

4. EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

4.1. Dehydroepiandrosteron (DHA)

Dieser Versuch sollte Aufschluß geben über die Verstoffwechslung von DHA beim Pferd: Absorptions- und Eliminationskurven des Stoffes im Blut und Urin sollten erstellt sowie die häufigsten Metaboliten bestimmt werden.

VERSUCH A

Die Abb. 9a+b zeigen die Positionen der Markierungen von deuteriertem (D_2 -DHA) und Tritium-markiertem (3H -DHA) Dehydroepiandrosteron (DHA).

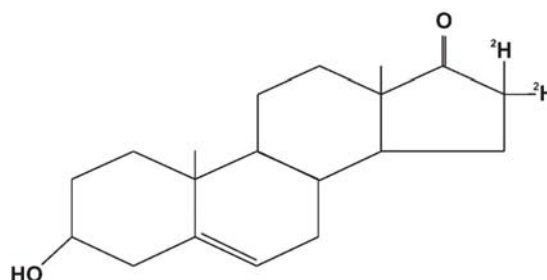


Abb. 9a: Deuteriertes Dehydroepiandrosteron (D_2 -DHA).

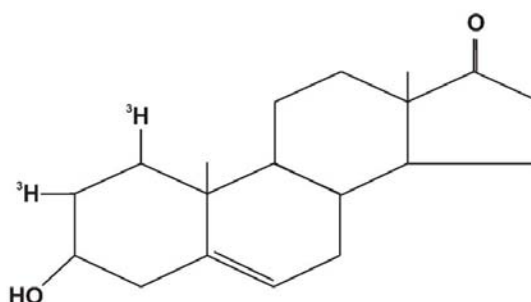


Abb. 9b: Tritium-markiertes Dehydroepiandrosteron (3H -DHA).

4.1.1. Verabreichte Dosis

Tabelle 10 gibt Auskunft, über die an die beiden Versuchspferde (Nr. 2 und 3) verabreichte Gesamtdosis. Die Verabreichung der Dosis erfolgte intramuskulär (i.m.) in die Glutäalmuskulatur (s. 3.3.2.1. Intramuskuläre Applikation von Dehydroepiandrosteron (DHA)).

Tab. 10: Übersicht, über die in VERSUCH A an die beiden Versuchpferde verabreichte Gesamtdosis von Dehydroepiandrosteron (DHA)

Pferd Nr.	DHA (mg)	D ₂ -DHA (mg)	³ H-DHA (μCi)
2	100	100	245,5
3	100	100	248,6

4.1.2. Tierexperiment

Tab. 11: Übersicht, über die in VERSUCH A eingesetzten Pferde

Pferd Nr.	Gewicht (kg)
2	458
3	476

4.1.2.1. Blutspiegelverlauf von ³H-DHA-Äquivalenten

Nach einer einmaligen intramuskulären Applikation von ³H-DHA zeigte der Abfall der Plasmakonzentration bei semilogarithmischer Darstellung einen biexponentiellen Verlauf. Für die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter wurde deshalb das Zwei-Kompartiment-Modell gewählt. Der Blutspiegelverlauf ist in Abb. 10 dargestellt. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 12 aufgeführt.

Tab. 12: Pharmakokinetische Parameter von ³H-DHA im Plasma nach einmaliger intramuskulärer Applikation an zwei Vollblutrennpferde

Parameter	Pferd Nr.	
	2	3
K _a (h ⁻¹)	1,390	0,346
K _{el} (h ⁻¹)	0,058	0,074
t _½ (h)	11,9	9,3
C _{max} (DPM / ml)	828	723
t _{max} (h)	2,5	7,0

DPM = Disintegrations per minute (radioaktive Zerfälle pro Minute)

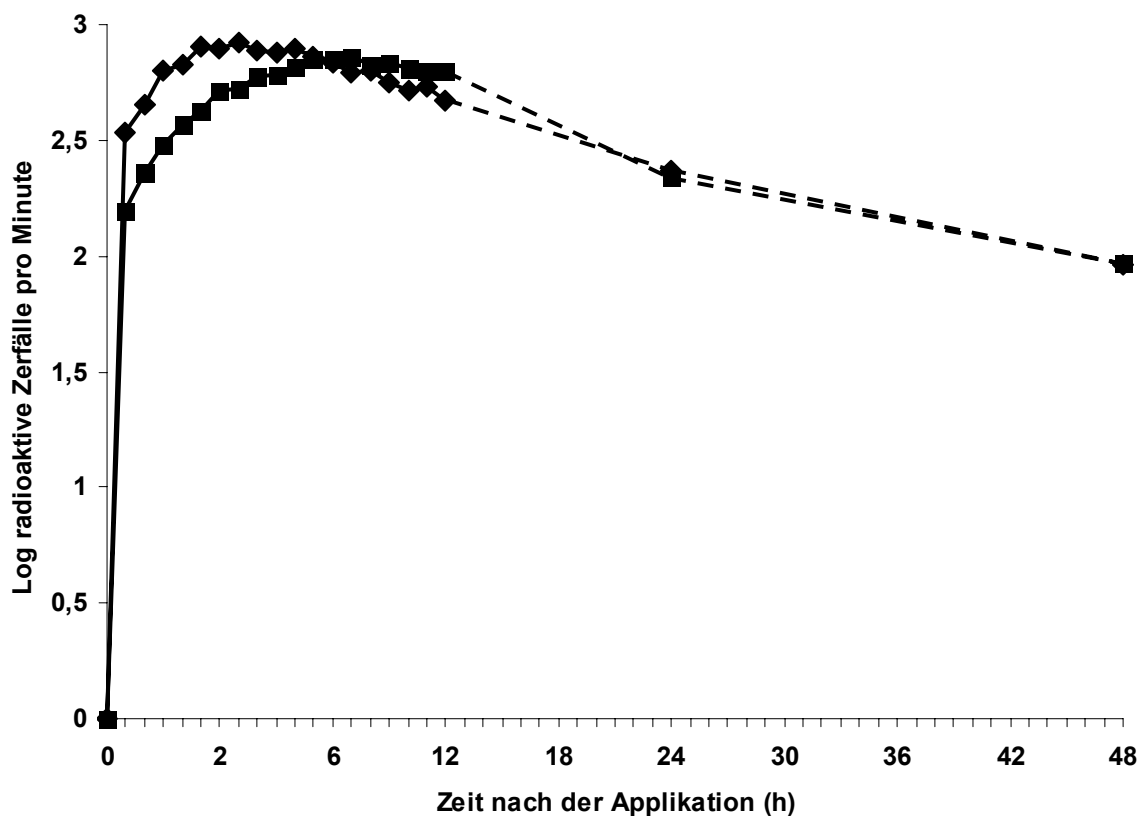


Abb. 10: Verlauf der Plasmakonzentration nach intramuskulärer Gabe von ^3H -DHA bei zwei Versuchspferden (▲ = Pferd 2; ■ = Pferd 3). Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Bestimmungen im Plasma dar.

Hervorzuheben ist der höhere Wert für die Resorptionskonstante k_a bei Pferd 2. Auch die Maximalkonzentration im Plasma (C_{\max}) wird bei diesem Pferd in der relativ kürzeren Zeit von 2,5 h erreicht; im Gegensatz zu 7,0 h bei Pferd 3 (Abb. 10 und Tab. 12). Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) ist bei Pferd 3 um 2,6 h kürzer als bei Pferd 2. Bei Pferd 3 ist auch die Maximalkonzentration (C_{\max}) im Plasma geringer (Abb. 10 und Tab. 12).

4.1.2.2. Urinausscheidung von ^3H -DHA-Äquivalenten.

In den Abb. 11 + 12 und der Tab. 13 sind die wichtigsten Parameter der Ausscheidung über den Urin von intramuskulär verabreichten ^3H -DHA bei zwei Vollblutrennpferden zusammengefaßt.

Tab. 13: Ausgewählte Parameter zur Urinausscheidung von intramuskulär verabreichten ^3H -DHA bei zwei Vollblutrennpferden

Parameter		Pferd Nr.	
		2	3
Zeitpunkt der letzten Urinprobe	(h)	117,45	118,75
Anteil Urinausscheidung zu Gesamtdosis ¹	(%)	59,47	63,58
Zeitpunkt - kumulative Urinausscheidung $\geq 95\%$ ²	(h)	52,37	40,10
Prozentsatz - kumulative Urinausscheidung $\geq 95\%$ ³	(%)	97,65	95,53

- 1 = Prozentsatz, der mit dem Urin ausgeschiedenen, radioaktiven ^3H -DHA-Äquivalente des insgesamt intramuskulär verabreichten ^3H -DHA
- 2 = Zeitpunkt, zu dem $\geq 95\%$ der insgesamt über den Urin ausgeschiedenen ^3H -DHA-Äquivalente angefallen waren
- 3 = Kumulativer Prozentsatz an ^3H -DHA-Äquivalenten zum Zeitpunkt 2

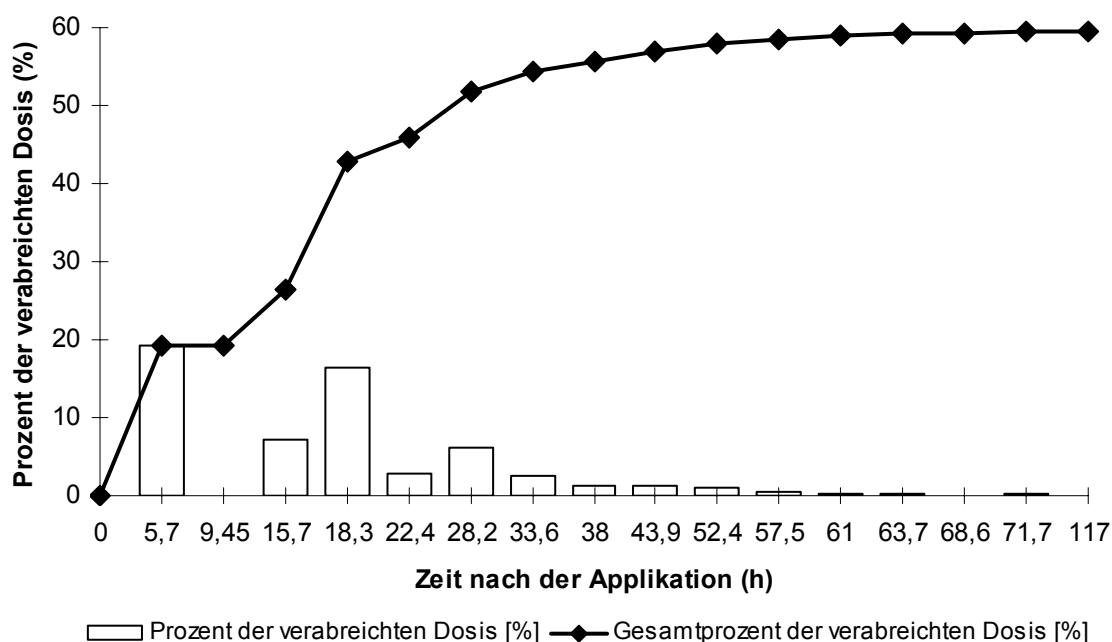


Abb. 11: Verlauf der Urin-Radioaktivität von ^3H -DHA nach intramuskulärer Gabe an Pferd 2. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Bestimmungen im Urin dar. Darstellung der Ausscheidung der verabreichten radioaktiven Dosis in Prozent pro gesammelter Probe (Balken) und kumulativ (Linie und Markierungen).

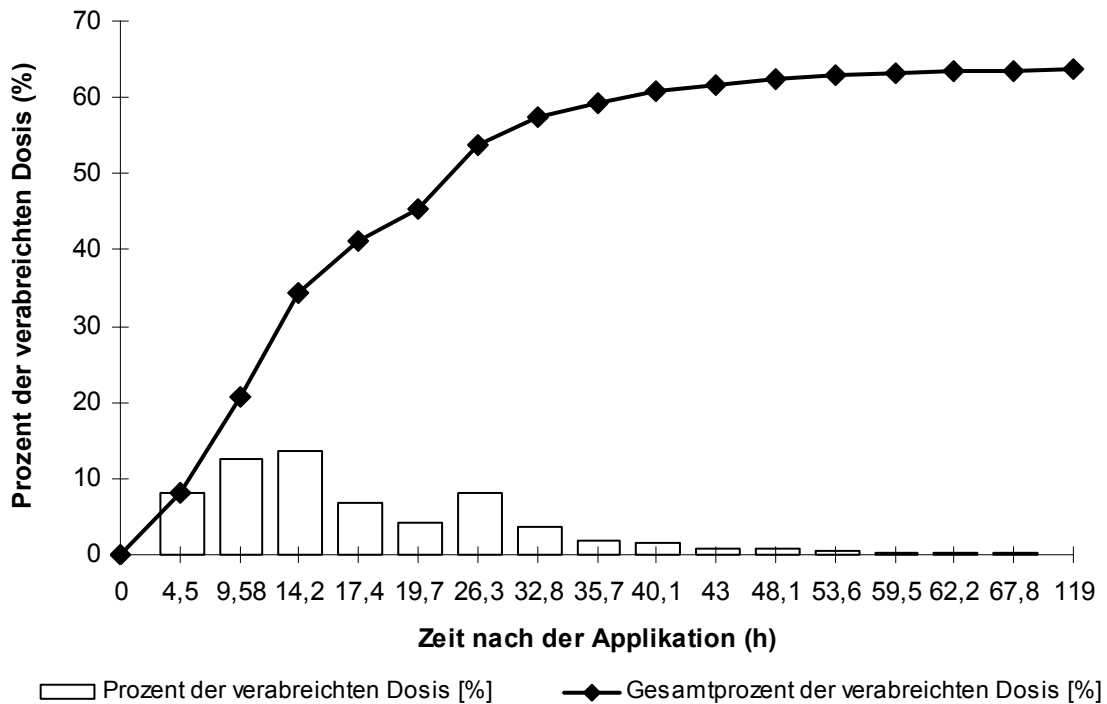


Abb. 12: Verlauf der Urin-Radioaktivität von ³H-DHA nach intramuskulärer Gabe an Pferd 3. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Bestimmungen im Urin dar. Darstellung der Ausscheidung der verabreichten radioaktiven Dosis in Prozent pro gesammelter Probe (Balken) und kumulativ (Linie und Markierungen).

Bei beiden Versuchspferden bewegte sich die im Vergleich zur ursprünglich verabreichten Dosis insgesamt mit dem Urin ausgeschiedene Wirkstoffmenge etwa im Bereich von 60% bis zum Abschluß der Urinsammelperiode nach fünf Tagen (Abb. 11 + 12 und Tab. 13). Abhängig von Zeitpunkt und Volumen der einzelnen Urinproben wurden $\geq 95\%$ des insgesamt über den Urin ausgeschiedenen Anteils an ³H-DHA-Äquivalenten in einem Zeitraum von 40 - 50 Stunden nach der Applikation eliminiert (Tab. 13). In den nachfolgend anfallenden Urinproben betrug die jeweils ausgeschiedenen Wirkstoffmengen weniger als 1% der verabreichten Gesamtdosis; bis sie sich etwa 120 Stunden nach der Applikation nur noch in einem Bereich von $< 0,05\%$ der verabreichten Gesamtdosis bewegten (Abb. 11 + 12).

Der U₂₄-Pool wurde aus folgenden Urinproben erstellt:

- Pferd 2: U₁-U₅
- Pferd 3: U₁-U₅

4.1.2.3. Auftrennung der Metaboliten von ³H-DHA im Urin

Die Untersuchungen erfolgten für jedes Pferd in den gepoolten, über 24 Stunden fraktioniert gesammelten Urinproben (U₂₄).

Wiederauffindung

Bei der Durchführung der Urinanalyse nach Methode A (s. 3.5.1.1.) kam es zu Verlusten an Radioaktivität sowohl bei der Etherextraktion (ca. 10 - 17%) (Tab. I - im Anhang), als auch bei der nachfolgenden Kartuschenextraktion und Hydrolyse der Konjugate (Tab. I - im Anhang), so daß die Gesamtwiederauffindung zwischen 55 – 95% stark variierte. Auch die Extraktion verschiedener Urinproben nach Methode B (s. 3.5.1.2.) brachte keine Verminderung der Verluste, wies jedoch ein anderes Verhältnis der GFR- und SFR-Metaboliten auf (Tab. II - im Anhang).

Daraufhin wurden verschiedene weitere Versuche zur Optimierung der Urinanalyse und zur Hydrolyse der konjugierten Metaboliten durchgeführt (s. 3.5.1.3. Änderung in den Verfahren zur Extraktion). Tabelle 14 gibt Auskunft über die verschiedenen Änderungen in den Verfahren zur Extraktion.

Tab. 14: Änderungen in den Verfahren zur Extraktion von U₂₄ nach intramuskulärer Applikation von ³H-DHA

Extraktionsmethode	Anmerkung	Ergebnis
Methanolyse	Überprüfung der Wirksamkeit der Solvolyse-Reaktion	Keine Verbesserung der Wiederauffindung
Saure Hydrolyse (Tab. III – im Anhang)	Überprüfung der Wirksamkeit der Hydrolyse mit β-Glucuronidase und der Solvolyse-Reaktion	Keine Verbesserung der Wiederauffindung
XAD ₂ -Säule	Überprüfung der Kapazität der SepPak C ₁₈ -Kartusche	Zu geringe Kapazität und / oder Adsorptionsfähigkeit der SepPak C ₁₈ -Kartusche
Gesättigte NaHCO ₃ -Lösung	Überprüfung der Extraktion saurer Metaboliten in die Waschlösungen	Keine Verbesserung der Wiederauffindung

Die Extraktion von U_{24} über eine XAD_2 -Säule verringerte den Verlust in den U_{NE} auf 1,1%. Die Gesamtwiederauffindbarkeit lag jedoch weiterhin nur bei 73% (Ergebnisse nicht gezeigt). Die geringen Verluste in den U_{NE} schienen zu bestätigen, daß die verwendete SepPak C_{18} -Kartuschen keine ausreichende Kapazität und / oder Adsorptionsfähigkeit für alle im Urin enthaltenen DHA-Metaboliten besaßen. Daraufhin wurden verschiedene andere Kartuschen auf ihre Eignung zur vollständigen Adsorption und Extraktion der DHA-Metaboliten überprüft (s. Verwendung unterschiedlicher Kartuschen zur Extraktion).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß keine dieser in Tab. 14 beschriebenen Änderungen der Extraktionsmethode eine wesentliche Verbesserung der Extraktionsergebnisse im Sinne einer verbesserten Gesamtwiederauffindung erbracht hat.

