit“ zwischen der EU und den USA bei der WTO), *Arch. Lebensmittelhyg.* 50, 28-37 (1999)
- NOUROOZ-ZADEH, J.: Determination of autoxidation produkts from free or total cholesterol: a new multistep enrichment methodology including the enzymatic release of esterified cholesterol, *J. Agric. Food Chem.* 38, 1667-1673 (1990)
- ONO, Y., SOLOMON, M. B., ELSASSER, T. H., RUMSEY, T. S., MOSELEY, W. M.: Effects of Synovex-S and recombinant bovine growth hormone (Somavubove) on growth response of steers: II. Muscle morphology and proximate composition of muscles, *J. Anim. Sci.* 74, 2929-2934 (1996)
- OTTO, R., REIMANN, W., SCHWARZ, F. J., KIRCHGEßNER, M.: Nährstoffgehalte von Muskel-, Fett- und Knochengewebe sowie Sehnen des Schlachtkörpers wachsender Mastrinder der Rasse Deutsches Fleckvieh bei unterschiedlicher Fütterungsintensität: 2. Mitteilung – Protein-, Fett- und Aschegehaqlt in grobgeweblich zerlegten Teilstücken von Ochsen, *Arch. Anim. Nutr.* 43, 331-343 (1993)
- PARIS, A., RAO, D.: Biosynthesis of estradiol-17 β fatty acyl esters by microsomes derived from bovine liver and adrenals, *J. Steroid. Biochem.* 33, 465-472 (1989)
- PARIS, A., DOLO, L., DEBRAUWER, L., RAO, D.: Analysis of [³H]estradiol-17beta metabolites in calf perirenal fat, *Analyst* 119, 2623-2626 (1994)
- PATTERSON, R. L. S., SLATER, L. J.: Anabolic agents and meat quality: a review, *Meat Sci.* 14, 191-220 (1985)
- PETERSEN, H.: *Grundlagen der deskriptiven und mathematischen Statistik*, ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG, Landsberg (1991)
- PETZ, M.: Tierarzneimittelrückstände in Fleisch – Möglichkeiten ihrer analytischen Erfassung, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 82, 7-23 (1991)
- PRESTON, R. L., BARTLE, S. J., KASSER, T. R., DAY, J. W., VEENHUIZERN, J. J., BAILE, C. A.: Comparative effectiveness of somatotropin and anabolic steroids in feedlot steers, *J. Anim. Sci.* 73, 1038-1047 (1995)

- REBUFFÉ-SCRIVE, M., BRÖNNEGARD, M., NILSSON, A., ELDH, J., GUSTAFSSON, J.-A., BJÖRNTORP, P.: Steroid hormone receptors in human adipose tissue, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71, 1215-1219 (1990)
- REGELSON, W., KALIMI, M.: Dehydroepiandrosterone (DHEA) - the multifunctional steroid, *New York Acad. of Sciences* 719, 564-575 (1994)
- RUMSEY, T. S.: Effect on Synovex-S ear implants and kiln dust on tissue gain by feed lot steers, *J. Anim. Sci.* 54, 1030-1039 (1982)
- RUMSEY, T. S., OLTJEN, R. R., KOZAK, A. S.: Implant Absorption, performance and tissue analysis for beef steers implanted with diethylstilbestrol and fed an all concentrate diet, *J. Anim. Sci.* 39, 1193-1199 (1974)
- RUMSEY, T. S., ELSASSER, T. H., KAHL, S., MOSELEY, H. M., SOLOMON, M. B.: Effects of Synovex-S and recombinant bovine growth hormone (Somavubov) on growth response of steers: I. performance and composition of gain, *J. Anim. Sci.* 74, 2917-2928 (1996)
- RUMSEY, T. S., HAMMOND, A. C., MCMURTRY, J. P.: Response to reimplanted beef steers with estradiol benzoate and progesterone: performance, implant adsorption pattern, and thyroxine status, *J. Anim. Sci.* 70, 995-1001 (1992a)
- RUMSEY, T. S., ELSASSER, T. H., NORTON, S. A., KOZAK, A. S., KAHL, S.: Influence of thyroid status regulation and Synovex-S implants on growth performance and tissue gain in beef steers, *Domest. Anim. Endocrinol.* 9, 173-180, (1992b)
- SACHS, L.: *Angewandte Statistik: Planung und Auswertung, Methoden und Modelle*, Springer-Verlag, 4. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York (1974)
- SANTARIUS, K., RAPP, M.: Hormon-Rückstandsuntersuchungen - Ist die Stichprobenentnahme in bisheriger Weise noch gerechtfertigt?, *Fleischwirtsch.* 70, 408-411 (1990)
- SAUERWEIN, H.: Hormonale Wachstumsregulation – Untersuchungen zur Wirkungsweise sexualhormonwirksamer Anabolika am Rind, *Dissertation*, Technische Universität München (1988)
- SAUERWEIN, H., MEYER, H. H. D.: Androgen and estrogen receptors in bovine skeletal muscle: relation to steroid induced allometric muscle growth, *J. Anim. Sci.* 67, 206-212 (1989)
- SCHATZ, F., HOCHBERG, R. B.: Lipoidal derivative of estradiol: the biosynthesis of a nonpolar estrogen metabolite, *Endocrinology* 109, 697- 703 (1981)
- SCHINDLER, A. E., EBERT, A., FRIEDRICH, E.: Conversion of androstendione to estrone by human fat tissue, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36, 627-630 (1972)
- SCHMARR, H.-G., GROSS, H. B., SHIBAMOTO, T.: Analysis of polar cholesterol oxidation products: evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 44, 512-517 (1996)
- SCIPPO, M. L., GASPAR, P., DEGAND, G., BROSE, F., MAGHUIN-ROGISTER, G., DELAHAUT, P., WILLEMART, J. P.: Control of the illegal administration of natural steroid hormones in urine and tissues of veal calves and in plasma of bulls, *Anal. Chim. Acta* 275, 57-74 (1993)

