

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.