Verwendung unterschiedlicher Kartuschen zur Extraktion

1. *Überprüfung der Kapazität und Adsorptionsfähigkeit der üblicherweise verwendeten C_{18} -Kartusche {SepPak/Part.Nr.: 51 910}*

Mehrere Proben von 5 bzw. 10 ml eines mit 3H -DHA markierten Urins unbehandelter Pferde (14,5 μCi DHA in 50 ml Urin) wurden mittels der üblichen C_{18} -Kartusche extrahiert. Die Verluste an Radioaktivität, die nach der Extraktion im Urin (U_{NE}) verblieb, waren geringer (<10%), als bei den unter 4.1.2.3. *Auftrennung der Metaboliten von 3H -DHA im Urin* beschriebenen, mit U_{24} durchgeführten, Extraktionen nach Methode A und B (15 - 30%, Tab. I & II - im Anhang). Durch Verwendung von Proben von 5 ml bzw. 10 ml markierten Urins sollte festgestellt werden, ob die Verdoppelung des Urinvolumens zu einer Erschöpfung der Kartuschen-Kapazität und damit zur Verringerung der Kartuschen-Adsorptionsfähigkeit des radioaktiv markierten DHA führen würde. Dies war jedoch nicht der Fall, da auch bei den 10 ml Proben die Verluste in den U_{NE} unter 10% lagen. So konnte vermutet werden, daß die auftretenden Verluste eher durch die chemische Struktur und damit evtl. einhergehende Nicht-Adsorbierbarkeit an die C_{18} -Ketten der Kartusche einiger, der entstanden DHA-Metaboliten verursacht wurden.

2. *Extraktion mittels einer Starken-Anionen-Austauscher-Kartusche (BondElut SAX-Cartridge)*

Es sollte untersucht werden, ob die Verluste an Radioaktivität in den U_{NE} durch das Vorkommen stark anionischer Metaboliten, welche von der üblichen C_{18} -Kartusche nicht gebunden werden, verursacht würden. Der auf pH 8,0 eingestellte U_{24} wurde mit 10%iger Essigsäure in Methanol extrahiert. Es wurde jedoch ein noch größerer Verlust in den U_{NE}

beobachtet (58,6%) als bei der Verwendung der üblichen Kartusche. Damit konnte das Vorkommen eines 'stark' anionischen Metaboliten weitestgehend ausgeschlossen werden.

3. *Extraktion mittels verschiedener SepPak C₁₈-Kartuschen mit unterschiedlicher Kapazität*

Je 10 ml U₂₄ wurden mittels folgender C₁₈-Kartuschen extrahiert:

- | | |
|-------------------------------------|------------------|
| 1. SepPak C ₁₈ Plus | Part Nr.: 20 515 |
| 2. SepPak C ₁₈ Plus Env. | Part Nr.: 23 635 |
| 3. SepPak tC ₁₈ | Part Nr.: 36 810 |
| 4. SepPak tC ₁₈ Plus | Part Nr.: 36 800 |
| 5. SepPak tC ₁₈ | Part Nr.: 36 815 |

Mit einigen der verwendeten Kartuschen konnte eine starke Verbesserung des Extraktionsergebnisses aus dem U₂₄, d.h., eine zum Teil erhebliche Reduzierung der Verluste in den U_{NE} erreicht werden (Tab. IV - im Anhang). Es wurde nun davon ausgegangen, daß zumindest ein Teil dieser Verluste durch eine zu geringe Kapazität der üblicherweise verwendeten C₁₈-Kartusche verursacht wurden, wenn dies auch im Gegensatz zu den unter 1. *Überprüfung der Kapazität und Adsorptionsfähigkeit der üblicherweise verwendeten C₁₈-Kartusche {SepPak/Part Nr.: 51 910}* erzielten Ergebnissen zu stehen schien. Zur weiteren Extraktion der DHA-Metaboliten aus dem U₂₄ wurden daraufhin nachfolgend SepPak tC₁₈-Kartuschen verwendet.

Überprüfung weiterer, möglicher Ursachen für die auftretenden Verluste

1. *Ausschluß von Rückaustauschphänomenen der ³H-Atome*

Um das Phänomen eines Rückaustausches von ³H aus dem radioaktiv markierten DHA gegen ein H-Atom des Urinwassers ausschließen zu können, wurden verschiedene U₂₄-Proben destilliert oder lyophilisiert. Durch die Destillation wurde das Urinwasser von allen darin gelösten Bestandteilen, also auch von den radioaktiv-markierten DHA-Metaboliten, getrennt. Hätte ein Austausch von H-Atomen stattgefunden, dann hätte das Urinwasser auch nach der Destillation noch einen recht hohen Gehalt an Radioaktivität aufgewiesen.

Auch durch die Lyophilisierung wurde das Urinwasser von den darin gelösten Bestandteilen getrennt. Anschließend wurden die verbliebenen, pulverförmigen Feststoffe wieder in destilliertem Wasser gelöst, bis das Volumen nach der Lyophilisierung dem ursprünglichen Urinvolumen entsprach. Im Falle eines Austauschs von H-Atomen wäre die anschließend gemessene Radioaktivität der Lösung deutlich geringer als im ursprünglichen Urinwasser.

Die bei beiden Versuchen jeweils vorher und nachher bestimmte Radioaktivität ergab jedoch keinen Hinweis auf das Vorkommen eines solchen Phänomens (Ergebnisse nicht gezeigt).

2. *Ausschluß einer Metaboliten-Proteinbindung*

Um eine möglicherweise vorhandene Proteinbindung und dadurch bedingte Nicht-Extrahierbarkeit einzelner Metaboliten auszuschließen, wurden 400µl von U₂₄ über einen 'Milipore-Filter' bei 4000U/min. für eine Stunde zentrifugiert. An Proteine gebundene Metaboliten besäßen eine so hohe Polarität, daß sie durch die C₁₈-Ketten der SepPak-Kartuschen nicht adsorbiert, sondern im nach der Extraktion wiedergewonnenen Urin verbleiben würden. Es ergaben sich jedoch auch keine Hinweise auf das Vorkommen einer Metaboliten-Protein-Bindung (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.1.2.4. Metabolisches Profil von ³H-DHA-Äquivalenten

Die bei den beschriebenen Versuchen gewonnenen Extrakte von ³H-DHA-Äquivalenten wurden auf unterschiedliche Weise weiter aufgearbeitet und derivatisiert.

1. *Versuch der Charakterisierung von DHA-Metaboliten der FREIEN Fraktion (FFR)*

Die aus 50 ml U₂₄ durch Ethylacetat entzogenen, FREIEN Metaboliten (s. 3.5.1.3. Änderung in den Verfahren zur Extraktion - 2. Saure Hydrolyse der konjugierten Metaboliten im Urin nach Ethylacetat-Extraktion) wurden nach Waschung und Trocknung des Extraktes entweder derivatisiert nach DERIVAT.1 (s. 3.5.4.1. MO-TMS-Derivatisierung) oder durch fraktionierte Chromatographie (s. 3.5.2.1. Säulenchromatographie) weiter aufgeschlüsselt. Die zweimalige fraktionierte Chromatographie des Ethylacetat-Extraktes zeigte im Radiochromatogramm in der FREIEN Fraktion insgesamt acht Peaks verschiedener Metaboliten. Das Ergebnis der fraktionierten Chromatographie der FFR des Ethylacetat-Extraktes von Pferd 2 ist in Tab. 15 zusammengefaßt. Der höchste Prozentsatz an Radioaktivität aller Fraktionen fand sich im Methanol-Extrakt (10,8%), der zur abschließenden Reinigung der Kieselgelsäule verwendet wurde; während keine der anderen Fraktionen mehr als 5,1% der Radioaktivität enthielt. Die beiden neu entstandenen Proben A und B (Tab. 15) wurden jeweils einzeln einer weiteren, fraktionierten Chromatographie unterzogen (Abb. 13a+b und Tab.16).

Bei dieser zweiten Chromatographie zeigte Probe A einen Peak eines Metaboliten (Abb. 13a), Probe B fünf Peaks verschiedener Metaboliten (Abb. 13b), während bei beiden Proben auch der Methanol-Extrakt wieder einen hohen Anteil an Radioaktivität aufwies (Tab. 16).

Tab. 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der fraktionierten Chromatographie des Ethylacetat-Extraktes der unkonjugierten ³H-DHA-Metaboliten von Pferd 2

Lösung	Prozent Radioaktivität des extrahierten U ₂₄ (%)
Ethylacetat-Extrakt	27,7
Peak 1 – Fraktion 4 – 11 = Probe A	6,9
Peak 2 – Fraktion 12 – 35 = Probe B	3,5
Peak 3 – Methanol-Extrakt	10,8
Wiederauffindung	21,3

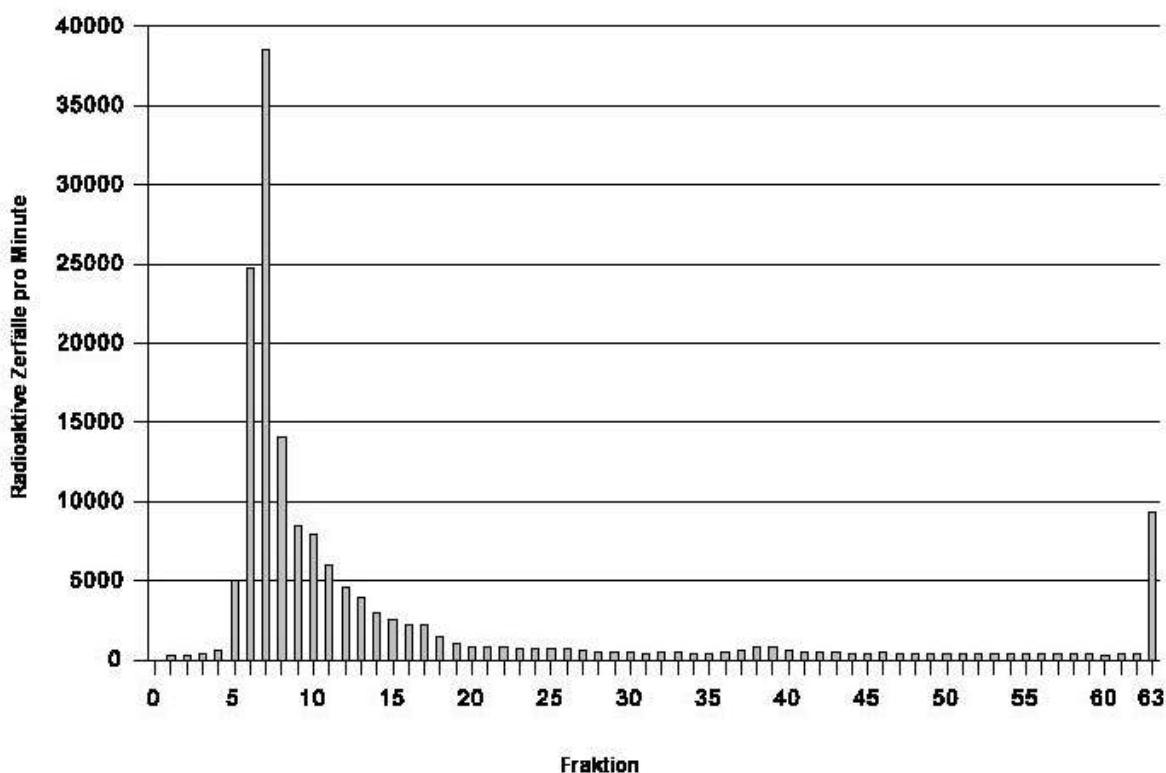


Abb. 13a: Verteilung der Radioaktivität nach fraktionierter Chromatographie der kombinierten Fraktionen 4 – 11 aus der vorherigen, fraktionierten Chromatographie der FREIEN Metaboliten des Ethylacetat-Extraktes. (Pferd 2 – Probe A; weitere Erläuterungen s. Text und Tab. 16.)

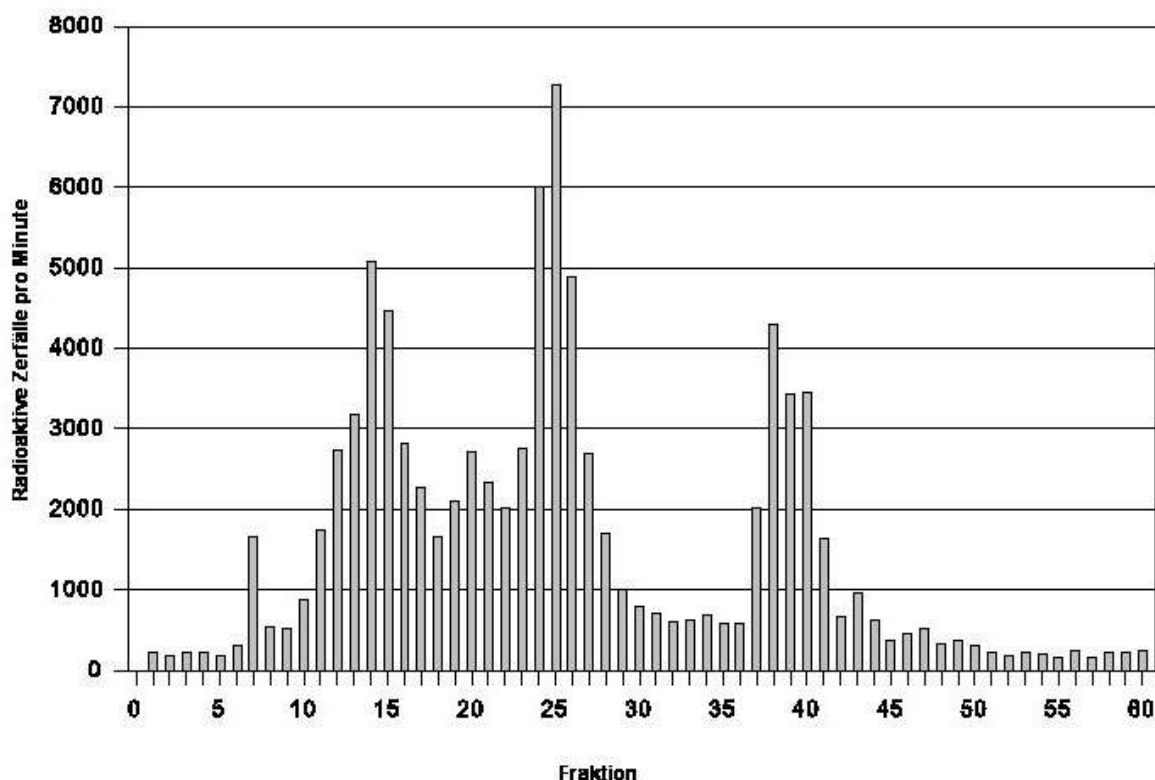


Abb. 13b: Verteilung der Radioaktivität nach fraktionierter Chromatographie der kombinierten Fraktionen 12 – 35 aus der vorherigen, fraktionierten Chromatographie der FREIEN Metaboliten des Ethylacetat-Extraktes. (Pferd 2 – Probe B; weitere Erläuterungen s. Text und Tab. 16.)

Die Fraktionen der einzelnen Peaks im Radiochromatogramm (Abb. 13a+b und Tab. 16) der Proben A und B wurden wiederum zusammengefaßt. Diese kombinierten Fraktionen und die Methanol-Extrakte der beiden Proben wurden anschließend derivatisiert nach DERIVAT 1 (s. 3.5.4.1. MO-TMS-Derivatisierung). Bei der nachfolgenden gaschromatographischen / massenspektrometrischen (gc/ms-) Analyse der acht Derivate konnten die einzelnen Metaboliten jedoch nicht näher charakterisiert werden.

2. Anwendung einer veränderten Derivatisierungsmethode

Anstelle von DERIVAT.1 wurde eine Derivatisierung einiger Extrakte nach DERIVAT.2 (s. 3.5.4.2. Oxim-TBDMS-Derivatisierung) vorgenommen. Die so entstandenen Derivate führten zu einer geringeren Fraktionierung der einzelnen, gaschromatographisch getrennten Metaboliten durch die Elektronen-Ionisation (EI) im Massenspektrometer. Die einzelnen Fragmente entstanden nun jedoch in größerer Menge. Auch diese Änderung der Analyseverfahren führte nicht zu einer zweifelsfreien Bestimmung weiterer Metaboliten.

Tab. 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der fraktionierten Chromatographie von Probe A und B der unkonjugierten ³H-DHA-Metaboliten von Pferd 2

Lösung	Prozent Radioaktivität der chromatographierten Probe (%)	Prozent Radioaktivität des extrahierten U ₂₄ (%)
Probe A		
Probe A	100,0	6,9
Peak 1 – Fraktion 5 - 10	50,5	3,5
Peak 2 – Methanol-Extrakt	4,8	0,3
Wiederauffindung	80,9	5,6
Probe B		
Probe B	100,0	3,5
Peak1 – Fraktion 6 - 9	3,1	0,1
Peak 2 – Fraktion 10 - 18	25,5	0,9
Peak 3 – Fraktion 19 - 22	9,4	0,3
Peak 4 – Fraktion 23 - 29	27,1	0,9
Peak 5 – Fraktion 36 - 42	16,5	0,6
Peak 6 – Methanol-Extrakt	5,2	0,2
Wiederauffindung	98,3	3,4

3. Anwendung verschiedener Chromatographieverfahren

Ebenso wenig konnten durch Auftrennung verschiedener Extrakte oder Wasch-Lösungen mittels fraktionierter oder HPL-Chromatographie (s. 3.5.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie) eventuell noch vorhandene, weitere Metaboliten nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Da die Extraktion des U₂₄ nach Methode A (s. 3.5.1.1.) mit anschließender Derivatisierung nach DERIVAT.1 (s. 3.5.4.2. MO-TMS-Derivatisierung) durch große Verluste an Radioaktivität (und damit an ³H-DHA-Äquivalenten) in den U_{N/E} und die verschiedenen Waschlösungen gekennzeichnet war, gelang es im Rahmen der gc/ms-Analyse verschiedener Extrakte lediglich, einige wenige Metaboliten dieses Steroides beim Pferd zu charakterisieren. Die Resultate dieser Analysen finden sich unter 4.4.1. *Massenspektrometrische Daten von Dehydroepiandrosteron.*

VERSUCH B

Die Abb. 14 zeigt die Position der Markierung von ^{14}C -markiertem (^{14}C -DHA) Dehydroepiandrosteron.