- SCIPPO, M. L., DEGAND, G., DUYKAERTS, A., MAGHUIN-ROGISTER, G., DELAHAUT, P.: Control of the illegal administration of natural steroid hormones in the plasma of bulls and heifers, *Analyst* 119, 2639-2644 (1994)
- SIMONTACCHI, S., MARINELLI, L., GABAI, G., BONO, G., ANGLETTI, R.: Accuracy in naturally occurring anabolic steroid assay in cattle and first approach to quality control in Italy, *Analyst* 124, 307-312 (1999)
- SJÖVALL, J., AXELSON, M.: Newer approaches to the isolation, identification, and quantitation of steroids in biological materials, *Vitamins and Hormones* 39, 31-144 (1982)
- SMETS, F., VANDERWALLE, M.: Purification of biological samples by HPLC for the simultaneous determination of anabolics by HPTLC, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 175, 29-30 (1982)
- SMETS, F., VANHOENACKERE, C., POTTIE, G.: Influence of matrix and applied method on the detection of anabolic residues in biological samples, *Anal. Chim. Acta* 275, 147-162 (1993)
- SMITH, D. L., ESTERGREEN, V. L., MARTIN, E. L., LIN, M. T., MOSS, G. E., FRANDLE, K. A., KLICKER, R. K., LUEDEMEN, R. L., BRANEN, A. L., LUEDECKE, L. O., SHIMODA, W.: Distribution of ¹⁴C-progesterone in cattle tissue fluids and excreta, *J. Anim. Sci.* 41, 380-383 (1975)
- SNOW, D. H.: Anabolic steroids, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 9, 563-576 (1993)
- STAN, H.-J., HOHLS, F. W.: Nachweis von Trenbolon- und Testosteron-Rückständen in Fleisch durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 169, 266-270 (1979)
- STAN, H.-J., ABRAHAM, B.: Determination of residues of anabolic drugs in meat by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 195, 231-241 (1980)
- STATISTISCHES BUNDESAMT, *Land-, Forstwirtschaft und Fischerei, Fachserie 3* (1997)
- STRYER, L.: *Biochemie*, völlig neubearbeitete Auflage, Spektrum der Wissenschaften-Verlag, Heidelberg (1990)
- SWEETEN, M. K., CROSS, H. R., SMITH, G. C., SMITH, S. B.: Subcellular distribution and composition of lipids in muscle and adipose tissue, *J. Food Sci.* 55, 43-45 (1990)
- TAYLOR, R. B., KENDLE, K. E., REID, G. G., HUNG, C. T.: Chromatography of progesterone and its major metabolites in rat plasma using microbore high performance liquid chromatography columns with conventional injection and detection systems, *J. Chromatogr.* 385, 383-392 (1987)
- THIELE, O. W.: *Lipide, Isoprenoide mit Steroiden*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1979)
- THOMAS, D. G., BELL, B. R.; MILLER, J. K.; ERICKSON, B. H.; MUELLER, F. J.; HOLMES, C. R.: Differences in ¹⁷ β -estradiol and progesterone concentrations between prepartum Holstein and Jersey cows, *J. Dairy Sci.* 75, 239-242 (1992)
- TSUJIOKA, T., ITO, S.: Female sex steroid residues in the tissues of steers treated with progesterone and oestradiol-¹⁷ β , *Res. Vet. Sci.* 52, 105-109 (1992)

TWOMBLEY, G. H., BASSET, M., MEISEL, D., LEVITZ, M.: Estrogen storage in fat, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 99, 785-795 (1967)

VAN LOOK, L., DESCHUYTERE, P., VAN PTEGHAM, C: Thin-layer chromatographic method for the detection of anabolics in fatty tissue, *J. Chromatogr.* 489, 213-218 (1989)

VERBEKE, R: Sensitive multi-residue method for detection of anabolics in urine and tissues of slaughtered animals, *J. Chromatogr.* 177, 69-84 (1979)

WÄHNER, M., SCHNURRBUSCH, U., ENGELHARDT, S., GOTTSCHALK, J., SCHARFE, PFEIFFER, H.: Zur Konzentration von 17- β -Östradiol und Progesteron in der Follikelflüssigkeit sowie im Muskel- und Fettgewebe bei Schweinen in Abhängigkeit vom Sexualzyklus, *Züchtungskunde* 65, 370-381 (1993)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Gabi Schmidt

geboren am 11. Mai 1972 in Hamburg

Schulbildung

August 1978 - Mai 1991

Besuch der Wichern-Schule,
Hamburg, Abschluß Abitur

Studium

Oktober 1991 – August 1995

Studium der Lebensmittelchemie, Universität Hamburg

August 1995 - Mai 1996

Diplomarbeit, Titel:
„Bestimmung der Steroidhormon-muster verschiedener
Rindfleisch-gewebe in Abhängigkeit physiologischer
und Produktions-parameter“

Mai 1996 - Oktober 1996

Erstes Staatsexamen

Praktisches Jahr

November 1996 - April 1997

Erste Hälfte des praktischen Jahres für
Lebensmittelchemiker bei der
Gesellschaft für Bioanalytik, Hamburg

Mai 1997 - Oktober 1997

Zweite Hälfte des praktischen Jahres
für Lebensmittelchemiker am
Hygiene Institut Hamburg

November 1997 – März 1998

Zweites Staatsexamen

Berufstätigkeit

April 1998 – Juni 2001

Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der
Abteilung für Lebensmittelchemie der
Universität Hamburg mit dem Ziel der Promotion