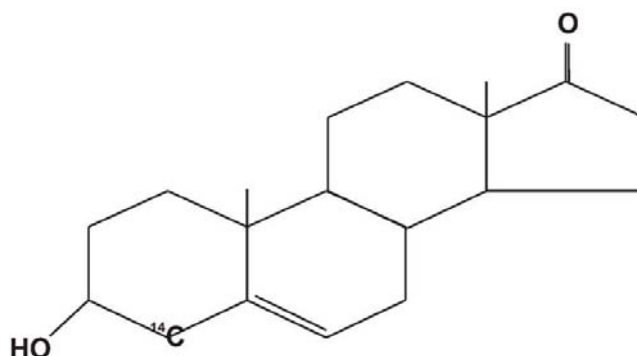


Abb. 14: ^{14}C -markiertes Dehydroepiandrosteron (^{14}C -DHA).

4.1.3. Verabreichte Dosis

Tabelle 17 gibt Auskunft, über die an die beiden Versuchspferde (Nr. 4 und 5) verabreichte Gesamtdosis. Die Verabreichung der Dosis erfolgte oral per Nasenschlundsonde (s. 3.3.2.2.1. Per Nasenschlundsonde).

Tab. 17: Übersicht, über die in VERSUCH B an die beiden Versuchpferde verabreichte Gesamtdosis von Dehydroepiandrosteron (DHA)

Pferd Nr.	DHA (mg)	D ₂ -DHA (mg)	^{14}C -DHA (μCi)
4	100	100	23,55
5	100	100	26,53

4.1.4. Tierexperiment

Tab. 18: Übersicht, über die in VERSUCH B eingesetzten Pferde

Pferd Nr.	Gewicht (kg)
4	396
5	457

4.1.4.1. Blutspiegelverlauf von ¹⁴C-DHA-Äquivalenten

Nach einer einmaligen oralen Applikation von ¹⁴C-DHA zeigte der Abfall der Plasmakonzentration bei semilogarithmischer Darstellung bei Pferd 4 einen biexponentiellen Verlauf. Bei Pferd 5 könnte zur Beschreibung der Konzentrationskurve auch das offene Drei-Kompartiment-Modell herangezogen werden (Abb. 15 + 52). Da der Kurvenverlauf bei diesem Pferd aber nicht wesentlich von dem von Pferd 4 abweicht, wurde deshalb bei beiden Versuchspferden für die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter das Zwei-Kompartiment-Modell gewählt. Der Blutspiegelverlauf ist in Abb. 15 dargestellt. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 19 aufgeführt.

Tab. 19: Pharmakokinetische Parameter von ¹⁴C-DHA im Plasma nach einmaliger oraler Applikation an zwei Vollblutrennpferde

Parameter	Pferd Nr.	
	4	5
K _a (h ⁻¹)	6,1966	6,9218
K _{el} (h ⁻¹)	0,2013	0,2198
t _½ (h)	3,40	3,20
C _{max} (DPM / ml)	210	248
t _{max} (h)	0,75	0,50

DPM = Disintegrations per minute (radioaktive Zerfälle pro Minute)

Die pharmakokinetischen Parameter für den Blutspiegelverlauf von ¹⁴C-DHA-Äquivalenten nach oraler Applikation sind bei beiden Pferden nahezu identisch (Abb. 15 + Tab. 19).

Die Halbwertszeit (t_½) für die Ausscheidung von oral verabreichtem ¹⁴C-DHA ist im Vergleich zu VERSUCH A um mehr als sechs Stunden geringer (Tab. 19), als bei der Ausscheidung von intramuskulär verabreichtem ³H-DHA (Tab. 12).

4.1.4.2. Urinausscheidung von ¹⁴C-DHA-Äquivalenten

In den Abb. 16 + 17 und der Tab. 20 sind die wichtigsten Parameter der Ausscheidung über den Urin von oral verabreichtem ¹⁴C-DHA bei zwei Vollblutrennpferden zusammengefaßt.

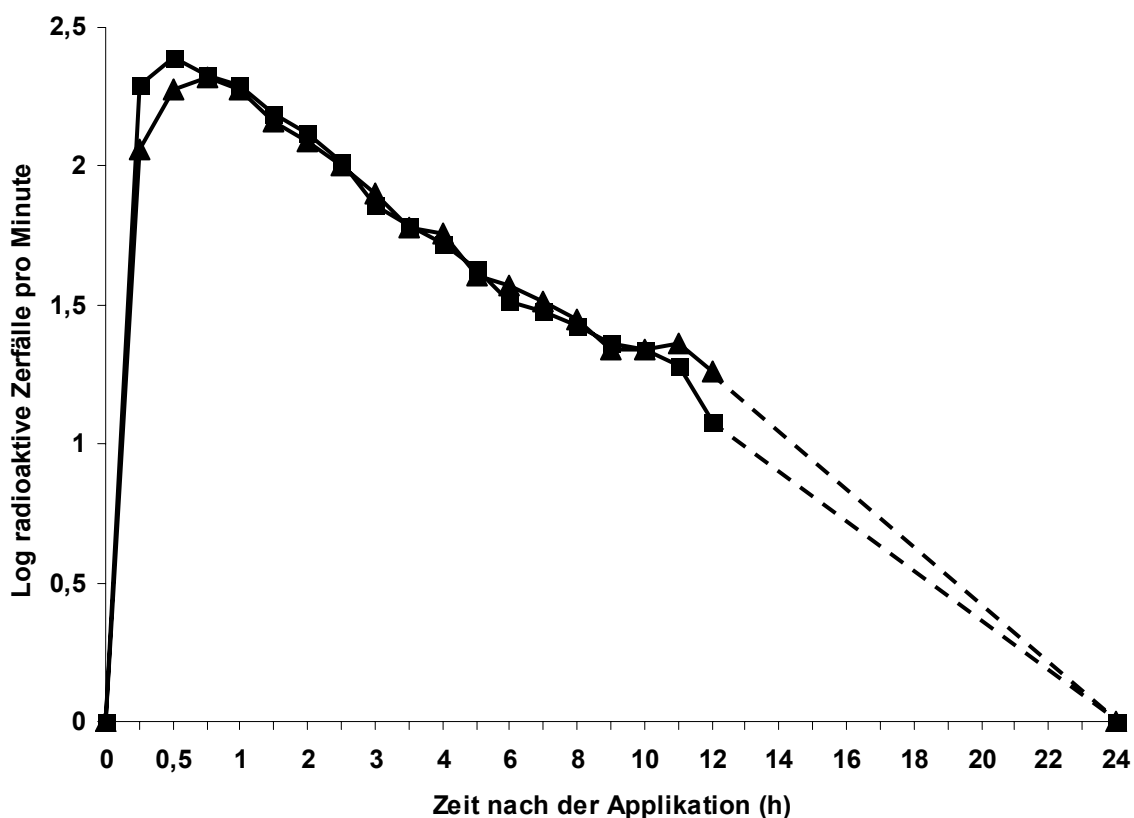


Abb. 15: Verlauf der Plasmakonzentration nach oraler Gabe von ^{14}C -DHA bei zwei Versuchspferden (▲ = Pferd 4; ■ = Pferd 5). Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Bestimmungen im Plasma dar.

Tab. 20: Ausgewählte Parameter zur Urinausscheidung von oral verabreichtem ^{14}C -DHA bei zwei Vollblutrennpferden

Parameter	Pferd Nr.	
	4	5
Zeitpunkt der letzten Urinprobe	(h) 78,25	78,08
Anteil Urinausscheidung zu Gesamtdosis ¹	(%) 53,65	48,47
Zeitpunkt - kumulative Urinausscheidung $\geq 95\%$ ²	(h) 33,75	32,75
Prozentsatz - kumulative Urinausscheidung $\geq 95\%$ ³	(%) 97,46	96,12

- 1 = Prozentsatz, der mit dem Urin ausgeschiedenen, radioaktiven ^{14}C -DHA-Äquivalente des insgesamt oral verabreichten ^{14}C -DHA
- 2 = Zeitpunkt, zu dem $\geq 95\%$ der insgesamt über den Urin ausgeschiedenen ^{14}C -DHA-Äquivalente angefallen waren
- 3 = Kumulativer Prozentsatz an ^{14}C -DHA-Äquivalenten zum Zeitpunkt 2

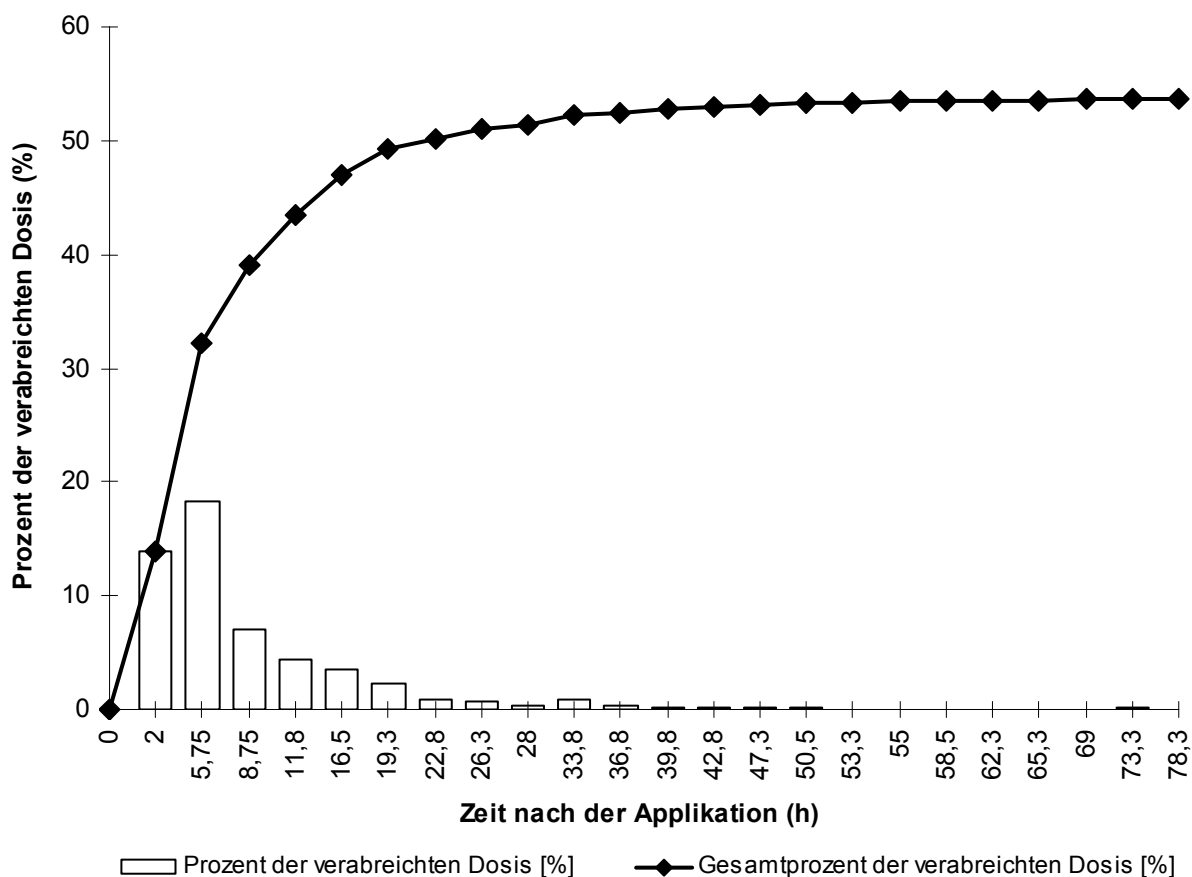


Abb. 16: Verlauf der Urinradioaktivität von ^{14}C -DHA nach oraler Gabe an Pferd 4: Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Bestimmungen im Urin dar. Darstellung der Ausscheidung der verabreichten radioaktiven Dosis in Prozent pro gesammelter Probe (Balken) und kumulativ (Linie und Markierungen).

Bei beiden Versuchspferden bewegte sich die im Vergleich zur ursprünglich verabreichten Dosis insgesamt mit dem Urin ausgeschiedene Wirkstoffmenge etwa im Bereich von 50% bis zum Abschluß der Urinsammelperiode nach 3,5 Tagen (Abb. 16 + 17 und Tab. 20).

Abhängig von Zeitpunkt und Volumen der einzelnen Urinproben wurden $\geq 95\%$ des insgesamt über den Urin ausgeschiedenen Anteils an ^{14}C -DHA-Äquivalenten in einem Zeitraum von 30 – 35 Stunden nach der Applikation eliminiert (Tab. 20). In den nachfolgend angefallenen Urinproben betrugen die jeweils ausgeschiedenen Wirkstoffmengen weniger als 0,4% der verabreichten Gesamtdosis; bis sie sich etwa 78 Stunden nach der Applikation nur noch in einem Bereich von $< 0,05\%$ der verabreichten Gesamtdosis bewegten (Abb. 16 + 17).

So war die Ausscheidung von oral verabreichtem ^{14}C -DHA (Abb. 15 + 16 und Tab. 17) etwa 30 h früher beendet als bei intramuskulär verabreichten ^3H -DHA (Abb. 11 + 12 und Tab. 13).

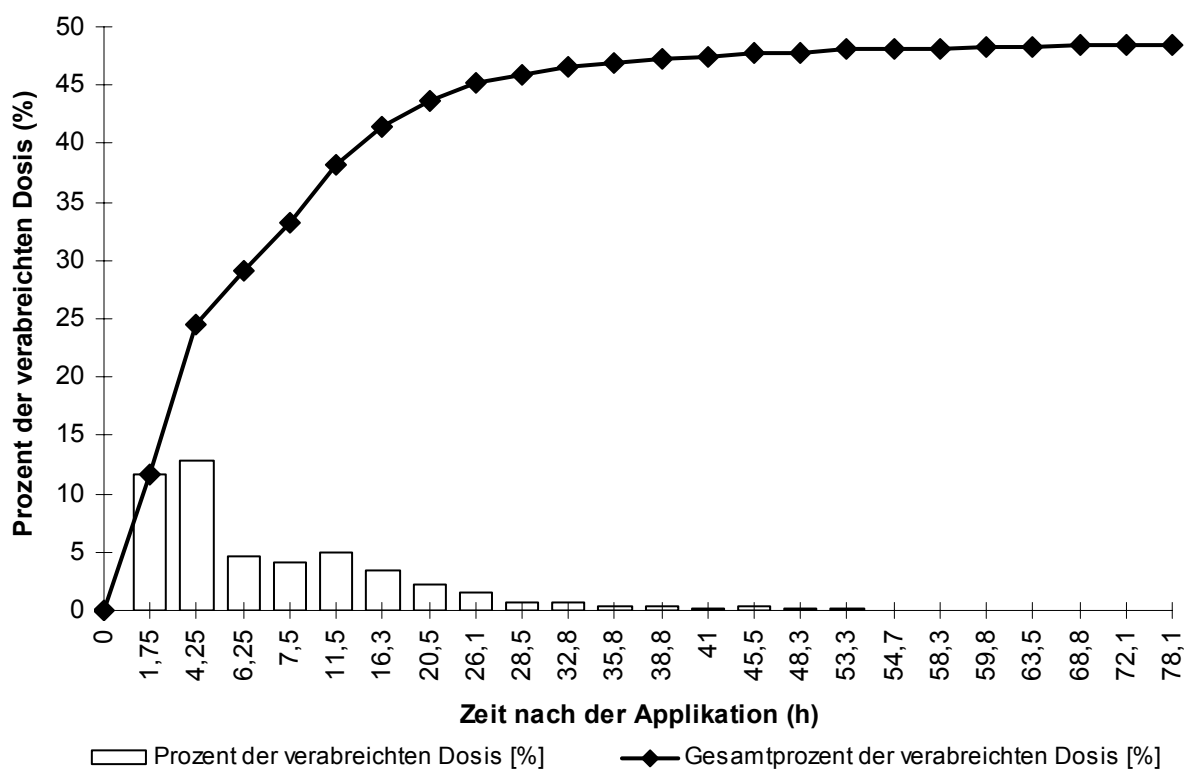


Abb. 17: Verlauf der Urinradioaktivität von ^{14}C -DHA nach oraler Gabe an Pferd 5. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Bestimmungen im Urin dar. Darstellung der Ausscheidung der verabreichten radioaktiven Dosis in Prozent pro gesammelter Probe (Balken) und kumulative (Linie und Markierungen).

Der U_{24} -Pool wurde aus folgenden Urinproben erstellt:

Pferd 4: U_1 - U_7

Pferd 5: U_1 - U_7

4.1.4.3. Auftrennung der Metaboliten von ^{14}C -DHA im Urin

Die Untersuchungen erfolgten für jedes Pferd in dem gepoolten, über 24 Stunden gesammelten Urinproben (U_{24}).

Wiederauffindung

Bei der Extraktion von U_{24} nach Methode A (s. 3.5.1.1.) unter der Verwendung einer SepPak C_{18} -Kartusche (Part Nr.: 51 910), ergaben sich Verluste und Verteilungen der Radioaktivität,

welche mit denen für ^3H -DHA vergleichbar waren. Da bei der Etherextraktion keine FREIEN Metaboliten extrahiert werden konnten, wurde sie bei den weiteren Extraktionen nicht mehr durchgeführt.

Bei der Extraktion von U_{24} nach Methode A (s. 3.5.1.1. ohne I.a. Extraktion der unkonjugierten Metaboliten) unter Verwendung von SepPak tC_{18} Plus-Kartuschen (Part Nr.: 36 810) ergaben sich nur noch sehr geringe Verluste in den $U_{N/E}$ ($< 2\%$), während die Auswaschverluste, insbesondere aus der SFR-Fraktion, zwischen 50-70% lagen. Sie konnten auch durch die Verwendung von gesättigten NaHCO_3 -Lösungen anstelle von 2 mol/l NaOH nicht entscheidend verringert werden.

4.1.4.4. Metabolisches Profil von ^{14}C -DHA-Äquivalenten

Eine fraktionierte Chromatographie der jeweiligen GFR- und SFR-Fraktionen beider Pferde (s. 3.5.2.1. Säulenchromatographie) ergab für die GFR-Fraktion das Vorkommen von zwei Bereichen konzentrierter Radioaktivität. Für die SFR-Fraktion konnten drei solcher Bereiche festgestellt werden. In Tab. 21 sind die Ergebnisse der vier fraktionierten Chromatographien zusammengefaßt.

Hervorzuheben ist hier, daß alle vier fraktionierten Chromatographien Gemeinsamkeiten aufwiesen in dem Vorkommen konzentrierter Radioaktivität in den Fraktionen (9 +) 10 sowie 15 (16) – 17 (19), was auf das Vorkommen von mindestens zwei identischen Metaboliten in der GFR- und der SFR-Fraktion schließen ließ. Zusätzlich zu diesen beiden Metaboliten wiesen die SFR-Fraktionen noch jeweils einen weiteren Metaboliten auf, allerdings in unterschiedlichen Fraktionen (Pferd 4: Fraktion 46; Pferd 5: Fraktion 31), d.h. mit unterschiedlicher Polarität. Im Methanol-Extrakt war hier jeweils keine Radioaktivität nachweisbar (Tab. 21). Die Fraktionen der einzelnen Peaks (Tab 21) wurden wiederum zusammengefaßt und anschließend derivatisiert nach DERIVAT 1 (s. 3.5.4.1. MO-TMS-Derivatisierung).

Die Resultate der gc/ms-Analyse finden sich unter 4.4.1. *Massenspektrometrische Daten von Dehydroepiandrosteron.*

Tab. 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der fraktionierten Chromatographie der GFR- und SFR-Extrakte von Pferd 4 und 5 nach oraler Applikation von ¹⁴C-DHA

Lösung	Prozent Radioaktivität der chromatographierten Probe (%)		Prozent Radioaktivität des extrahierten U ₂₄ (%)	
	4	5	4	5
GFR-Extrakt				
Pferd Nr.	4	5	4	5
GFR-Extrakt	100,0	100,0	10,6	17,1
Peak 1 – Fraktion 10	2,5	0,3	0,3	0,1
Peak 2 – Fraktion 16 - 19	22,8	31,1	2,4	*5,3
Wiederauffindung	25,3	31,5	2,7	5,4
SFR-Extrakt				
Pferd Nr.	4	5	4	5
SFR-Extrakt	100,0	100,0	6,9	9,7
Peak 1 – Fraktion 10	0,5	5,4	0,1	**0,5
Peak 2 – Fraktion 15 - 17	13,1	13,8	1,3	1,3
Peak 3 – Fraktion 31		7,2		0,7
Peak 4 – Fraktion 46	0,5		0,1	
Wiederauffindung	15,3	26,4	1,5	2,6

GFR = Mit Glucuronsäure konjugierte Metaboliten

SFR = Mit Schwefelsäure konjugierte Metaboliten

* = Fraktion 15 – 19

** = Fraktion 9 + 10

4.2. Methandriol (MAD)

Dieser Versuch sollte Aufschluß geben über die Verstoffwechslung von MAD beim Pferd: Absorptions- und Eliminationskurven des Stoffes im Blut und Urin sollten erstellt sowie die häufigsten Metaboliten bestimmt werden.

VERSUCH C

Abb. 18a+b zeigen die Positionen der Markierungen von deuteriertem (D_3 -MAD) und Tritium-markiertem (3H -MAD) Methandriol (MAD).

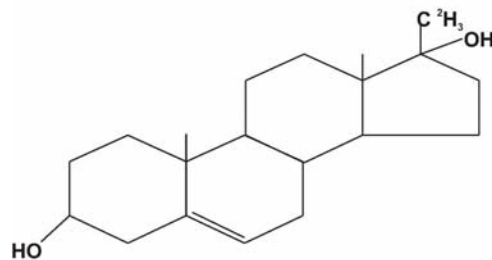


Abb. 18a: Deuteriertes Methandriol (D_3 -MAD).

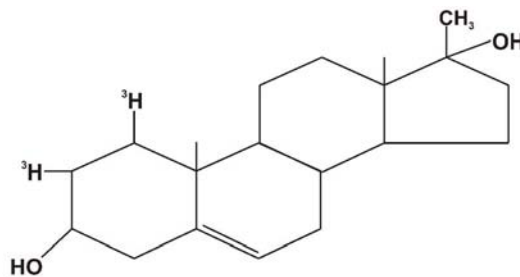


Abb. 18b: Tritium-markiertes Methandriol (3H -MAD).

4.2.1. Verabreichte Dosis

Tabelle 22 gibt Auskunft, über die an die beiden Versuchspferde (Nr. 2 und 3) verabreichte Gesamtdosis. Die Verabreichung der Dosis erfolgte oral per Nasenschlundsonde (s. 3.3.2.2.1. Per Nasenschlundsonde).

Tab. 22: Übersicht, über die in VERSUCH C an die beiden Versuchpferde verabreichte Gesamtdosis von Methandriol (MAD)

Pferd Nr.	MAD (mg)	D ₃ -MAD (mg)	³ H-MAD (μCi)
2*	120	105	143,90
3	116	109	139,75

*Bei der Verabreichung der Gesamtdosis an Pferd 2, kam es zu nicht exakt bestimmbareren Verlusten.

4.2.2. Tierexperiment

Tab. 23: Übersicht, über die in VERSUCH C eingesetzten Pferde

Pferd Nr.	Gewicht (kg)
2	466
3	474

4.2.2.1. Blutspiegelverlauf von ³H-MAD-Äquivalenten

Nach einer einmaligen oralen Applikation von ³H-MAD zeigte der Abfall der Plasmakonzentration bei semilogarithmischer Darstellung einen biexponentiellen Verlauf. Für die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter wurde deshalb das Zwei-Kompartiment-Modell gewählt. Der Blutspiegelverlauf ist in Abb. 19 dargestellt. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 24 aufgeführt.

Tab. 24: Pharmakokinetische Parameter von ³H-MAD im Plasma nach einmaliger oraler Applikation an zwei Vollblutrennpferde

Parameter	Pferd Nr.	
	2	3
K _a (h ⁻¹)	2,2203	0,4280
K _{el} (h ⁻¹)	0,0578	0,1849
t _½ (h)	11,99	3,75
C _{max} (DPM / ml)	681	737
t _{max} (h)	1,00	4,00

DPM = Disintegrations per minute (radioaktive Zerfälle pro Minute)

Hervorzuheben ist, daß alle, der bestimmten pharmakokinetischen Parameter bei beiden Pferde große Unterschiede aufweisen: Die Resorptionskonstante k_a hat bei Pferd 2 einen etwa fünfmal größeren Wert als bei Pferd 3. Dies macht sich auch in einem sehr viel früheren Erreichen der Maximalkonzentration (C_{max}) von oral verabreichtem $^3\text{H-MAD}$ im Plasma bei Pferd 2 bemerkbar (Abb. 19 und Tab. 24).

Die Eliminationskonstante k_{el} weist dagegen bei Pferd 3 einen etwa dreimal größeren Wert auf als bei Pferd 2. Dies kommt auch durch eine etwa dreimal kürzere Halbwertszeit von oral verabreichtem $^3\text{H-MAD}$ bei Pferd 3 zum Ausdruck (3,75 h) im Vergleich zu Pferd 2 (11,99 h) (Abb. 19 und Tab. 24).

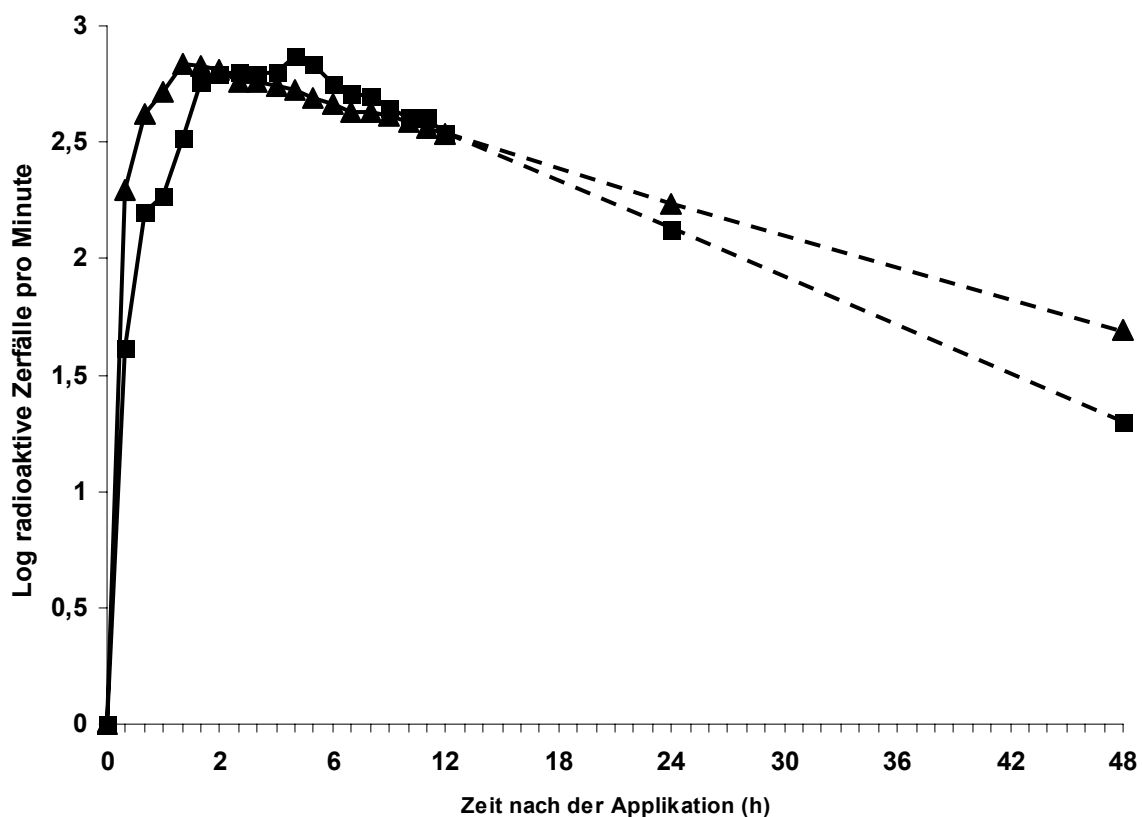


Abb. 19: Verlauf der Plasmakonzentration nach oraler Gabe von $^3\text{H-MAD}$ bei zwei Versuchspferden (▲ = Pferd 2; ■ = Pferd 3). Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Bestimmungen im Plasma dar.

4.2.2.2. Urinausscheidung von $^3\text{H-MAD}$ -Äquivalenten

In den Abb. 20 + 21 und der Tab. 25 sind die wichtigsten Parameter der Ausscheidung über den Urin von oral verabreichtem $^3\text{H-MAD}$ bei zwei Vollblutrennpferden zusammengefaßt.

Tab. 25: Ausgewählte Parameter zur Urinausscheidung von oral verabreichten ³H-MAD bei zwei Vollblutrennpferden

Parameter		Pferd Nr.	
		2	3
Zeitpunkt der letzten Urinprobe	(h)	119,10	119,45
Anteil Urinausscheidung zu Gesamtdosis ¹	(%)	*37,51	51,13
Zeitpunkt - kumulative Urinausscheidung ≥ 95% ²	(h)	49,58	50,08
Prozentsatz - kumulative Urinausscheidung ≥ 95% ³	(%)	96,32	98,06

- 1 = Prozentsatz, der mit dem Urin ausgeschiedenen, radioaktiven ³H-DHA-Äquivalente des insgesamt intramuskulär verabreichten ³H-DHA
- 2 = Zeitpunkt, zu dem ≥ 95% der insgesamt über den Urin ausgeschiedenen ³H-DHA-Äquivalente angefallen waren
- 3 = Kumulativer Prozentsatz an ³H-DHA-Äquivalenten zum Zeitpunkt 2
- * = Bei der oralen Verabreichung der Gesamtdosis von ³H-MAD an Pferd 2 ging ein gewisser Anteil des Substanzgemisches verloren, der nicht näher zu bestimmen war.

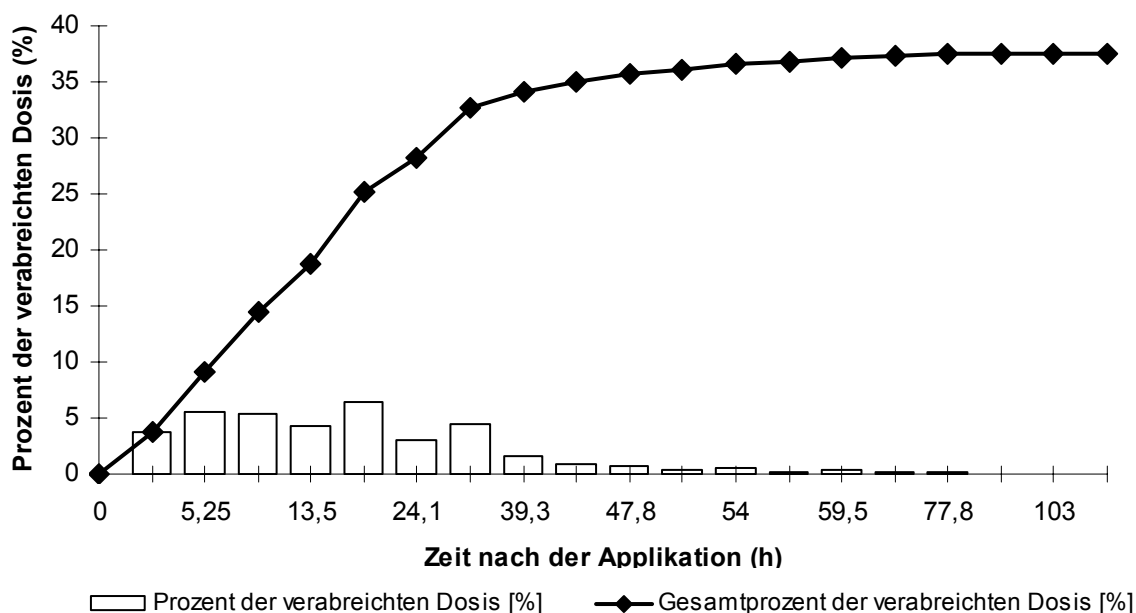


Abb. 20: Verlauf der Urinradioaktivität von ³H-MAD nach oraler Gabe an Pferd 2. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Bestimmungen im Urin dar. Darstellung der Ausscheidung der verabreichten radioaktiven Dosis in Prozent pro gesammelter Probe (Balken) und kumulativ /Line und Markierungen).

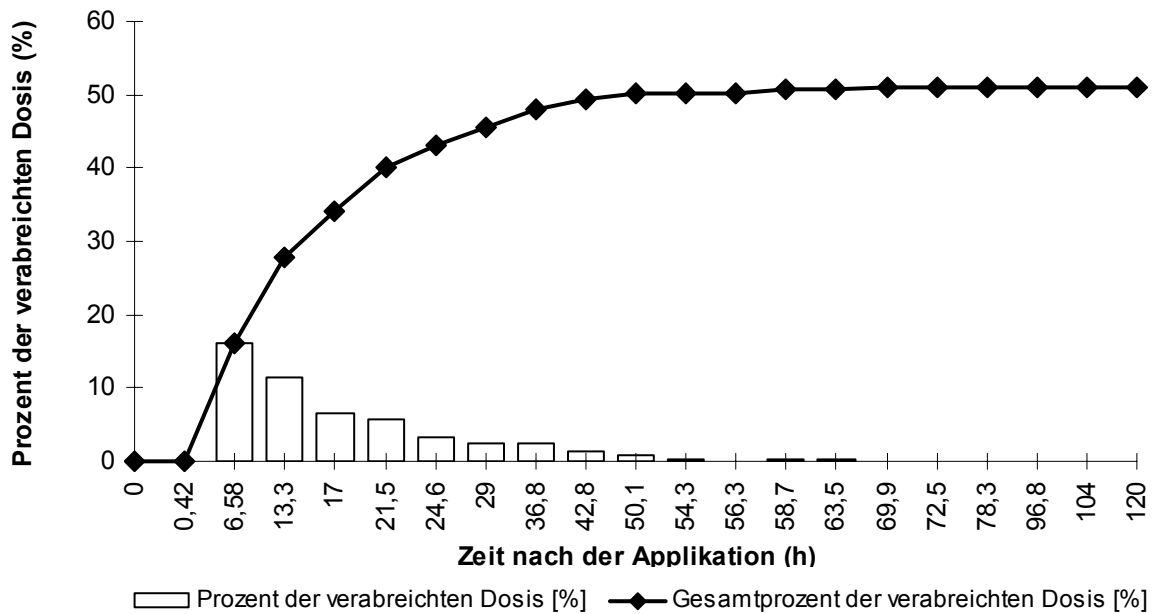


Abb. 21: Verlauf der Urinradioaktivität von ³H-MAD nach oraler Gabe an Pferd 3. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Bestimmungen im Urin dar. Darstellung der Ausscheidung der verabreichten radioaktiven Dosis in Prozent pro gesammelter Probe (Balken) und kumulativ (Linie und Markierungen).

Die im Vergleich zur ursprünglich verabreichten Dosis insgesamt mit dem Urin ausgeschiedene Wirkstoffmenge bewegte sich etwa im Bereich von 50% (da es bei der Verabreichung der Gesamtdosis an Pferd 2 zu nicht exakt bestimmbar Verlusten kam, wird hier nur der für Pferd 3 bestimmte Wert zugrunde gelegt) bis zum Abschluß der Urinsammelperiode nach fünf Tagen (Abb. 21 und Tab.25).

Abhängig von Zeitpunkt und Volumen der einzelnen Urinproben wurden $\geq 95\%$ der insgesamt über den Urin ausgeschiedenen Menge in einem Zeitraum von 45 - 50 Stunden nach der Applikation eliminiert (Tab. 25). In den nachfolgend angefallenen Urinproben betragen die jeweils ausgeschiedenen Wirkstoffmengen weniger als 0,5% der verabreichten Gesamtdosis. Bis sie sich etwa 120 Stunden nach der Applikation nur noch in einem Bereich von 0,01% der verabreichten Gesamtdosis bewegten (Abb. 21).

Der U₂₄-Pool wurde aus folgenden Urinproben erstellt:

- Pferd 2: U₁-U₅
- Pferd 3: U₁-U₅

4.2.2.3. Auftrennung der Metaboliten von ^3H -MAD im Urin

Die Untersuchungen erfolgten für jedes Pferd in den gepoolten, über 24 Stunden fraktioniert gesammelten Urinproben.

Wiederauffindung

Bei der Extraktion von U_{24} nach Methode A unter der Verwendung einer SepPak C_{18} -Kartusche; Part No.: 51 910; ergaben sich Verluste und Verteilungen der Radioaktivität, welche mit denen für markiertes DHA vergleichbar waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei der Extraktion von U_{24} nach Methode A (s. 3.5.1.1. ohne I.a. Extraktion der unkonjugierten Metaboliten) unter der Verwendung einer SepPak tC_{18} Plus-Kartusche; Part No.: 36 810; ergaben sich geringe Verluste in den $U_{N/E}$ (< 11%), während die Auswaschverluste, insbesondere aus der SFR-Fraktion, zwischen 50-70% lagen. Wie bei DHA konnten sie auch nicht durch die Verwendung von gesättigter NaHCO_3 -Lsg. anstelle von 2 mol/l NaOH entscheidend verringert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.2.2.4. Metabolisches Profil von ^3H -MAD-Äquivalenten

Die bei den verschiedenen Versuchen gewonnenen Extrakte von ^3H -MAD-Äquivalenten wurden auf unterschiedliche Weise weiter aufgearbeitet und anschließend derivatisiert.

1. *Anwendung einer fraktionierten Chromatographie mittels Kieselgelsäule*

In den Abb. 22a+b und der Tab. 26 werden die Ergebnisse einer fraktionierten Chromatographie (s. 3.5.2.1. Säulenchromatographie) der GFR- und SFR-Fractionen des Pferdes 2 dargestellt. Sie ergab für die GFR-Fraktion das Vorkommen von einem Hauptbereich konzentrierter Radioaktivität und von drei weiteren, kleinen Peaks, die jedoch nicht zur gc/ms-Analyse herangezogen wurden (Abb. 22a). In der SFR-Fraktion fand sich Radioaktivität in allen gesammelten Fraktionen mit insgesamt vier Peaks an konzentrierter Radioaktivität (Abb. 22b).

Die Fraktionen der einzelnen Peaks im Radiochromatogramm (Abb. 22a+b und Tab. 26) wurden wiederum zusammengefaßt. Diese kombinierten Fraktionen und die Methanol-Extrakte der beiden Proben wurden anschließend derivatisiert nach DERIVAT 1 (s. 3.5.4.1. MO-TMS-Derivatisierung) und einer gc/ms-Analyse unterzogen.

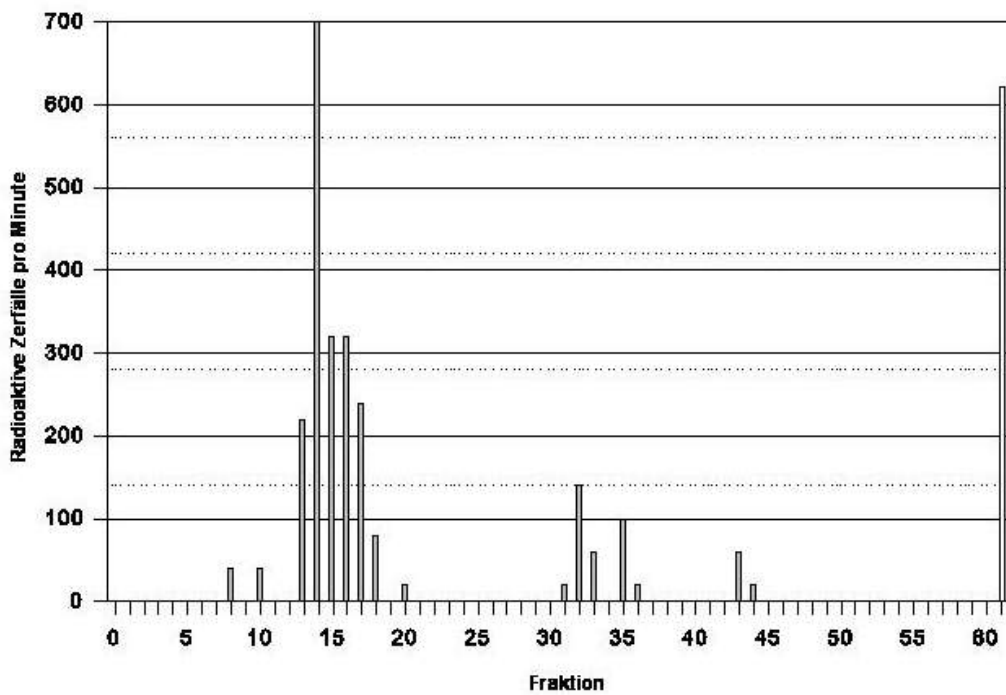


Abb. 22a: Verteilung der Radioaktivität nach fraktionierter Chromatographie des GFR-Extraktes (Pferd 2 – weitere Erläuterungen s. Text und Tab. 26).

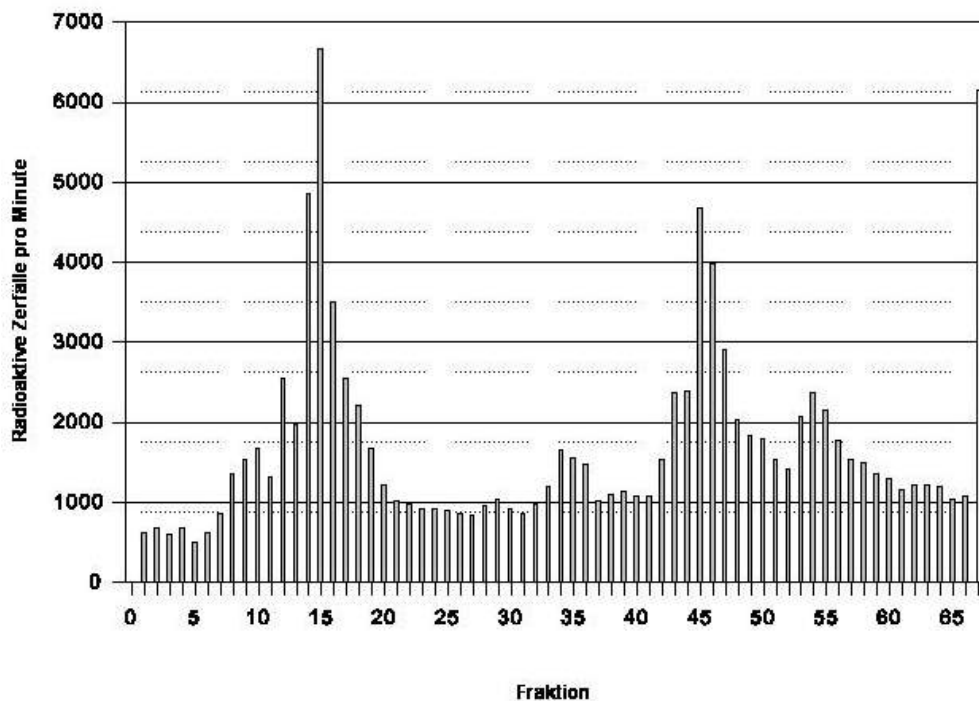


Abb. 22b: Verteilung der Radioaktivität nach fraktionierter Chromatographie des SFR-Extraktes (Pferd 2 – weitere Erläuterungen s. Text und Tab. 26).

Tab. 26: Zusammenfassung der Ergebnisse der fraktionierten Chromatographie der GFR- und SFR-Extrakte von Pferd 2 nach oraler Applikation von ^3H -MAD

Lösung	Prozent Radioaktivität der chromatographierten Probe (%)	Prozent Radioaktivität des extrahierten U_{24} (%)
GFR-Extrakt		
GFR-Extrakt	100,0	8,6
Peak 1 – Fraktion 13 - 18	6,2	0,5
Peak 2 – Methanol-Extrakt	29,1	2,5
Wiederauffindung	36,7	3,2
SFR-Extrakt		
SFR-Extrakt	100,0	20,5
Peak 1 – Fraktion 6 - 22	50,3	10,3
Peak 2 – Fraktion 32 - 37	10,8	2,2
Peak 3 – Fraktion 42 - 52	36,4	7,5
Peak 4 – Fraktion 53 - 58	15,7	3,2
Peak 5 – Methanol-Extrakt	48,4	9,9
Wiederauffindung	196,6	40,29

Im Gegensatz zu dem Ergebnis der fraktionierten Chromatographie von ^{14}C -DHA (Tab. 21), fand sich nach der Säulenchromatographie der GFR- und SFR-Extrakte bei ^3H -MAD (Tab. 26) der größte Teil der Radioaktivität im Methanol-Extrakt der Kieselgelsäule.

2. Anwendung einer fraktionierten Chromatographie mittels HPLC

Nachdem je ein Viertel des Gesamtvolumens des Methanol-Extraktes der SFR-Fraktion von Pferd 2 zur Derivatisierung nach DERIVAT.1 herangezogen worden war, wurden die restlichen drei Viertel des Methanol-Extraktes zur fraktionierten Chromatographie mittels HPLC aufgearbeitet (s. 3.5.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie). Dabei kamen zur UV-Detektion Wellenlängen von 214, 254 und 280 nm zur Anwendung.

In Abb. 23 und Tab. 27 sind die Fraktionen aufgezeigt, welche in der anschließenden Scintillationszählung jeweils einen Peak an Radioaktivität darstellten. Diese Fraktionen wurden ebenfalls zusammengefaßt und nachfolgend derivatisiert nach DERIVAT.1 (s. 3.5.4.1. MO-TMS-Derivatisierung).

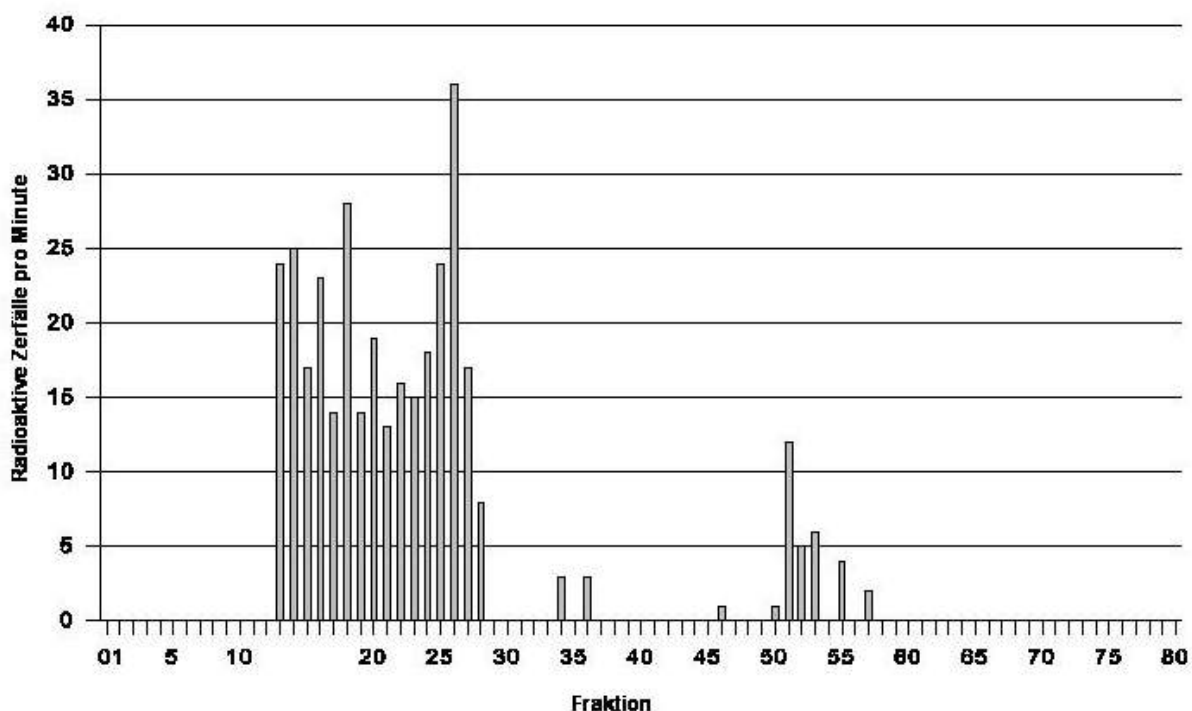


Abb. 23: Verteilung der Radioaktivität nach fraktionierter HPLChromatographie des SFR-Extraktes (Pferd 2 – weitere Erläuterungen s. Text und Tab. 27).

Tab. 27: Fraktionen, die im Anschluß an eine Trennung des SFR-Extraktes mittels HPLC jeweils einen Peak an Radioaktivität darstellten (weitere Erläuterungen s. Text)

Fraktion	Radioaktivität (DPM / min.)
13 – 16	365
17 – 19	204
20 – 22	192
23 – 28	472
50 - 53	24

Die gc/ms-Analyse der unter 1. Anwendung einer fraktionierten Chromatographie mittels Kieselgelsäule und 2. Anwendung einer fraktionierten Chromatographie mittels HPLC bestimmten Fraktionen, führte zur Charakterisierung einer Reihe von MAD-Metaboliten. Die Ergebnisse dieser Analyse finden sich unter 4.4.2. Massenspektrometrische Daten von Methandriol.

MAD-NACHWEIS

Mit diesem Versuch sollte die Möglichkeit des Nachweises von unmarkiertem MAD überprüft werden, so wie er auch im Rahmen einer routinemäßigen Dopinganalyse erfolgt.

4.2.3. Wirkstoff

Da Methandriol als Medikament nicht mehr auf dem Arzneimittelmarkt erhältlich war, wurde es institutsintern aus DHA synthetisiert (s. 3.4. Steroide, Chemikalien und Sonstige verwendete Substanzen – Tab. 7).

4.2.4. Verabreichte Dosis

Tabelle 28 gibt Auskunft, über die an die beiden Versuchspferde (Nr. 1 und 6) verabreichte Gesamtdosis. Die Verabreichung erfolgte oral über das Futter (s. 3.3.2.2.2. Über das Futter).

Tab. 28: Übersicht, über die im MAD-NACHWEIS an die beiden Versuchspferde verabreichte Gesamtdosis von Methandriol (MAD)

Pferd Nr.	MAD (mg)
1	201
6	204

4.2.5. Tierexperiment

Tab. 29: Übersicht, über die im MAD-NACHWEIS eingesetzten Pferde

Pferd Nr.	Gewicht (kg)
1	458
6	432

Der U₂₄-Pool wurde aus folgenden Urinproben erstellt:

Pferd 1: U₁-U₅

Pferd 6: U₁-U₄

4.2.6. MAD-Bestimmung

Die gewonnenen Urinproben wurden alle gemäß der im HFL verwendeten Standardmethode zur Urinanalyse extrahiert (s. 3.5.5.1. METHODE A und Abb. 8), mit anschließender Derivatisierung nach DERIVAT.1 (s. 3.5.4.1. MO-TMS-Derivatisierung). Zur Verwendung kam eine SepPak tC₁₈ Env.-Kartusche (Part No.: 36 800).

Tabelle 30 gibt eine Übersicht, über die zur Extraktion verwendeten Urinproben. Es wurden pro Urinprobe jeweils 10 ml extrahiert. Die FFR-, GFR- und SFR-Extrakte einiger der Urinproben wurden nach dem Waschen und Trocknen der Extrakte kombiniert, bevor sie zur gc/ms-Analyse gelangten (Tab. 30).

Tab. 30: Im Rahmen des MAD-NACHWEISES zur Extraktion verwendete Urinproben von Pferd 1 und 6 (weitere Erläuterungen s. Text)

Pferd Nr.	Urinprobe										
1	U _{BLK}	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U ₅	U ₆	U ₇	U ₈	U ₉	U ₂₄
6	U _{BLK}	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U ₅	U ₆	U ₇	U ₈		U ₂₄

U_{BLK} = Nullwert

U₃ = Die FFR-, GFR- und SFR-Extrakte der kursiv gedruckten Urinproben wurden jeweils kombiniert

Die kombinierten FFR-, GFR- und SFR-Extrakte (Tab. 30) wurden einer gc/ms-Analyse im SIM-Modus unterzogen. Folgende Ionen wurden selektiv erfaßt:

143 218 231 536 538 624 626.

Die Extrakte der übrigen Urinproben wurden einzeln im Full-Scan Modus gc/ms-analysiert. Die Ergebnisse der gc/ms-Analyse finden sich unter 4.4.2. *Massenspektrometrische Daten von Methandriol*.

4.3. 17 α -Methyltestosteron (17 α -MT)

Dieser Versuch sollte Aufschluß geben über die Verstoffwechslung von 17 α -MT beim Pferd. Da kein radioaktiv markiertes Steroid verabreicht wurde, konnten keine Absorptions- und Eliminationskurven des Stoffes im Blut und Urin erstellt, sondern lediglich die häufigsten Metaboliten bestimmt werden.

VERSUCH D

Die Abb. 21 zeigt die Position der Markierung von deuteriertem (D₂-17 α -MT) 17 α -Methyltestosteron (17 α -MT).

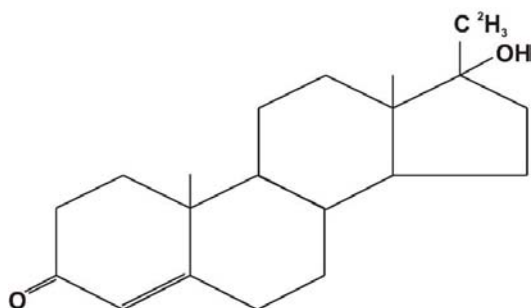


Abb. 24: Deuteriertes 17 α -Methyltestosteron (17 α -MT).

4.3.1. Verabreichte Dosis

Tabelle 31 gibt Auskunft, über die an die beiden Versuchspferde (Nr. 1 und 4) verabreichte Gesamtdosis. Die Verabreichung der Dosis erfolgte oral per Nasenschlundsonde (s. 3.3.2.2.1. Per Nasenschlundsonde).

Tab. 31: Übersicht, über die in VERSUCH D an die beiden Versuchpferde verabreichte Gesamtdosis von 17 α -Methyltestosteron (17 α -MT)

Pferd Nr.	17 α -MT (mg)	D ₂ -17 α -MT (mg)
1	101	102
4	108	100

4.3.2. Tierexperiment

Tab. 32: Übersicht, über die in VERSUCH D eingesetzten Pferde

Pferd Nr.	Gewicht (kg)
1	442
4	394

Der U₂₄-Pool wurde aus folgenden Urinproben erstellt:

Pferd 1: U₁-U₂

Pferd 4: U₁-U₄

4.3.3. 17 α -MT-Bestimmung

Der U₂₄ wurde nach Methode A (s. 3.5.1.1.) unter Verwendung einer SepPak tC₁₈ Plus-Kartusche extrahiert sowie anschließend derivatisiert nach DERIVAT.1 (s. 3.5.4.1. MO-TMS-Derivatisierung). Anstelle von 2 mol/l NaOH wurde gesättigte NaHCO₃ zum Waschen der Extrakte verwendet. Jeweils zwei Stichproben eines jeden Extraktes wurden einer gc/ms-Analyse unterzogen, wobei massenspektrometrische Daten einmal mit Hilfe einer Elektronen-Ionisation (EI), das andere Mal mit Hilfe einer Chemischen Ionisation (CI) erstellt wurden. Gezeigt werden hier die Resultate der gc/ms-Analyse mittels EI unter 4.4.3. *Massenspektrometrische Daten von 17 α -Methyltestosteron.*

17 α -MT-NACHWEIS

Mit diesem Versuch sollte die Möglichkeit des Nachweises von unmarkiertem 17 α -MT überprüft werden, so wie er auch im Rahmen einer routinemäßigen Dopinganalyse erfolgt.

4.3.4. Wirkstoff

Den beiden Versuchspferden wurden handelsübliche Tabletten mit jeweils 5 mg Methyltestosteron verabreicht (ORANDRONE TABLETS[®], INTERVET U.K. Ltd., Cambridge, U.K.)

4.3.5. Verabreichte Dosis

Tabelle 33 gibt Auskunft, über die an die beiden Versuchspferde (Nr. 3 und 6) verabreichte Gesamtdosis. Die Verabreichung erfolgte oral über das Futter (s. 3.3.2.2.2. Über das Futter).

Tab. 33: Übersicht, über die im 17α -MT-NACHWEIS an die beiden Versuchspferde verabreichte Gesamtdosis von 17α -Methyltestosteron (17α -MT)

Pferd Nr.	17α -MT (mg)
3	201
6	201

4.3.6. Tierexperiment

Tab. 34: Übersicht, über die im 17α -MT-NACHWEIS eingesetzten Pferde

Pferd Nr.	Gewicht (kg)
3	466
6	429

Der U_{24} -Pool wurde aus folgenden Urinproben erstellt:

Pferd 3: U_1 - U_4

Pferd 6: U_1 - U_4

4.3.7. 17α -MT-Bestimmung

Die gewonnenen Urinproben wurden alle gemäß der im HFL verwendeten Standardmethode zur Urinanalyse extrahiert (s. 3.5.5.1. METHODE A und Abb. 8), mit anschließender Derivatisierung nach DERIVAT.1 (s. 3.5.4.1. MO-TMS-Derivatisierung). Zur Verwendung kam eine SepPak tC_{18} Env.-Kartusche (Part No.: 36 800).

Tabelle 35 gibt eine Übersicht, über die zur Extraktion verwendeten Urinproben. Es wurden pro Urinprobe jeweils 10 ml extrahiert. Die FFR-, GFR- und SFR-Extrakte aller Einzelurinproben (U_{1-9}) der beiden Versuchspferde wurden nach dem Waschen und Trocknen der Extrakte jeweils kombiniert, bevor sie zur gc/ms-Analyse gelangten (Tab. 35).

Tab. 35: Im Rahmen des 17 α -MT-NACHWEISES zur Extraktion verwendete Urinproben von Pferd 3 und 6 (weitere Erläuterungen s. Text)

Pferd Nr.	Urinprobe										
1	U _{BLK}	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U ₅	U ₆	U ₇	U ₈	U ₉	U ₂₄
6	U _{BLK}	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U ₅	U ₆	U ₇	U ₈	U ₉	U ₂₄

U_{BLK} = Nullwert

Die kombinierten FFR-, GFR- und SFR-Extrakte wurden einer gc/ms-Analyse im SIM-Modus unterzogen. Folgende Ionen wurden selektiv erfaßt:

143 218 231

Die Extrakte der übrigen Urinproben wurden einzeln im Full-Scan Modus gc/ms-analysiert. Die Ergebnisse der gc/ms-Analyse finden sich unter 4.4.3. *Massenspektrometrische Daten von 17 α -Methyltestosteron.*

4.4. Massenspektrometrische Ergebnisse

4.4.1. Massenspektrometrische Daten von Dehydroepiandrosteron

In den folgenden Tabellen und Abbildungen sind die Ergebnisse der gc/ms-Analyse von ^3H -DHA und ^{14}C -DHA zusammenfassend dargestellt.

VERSUCH A und VERSUCH B

4.4.1.1. Metaboliten

Tab. 36: Für Dehydroepiandrosteron bestimmte Metaboliten - Zusammenfassung der gc/ms-Ergebnisse der ^3H -DHA- & ^{14}C -DHA-Experimente

Metaboliten von Dehydroepiandrosteron (^3H -DHA und ^{14}C -DHA)*	
GFR	SFR
Dehydroepiandrosteron (I)	Dehydroepiandrosteron (I)
Androstendiol-Isomer (II)	Androstendiol-Isomer (II)
Androstendiol-Isomer (II)	Androstendiol-Isomer (II)
Androstendiol-Isomer (II)	Androstendiol-Isomer (II)
Androstendiol-Isomer (II)	
Androstandiol-Isomer (III)	Androstandiol-Isomer (III)

GFR = mit Glucuronsäure konjugierte Metaboliten
SFR = mit Schwefelsäure konjugierte Metaboliten
* = Für die FREIE Fraktion (FFR) gelingt eine eindeutige Darstellung von Metaboliten für DHA mittels gc/ms-analytischer Methoden nicht.

4.4.1.2. Analytisch wichtige Ionen

Tab. 37: Auflistung der m/z-Ratio analytisch wichtiger Ionen(paare) der Dehydroepiandrosteron-Metaboliten

Metabolit	m/z-Ratio	M+ (u)		Fragment-Ionen (u)				
		A	B	C	D	E	F	G
I		389/391	374/376	358/360	299/301	284/286	268/270	129
II		434/436	419/421	344/346	329/331	254/256	239/241	129
III		436/438	421/423	346/348	331/333	256/258	241/243	129

m/z-Ratio = Verhältnis von Masse zu Ladung (mass-to-charge ratio)

M+ = unfragmentierter, einfach-positiv geladener Metabolit

A – G = Fragmentionen, weitere Erläuterungen s. Tab.38

389/391 = DHA/D₂-DHA

Tab. 38: Spezifizierung der Fragmentionen, der für Dehydroepiandrosteron bestimmten Metaboliten: M+ und die jeweils mittels Elektronen Ionisation abgespaltenen Fragmente

Metabolit	M+ und durch EI abgespaltene Molekülmassen der Fragmentionen (u)						
	A	B	C	D	E	F	G
I	M+	-15	-31	-90	-(90+15)	-(90+31)	A-Ring Fragment
II + III	M+	-15	-90	-(90+15)	-(90+90)	-(90+90 +15)	A- oder D-Ring Fragment

M+ = unfragmentierter, einfach-positiv geladener Metabolit

EI = Elektronen Ionisation

4.4.1.3. Strukturformeln der Metaboliten

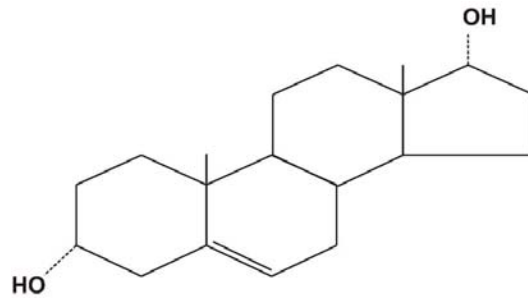


Abb. 25: Androstendiol (II = Androst-5-en-3,17-diol).

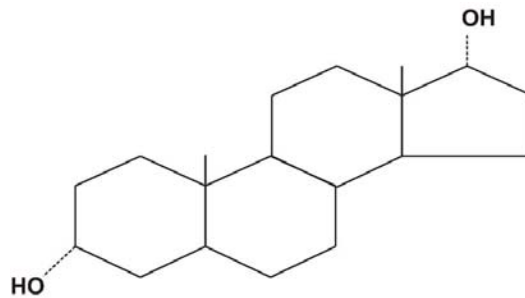


Abb. 26: Androstandiol (III = 5-Androstan-3,17-diol).

4.4.1.4. Beispiele zur gaschromatographischen und massenspektrometrischen Analyse von Dehydroepiandrosteron

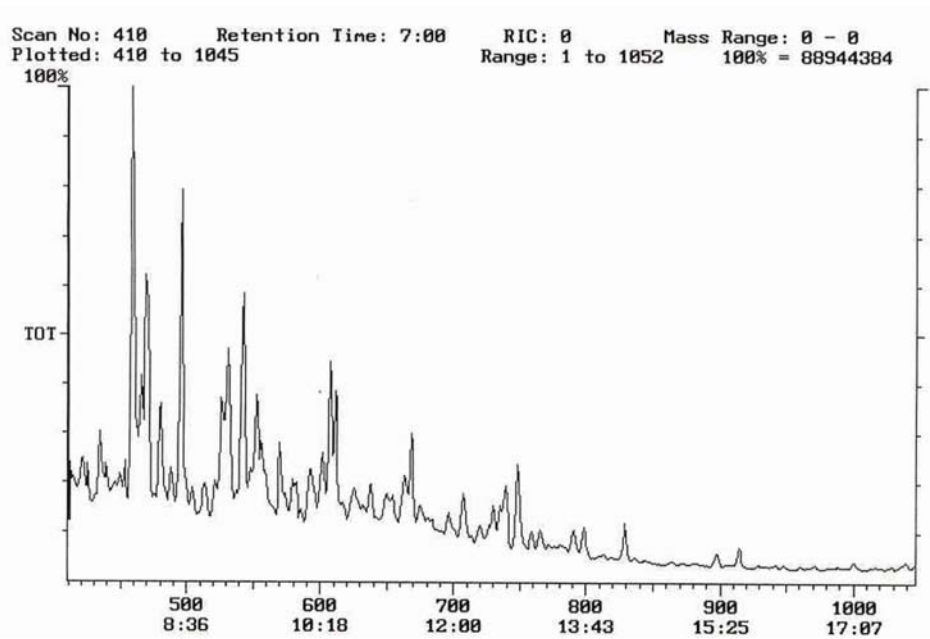


Abb. 27: Gaschromatogramm der GFR von Dehydroepiandrosteron.

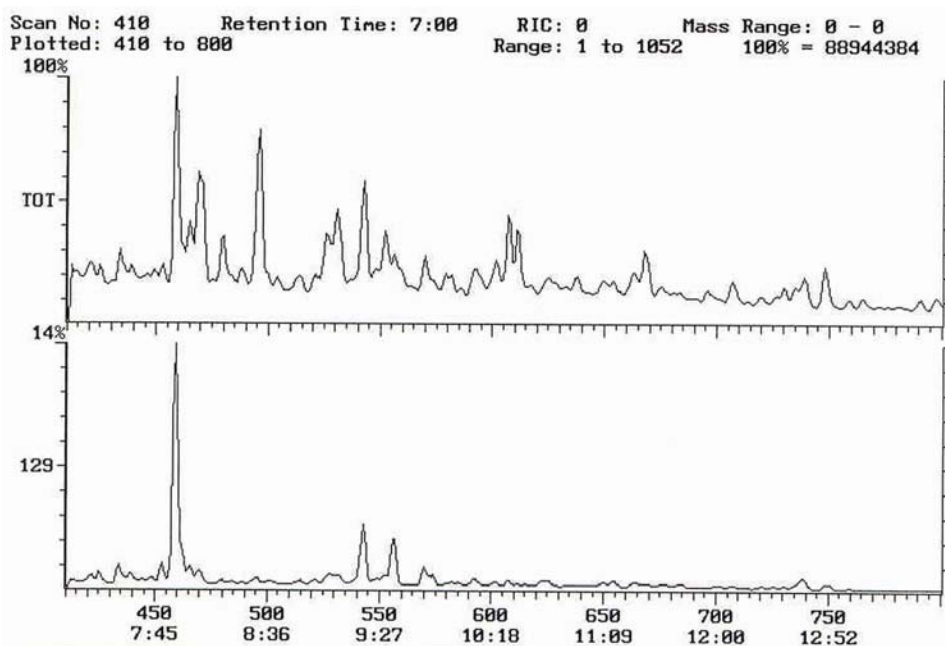


Abb. 28: Gaschromatogramm der GFR von Dehydroepiandrosteron (oben) und Ionenchromatogramm des A-Ringfragmentes (m/z 129) (unten).

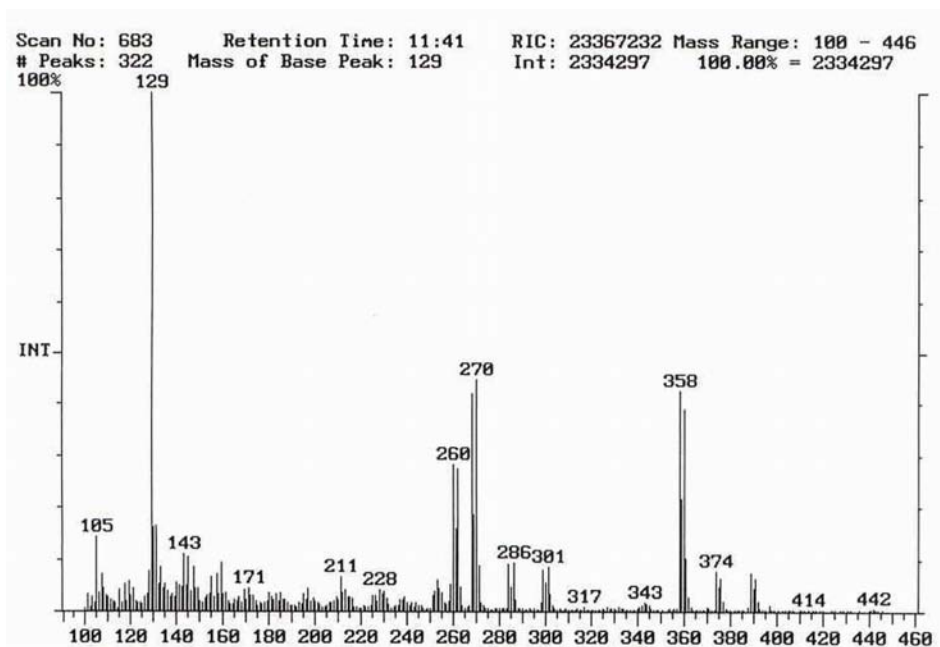


Abb. 29: Massenspektrum von 3β -Hydroxyandrost-5-en-17-on (Dehydroepiandrosteron der GFR).

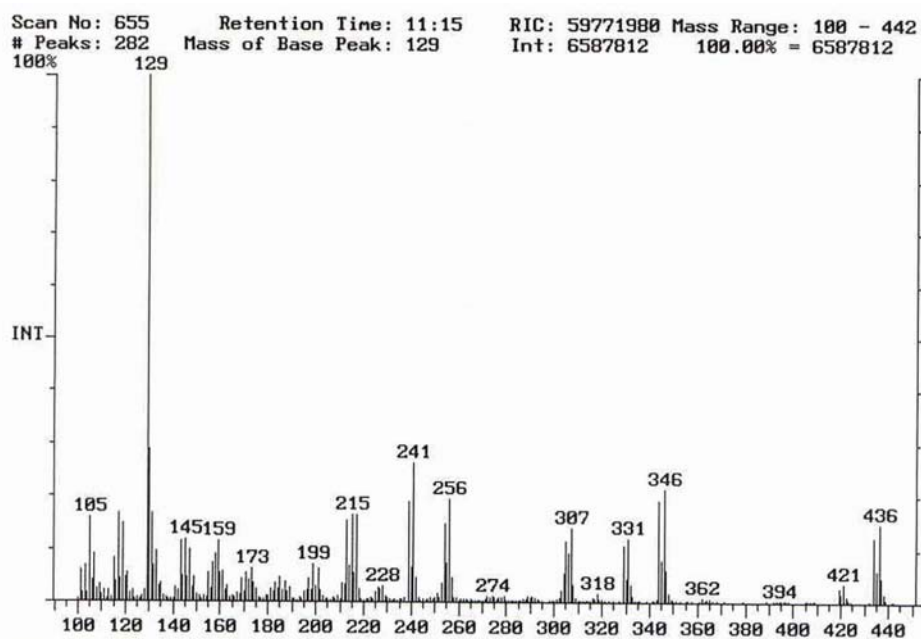


Abb. 30: Massenspektrum von Androst-5-en-3,17-diol (Androstendiol-Isomer der SFR).

4.4.2. Massenspektrometrische Daten von Methandriol

In den folgenden Tabellen und Abbildungen sind die Ergebnisse der gc/ms-Analyse von ³H-MAD zusammenfassend dargestellt.

VERSUCH C und MAD-NACHWEIS

4.4.2.1. Metaboliten

Tab. 39: Für Methandriol bestimmte Metaboliten - Zusammenfassung der gc/ms-Ergebnisse der ³H-MAD-Experimente

Metaboliten von Methandriol (³ H-MAD)*	
GFR	SFR
Methandriol (I)	Methandriol-Isomer (I)
	Methandriol-Isomer (I)
	Gesättigtes Methandriol (II)
	gesättigtes Triol-Isomer (III)
gesättigtes Tetrol-Isomer (IV)	
gesättigtes Tetrol-Isomer (IV)	
Keto-Triol (V)	
143/146**-Isomer(VI)	
143/146-Isomer (VII)	
	143/146-Isomer (VIII)
642/645**-Isomer (IX)	

- GFR = mit Glucuronsäure konjugierte Metaboliten
 SFR = mit Schwefelsäure konjugierte Metaboliten
 * = Für die FREIE Fraktion (FFR) gelingt eine eindeutige Darstellung von Metaboliten für MAD mittels gc/ms-analytischer Methoden nicht.
 ** = Die massenspektrometrischen Daten lassen keine eindeutige Definition des wahrscheinlichen Metaboliten zu.

4.4.2.2. Analytisch wichtige Ionen

Tab. 40: Auflistung der m/z-Ratio analytisch wichtiger Ionen(paare) der Methandriol-Metaboliten

Metabolit	M+ (u)		Fragment-Ionen (u)		
	A	B	C	D	
I	448/451	358/361	268/271	143/146	
II	450/453	360/363	270/273	143/146	
III	m/z-Ratio	538/541	448/451	358/361	218/221 - 231/234*
IV		626/629	536/539	446/449	218/221 - 231/234
V		579/582	564/567	489/492	218/221 - 231/234
VI – VIII					143/146
IX	642/645	624/627	534/537	218/221 - 231/234	

- m/z-Ratio = Verhältnis von Masse zu Ladung (mass-to-charge ratio)
M+ = unfragmentierter, einfach-positiv geladener Metabolit
A – D = Fragmentionen, weitere Erläuterungen s. Tab.41
448/451 = MAD/D₃-MAD
* = Die aufgeführten Ionenpaare kommen sowohl einzeln, als auch in Kombination vor.

Tab. 41: Spezifizierung der Fragmentionen, der für Methandriol bestimmten Metaboliten: M+ und die jeweils mittels Elektronen Ionisation abgespaltenen Fragmente

Metabolit	M+ und durch EI abgespaltene Molekülmassen der Fragmentionen (u)			
	A	B	C	D
I - IV	M+	-90	-(90+90)	D-Ring Fragment
V	M+	-15	-90	
VI-VIII				
IX	M+	-18	-(18+90)	

- M+ = unfragmentierter, einfach-positiv geladener Metabolit
EI = Elektronen Ionisation

4.4.2.3. Strukturformeln der Metaboliten

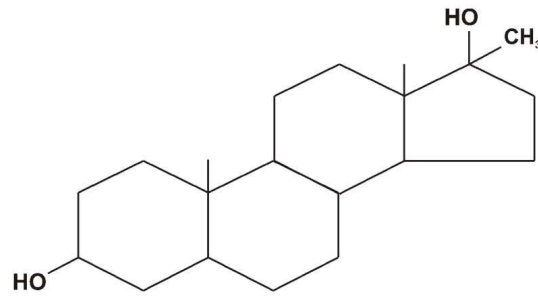


Abb. 31: Gesättigtes Methandriol (II = 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3 β -ol).

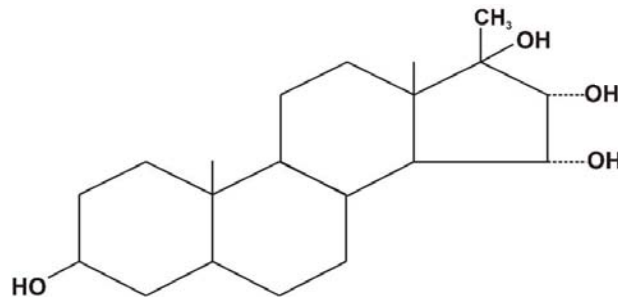


Abb. 32: Gesättigtes Triol (III = 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3 β ,(15/16)-diol).

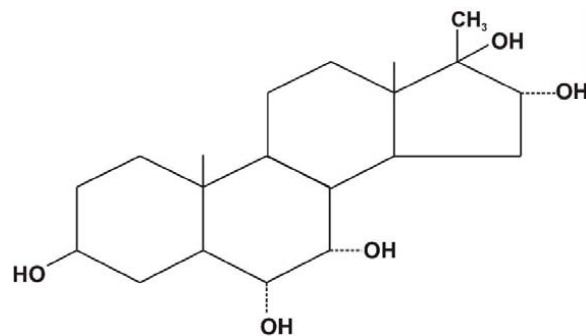


Abb. 33: Gesättigtes Tetrol (IV = 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3 β ,(6/7),16-triol).

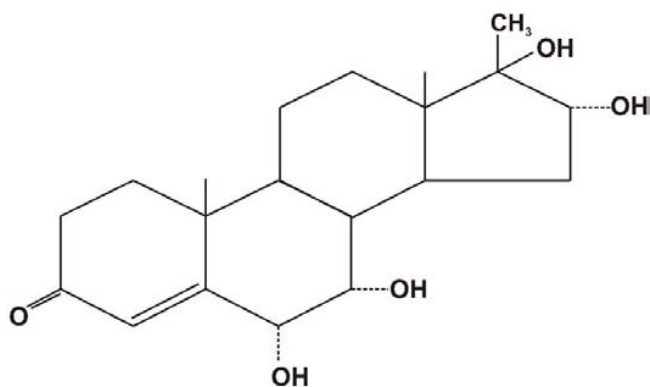


Abb. 34: Keto-Triol (V = 17Hydroxy-17 α -methyl-androst-4-en-(6/7),16-diol-3-on).

4.4.2.4. Nachweisbarkeit

Untersucht wurden GFR- und SFR-Extrakte, sowohl einzeln als auch kombiniert (s. 4.2.6. MAD-Bestimmung). In Tab. 42 sind die Metaboliten aufgeführt, welche eindeutig in den NACHWEIS-Experimenten aufgefunden und bestimmt werden konnten:

Tab. 42: Im MAD-NACHWEIS eindeutig mittels gc/ms-Analyse identifizierte Metaboliten

Extrakt	Metabolit
SFR	I IV
GFR + SFR	I
kombiniert	

GFR = mit Glucuronsäure konjugierte Metaboliten

SFR = mit Schwefelsäure konjugierte Metaboliten

4.4.2.5. Beispiele zur massenspektrometrischen Analyse von Methandriol

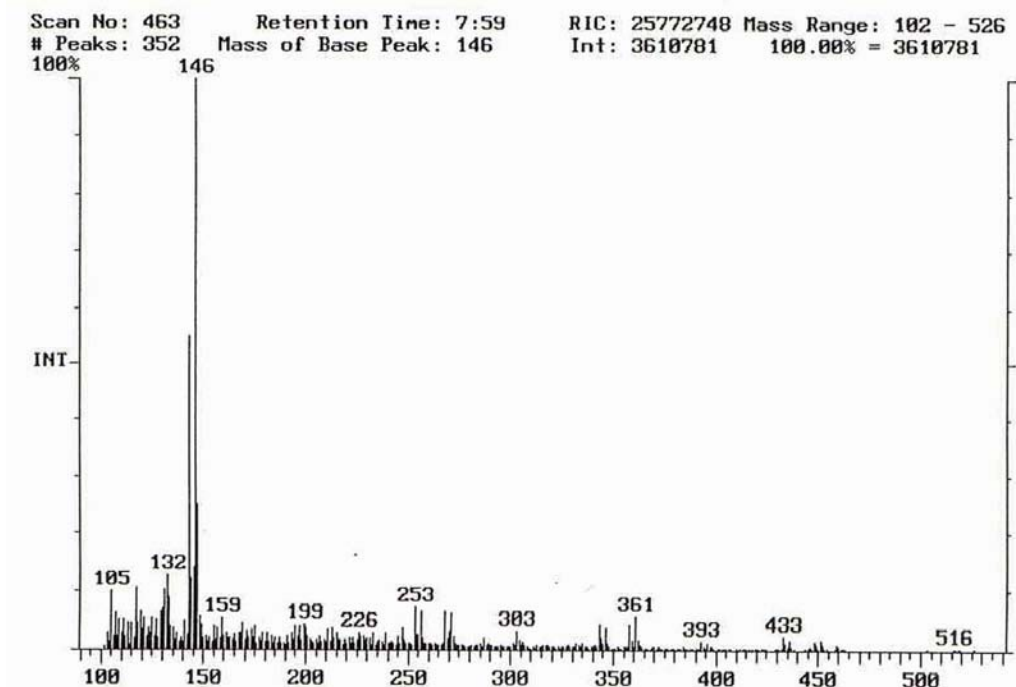


Abb. 35: Massenspektrum von 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androsten-3 β -ol (Methandriol der GFR).

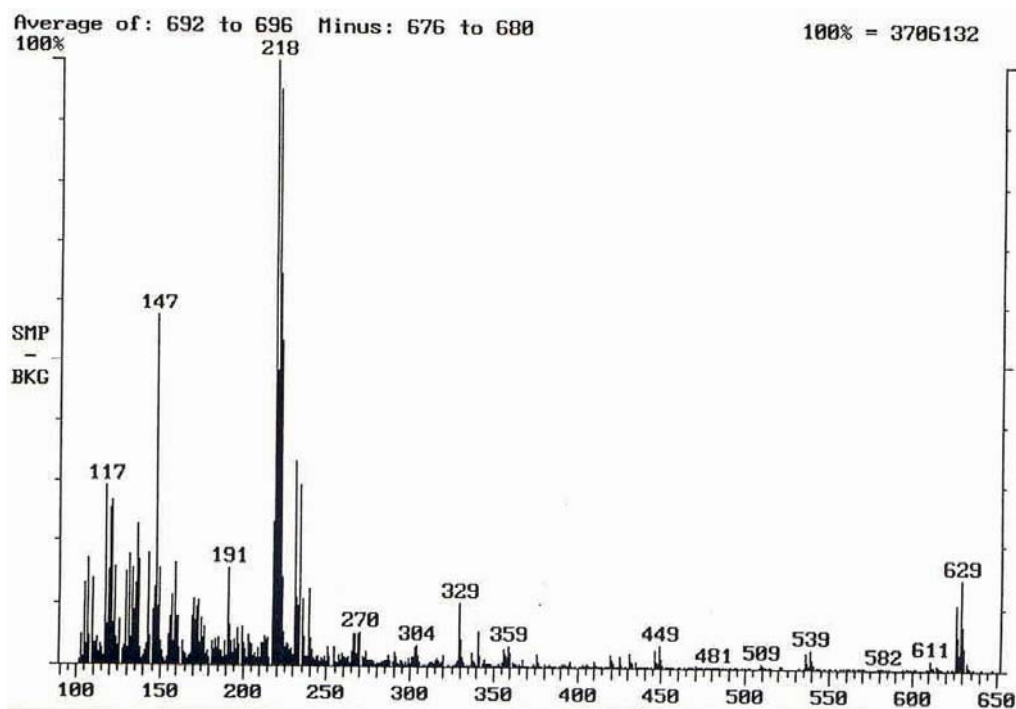


Abb. 36: Massenspektrum von 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3 β ,(6/7),16-triol (Gesättigtes Tetrol der GFR).

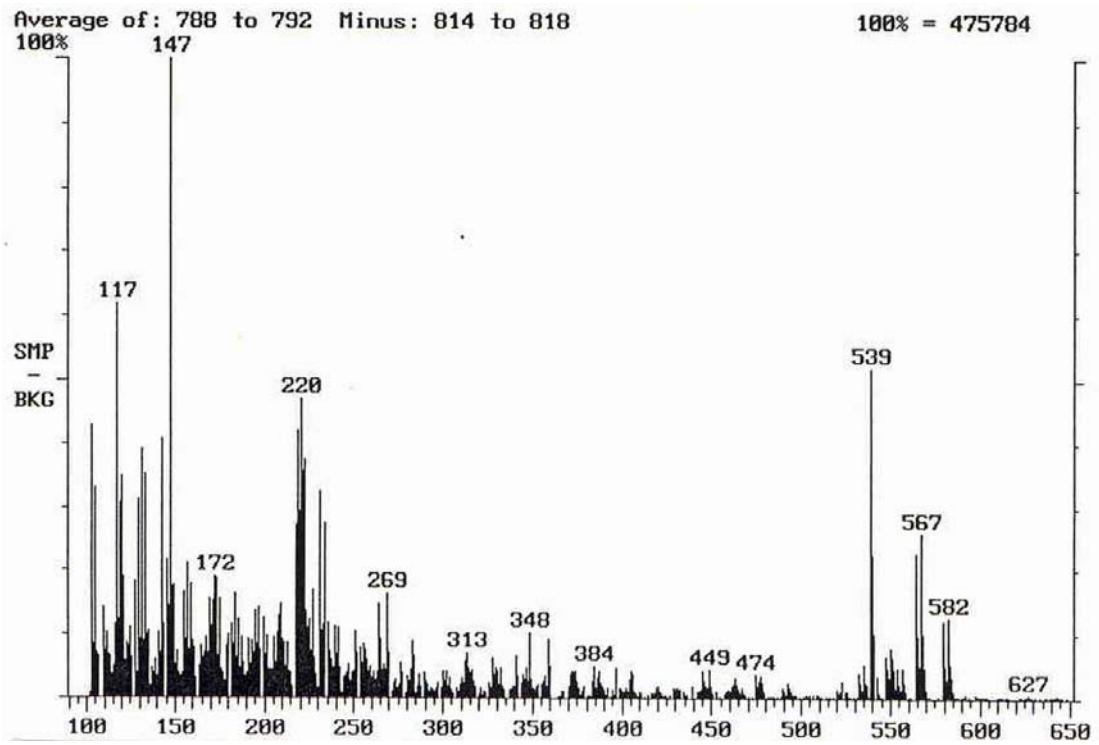


Abb. 37: Massenspektrum von 17Hydroxy-17 α -methyl-androst-4-en-(6/7),16-diol-3-on (Keto-Triol der GFR).

4.4.3. Massenspektrometrische Daten von 17 α -Methyltestosteron

In den folgenden Tabellen und Abbildungen sind die Ergebnisse der gc/ms-Analyse von 17 α -Methyltestosteron zusammenfassend dargestellt.

VERSUCH D und 17 α -MT-NACHWEIS

4.4.3.1. Metaboliten

Tab. 43: Für 17 α -Methyltestosteron bestimmte Metaboliten - Zusammenfassung der gc/ms-Ergebnisse der 17 α -MT-Experimente

Metaboliten von 17 α -Methyltestosteron (17 α -MT)		
FFR	GFR	SFR
17 α -Methyltestosteron-Isomer (I)		
17 α -Methyltestosteron-Isomer (I)		
Gesättigtes 17 α -MT (II)		Gesättigtes 17 α -MT (II)
Gesättigtes Keto-Diol-Isomer (III)		
Gesättigtes Keto-Diol-Isomer (III)		
Keto-Diol-Isomer (IV)		
		Gesättigtes Triol-Isomer (V)
		Gesättigtes Triol-Isomer (V)
Gesättigtes 6/7-Triol Isomer (VIa)	Gesättigtes 6/7-Triol Isomer (VIa)	Gesättigtes 6/7-Triol Isomer (VIa)
Gesättigtes Triol-Isomer (VIb)		Gesättigtes Triol-Isomer (VIb)
		Gesättigtes Tetrol-Isomer (VIIa)
	Gesättigtes Tetrol-Isomer (VIIb)	Gesättigtes Tetrol-Isomer (VIIb)

Tab. 43: Fortsetzung

FFR	GFR	SFR
	Gesättigtes Tetrol-Isomer (VIIb)	Tetrol-Isomer (VIII)
	Keto-Triol-Isomer (IX)	
	Keto-Triol-Isomer (IX)	Gesättigtes Keto-Triol-Isomer (X)
		143/146 [*] -Isomer (XI)
143/146-Isomer (XII)	143/146-Isomer (XII)	
143/146-Isomer (XIII)	143/146-Isomer (XIII)	
	143/146 ² -Isomer (XIV)	
143/146-Isomer (XV)	143/146-Isomer (XV)	
		143/146-Isomer (XVI)
		642/645-Isomer (XVII)
	15-OH-Metabolit (XVIII)	

- FFR = unkonjugierte Metaboliten
 GFR = mit Glucuronsäure konjugierte Metaboliten
 SFR = mit Schwefelsäure konjugierte Metaboliten
 * = Die massenspektrometrischen Daten lassen keine eindeutige Definition des wahrscheinlichen Metaboliten zu.

4.4.3.2. Analytisch wichtige Ionen

Tab. 44: Auflistung der m/z-Ratio analytisch wichtiger Ionen(paare) der 17 α -Methyltestosteron-Metaboliten

Metabolit	M+ (u)		Fragment-Ionen (u)	
	A	B	C	D
I	403/406	372/375	313/316	143/146
II	450/453	360/363	270/273	143/146
III	493/496	403/406	372/375	218/221 – 231/243*
IV	491/494	401/404	370/373	218/221 – 231/243
V	538/541	448/451	358/361	218/221 – 231/243
VIa	538/541	448/451	358/361	143/146
VIb	538/541	448/451	358/361	218/221 – 231/243
VIIa + b	626/629	536/539	446/449	218/221 – 231/243
VIII	624/627	534/537	444/447	218/221 – 231/243
IX	579/582	564/567	489/492	218/221 – 231/243
X	581/584	566/569	491/494	218/221 – 231/243
XI – XVI				143/146
XVII	642/645			
XVIII				231/234

- m/z-Ratio = Verhältnis von Masse zu Ladung (mass-to-charge ratio)
M+ = unfragmentierter, einfach-positiv geladener Metabolit
A – D = Fragmentionen, weitere Erläuterungen s. Tab.45
403/406 = 17 α -MT/D₃-17 α -MT
* = Die aufgeführten Ionenpaare kommen sowohl einzeln, als auch in Kombination vor.

Tab. 45: Spezifizierung der Fragmentionen, der für 17 α -Methyltestosteron bestimmten Metaboliten: M⁺ und die jeweils mittels Elektronen Ionisation abgespaltenen Fragmente

Metabolit	M ⁺ und durch EI abgespaltene Molekülmassen der Fragmentionen (u)			
	A	B	C	D
I	M ⁺	-31	-90	D-Ring Fragment
II, V-VIII	M ⁺	-90	-(90+90)	
III + IV	M ⁺	-90	-(90+31)	
IX + X	M ⁺	-15	-90	
XI – XVI + XVIII				
XVII	M ⁺			

M⁺ = unfragmentierter, einfach-positiv geladener Metabolit

EI = Elektronen Ionisation

4.4.3.3. Strukturformeln der Metaboliten

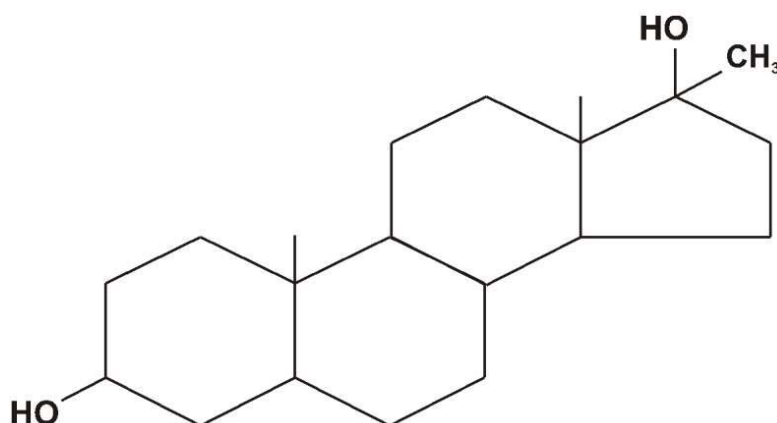


Abb. 38: Gesättigtes Diol-Isomer (II = 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3-ol).

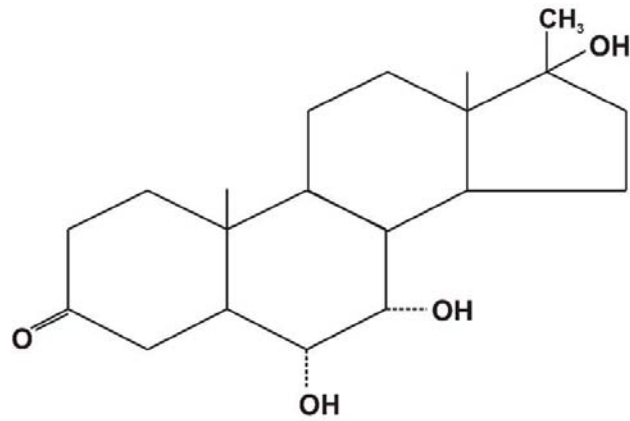


Abb. 39: Gesättigtes Keto-Diol-Isomer
(III = 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-(6/7)-ol-3-on).

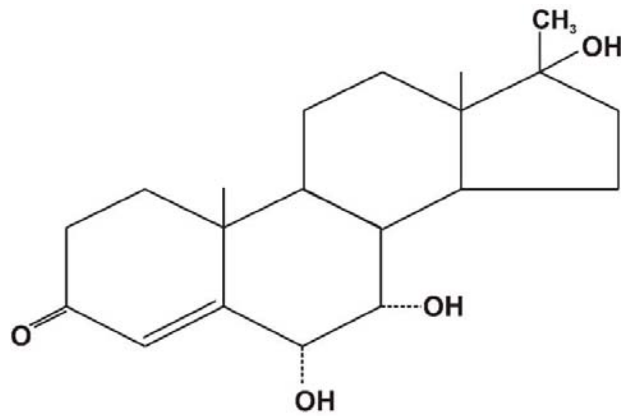


Abb. 40: Keto-Diol-Isomer (IV = 17-Hydroxy-17 α -methyl-androst-4-en-(6/7)-ol-3-on).

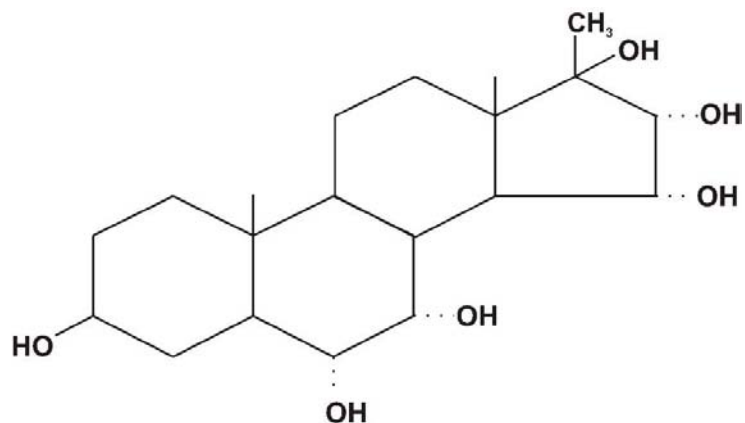


Abb. 41: Gesättigtes Triol-Isomer
(V = 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3,(6/7 bzw. 15/16)-diol).

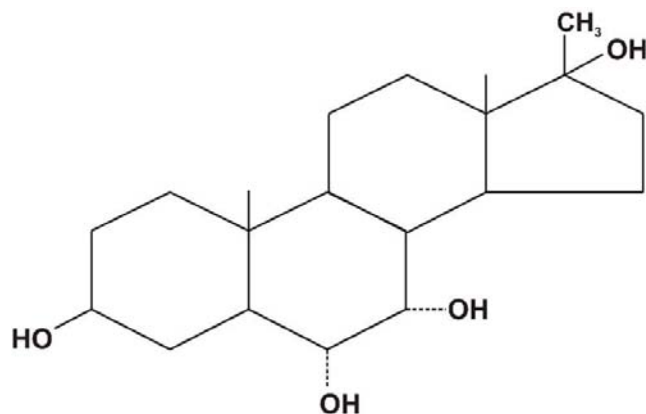


Abb. 42: Gesättigtes -6/7-Triol-Isomer
(VIa = 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3,(6/7)-diol).

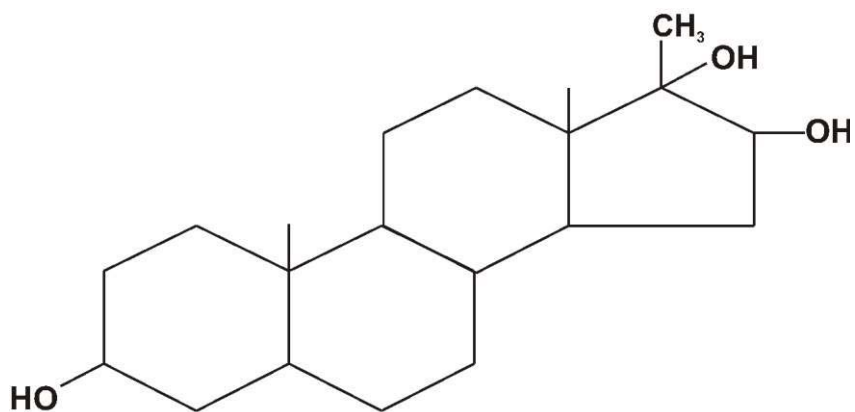


Abb. 43: Gesättigtes Triol-Isomer (VIb = 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3,16-diol).

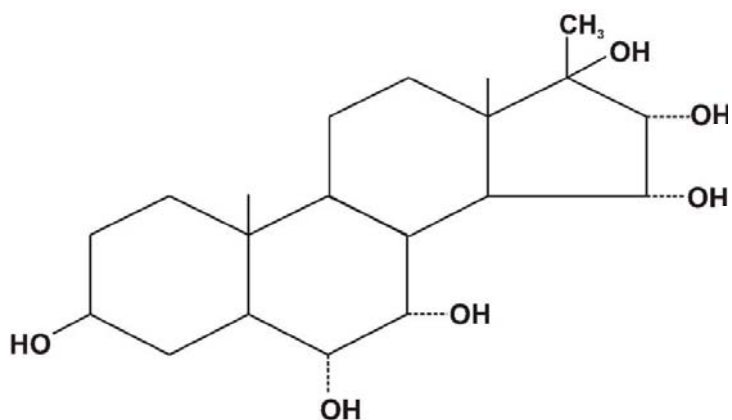


Abb. 44: Gesättigtes Tetrol-Isomer
(VIIa = 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3,(6/7),(15/16)-triol).

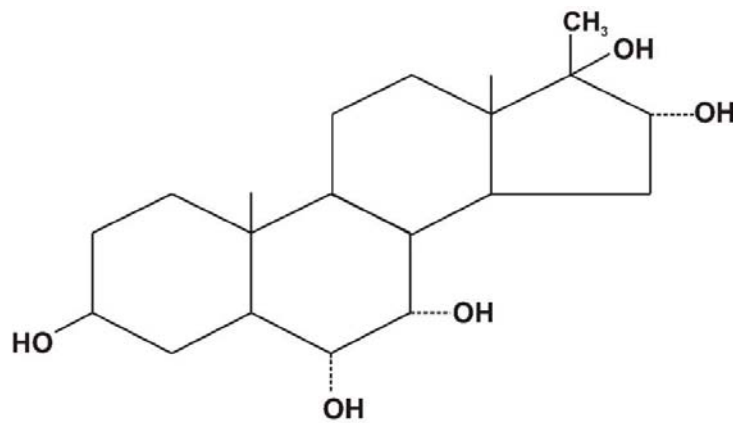


Abb. 45: Gesättigtes Tetrol-Isomer
(VIIb = 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3,(6/7),16-triol).

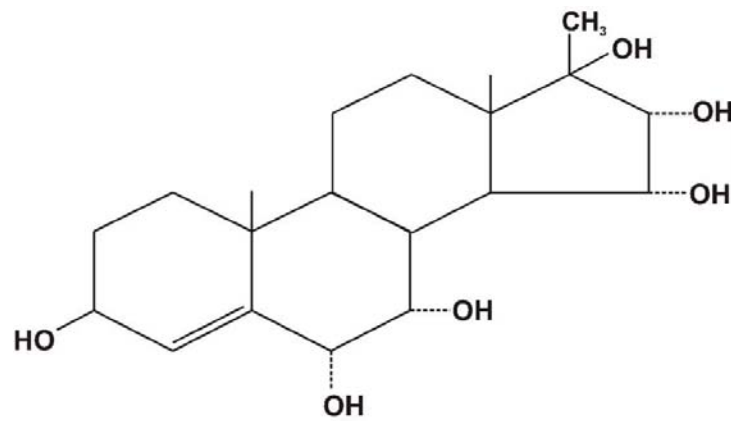


Abb. 46: Tetrol-Isomer (VIII = 17-Hydroxy-17 α -methyl-androst-4-en-3,(6/7),(15/16)-triol).

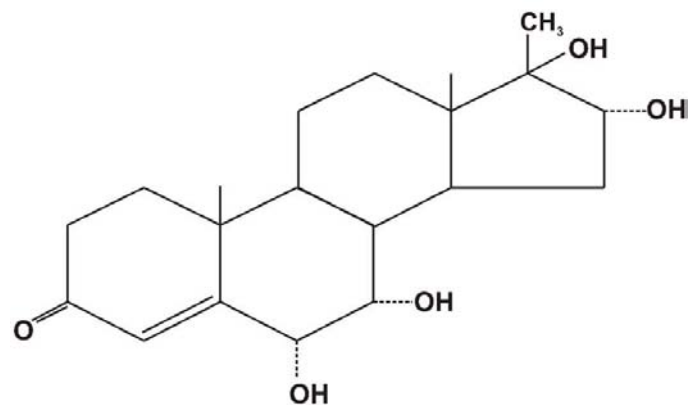


Abb. 47: Keto-Triol-Isomer
(IX = 17-Hydroxy-17 α -methyl-androst-4-en-(6/7),16-diol-3-on).

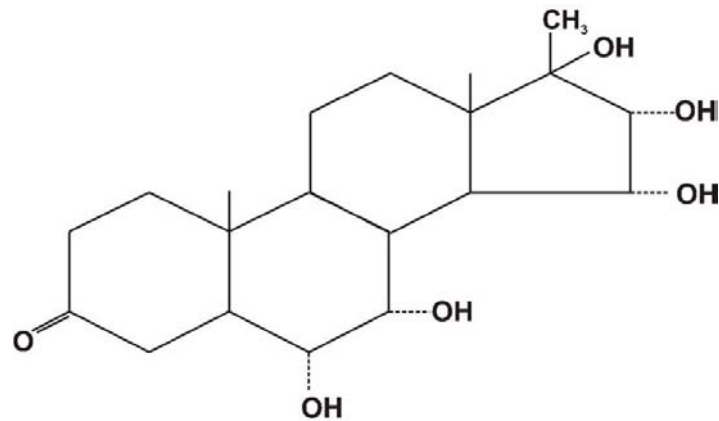


Abb. 48: Gesättigtes Keto-Triol-Isomer
(X = 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-(6/7),(15/16)-diol-3-on).

4.4.3.4. Nachweisbarkeit

Untersucht wurden GFR- und SFR-Extrakte getrennt voneinander (s. 4.3.6. 17 α -MT-Bestimmung). In Tab. 46 sind die Metaboliten aufgeführt, welche eindeutig in den NACHWEIS-Experimenten aufgefunden und bestimmt werden konnten:

Tab. 46: Im 17 α -MT-NACHWEIS eindeutig mittels gc/ms-Analyse identifizierte Metaboliten

Extrakt		Metabolit			
GFR	II	Vla	Vlb		
SFR	II	V	Vlb	VIIb	

GFR = mit Glucuronsäure konjugierte Metaboliten

SFR = mit Schwefelsäure konjugierte Metaboliten

4.4.3.5. Beispiele zur massenspektrometrischen Analyse von 17 α -Methyltestosteron

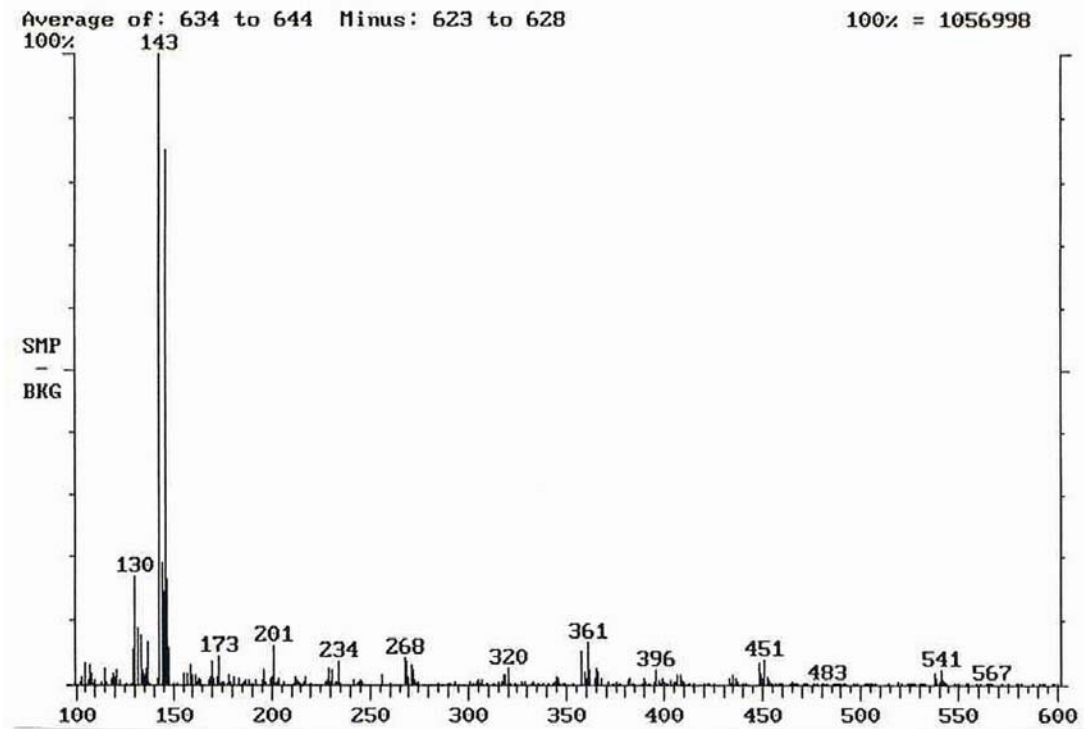


Abb. 49: Massenspektrum von 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3,(6/7)-diol (Gesättigtes Triol-Isomer der GFR).

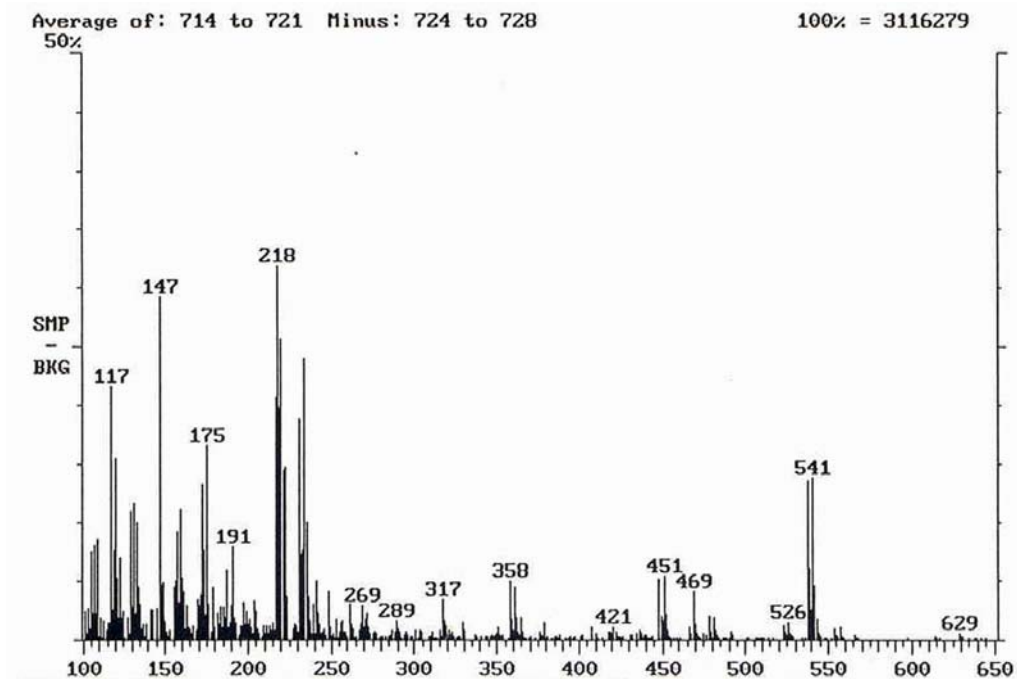


Abb. 50: Massenspektrum von 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3,16-diol (Gesättigtes Triol-Isomer der SFR).

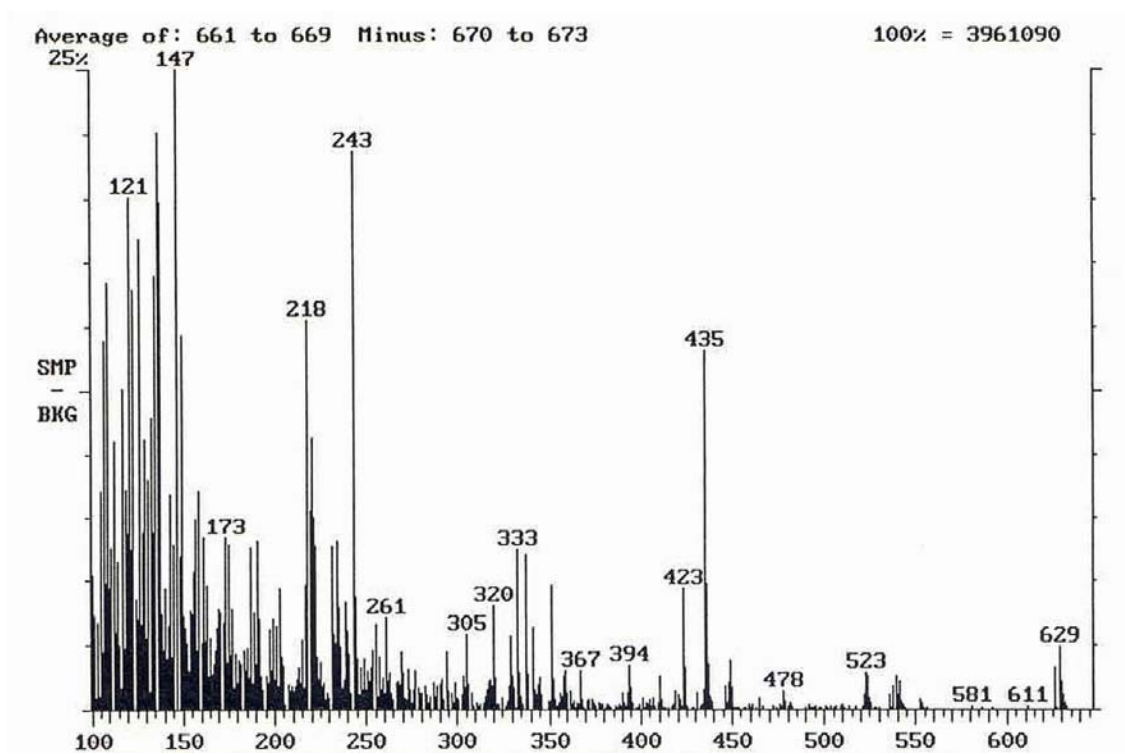


Abb. 51: Massenspektrum von 17-Hydroxy-17 α -methyl-5-androstan-3,(6/7),16-triol (Gesättigtes Tetrol-Isomer der SFR).