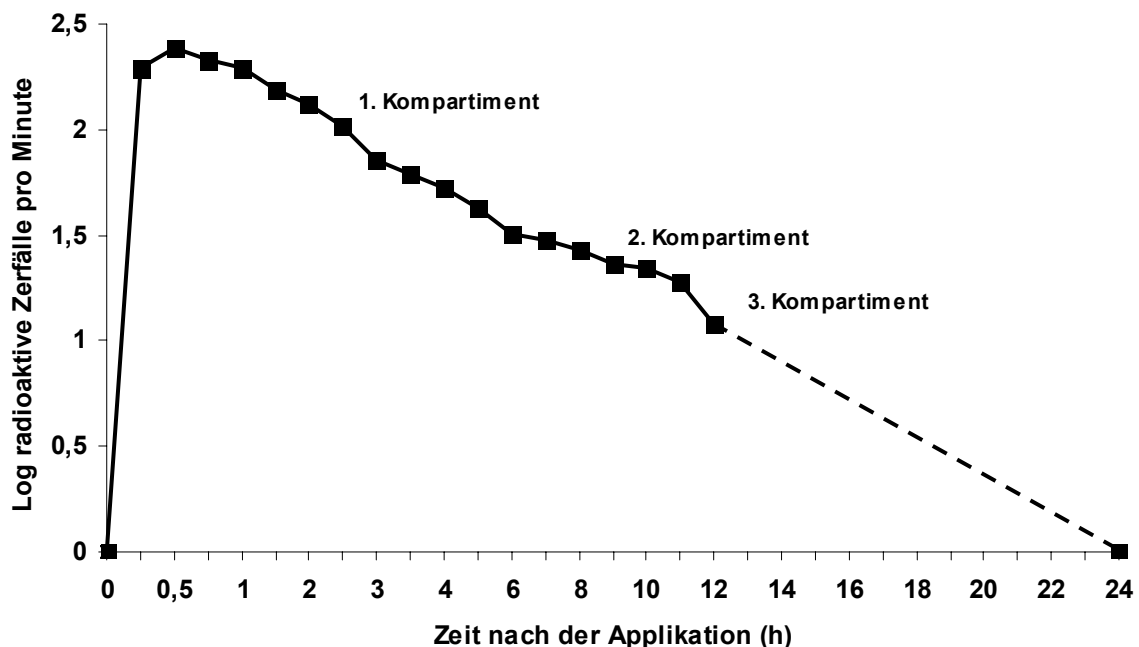


## 5. DISKUSSION

### 5.1. Pharmakokinetik

Dehydroepiandrosteron (DHA) zeigt bei Pferden nach einmaliger intramuskulärer Applikation von  $\leq 250 \mu\text{Ci } ^3\text{H-DHA}$  kombiniert mit je 100 mg DHA und  $\text{D}_2\text{-DHA}$  einen biexponentiellen Konzentrationsabfall im Plasma, der die Berechnung der kinetischen Parameter nach dem offenen Zwei-Kompartiment-Modell ermöglicht (Abb. 10 und Tab. 12).

Nach oraler Gabe von  $\leq 27 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C-DHA}$  kombiniert mit je 100 mg DHA und  $\text{D}_2\text{-DHA}$  könnte zur Beschreibung der Konzentrationskurve bei Pferd 5 auch das offene Drei-Kompartiment-Modell herangezogen werden (Abb. 52).



**Abb. 52:** Verlauf der Plasmakonzentration nach oraler Gabe von  $^{14}\text{C-DHA}$  an Pferd 5. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Bestimmungen im Plasma dar.

Unterschiedliches pharmakokinetisches Verhalten in Bezug auf pharmakokinetische Modelle ist schon beim Hund für Phenobarbital und Primodon beschrieben worden (FREY et al., 1979), als deren Ursache eine Rassenabhängigkeit angenommen wurde. Diese kann im vorliegenden Fall jedoch nicht zur Erklärung dienen. Da der Kurvenverlauf bei Pferd 5 aber nicht wesentlich von dem biexponentiellen Verlauf nach oraler  $^{14}\text{C-DHA}$ -Applikation bei Pferd 4 abwich (Abb. 15), wurden die kinetischen Berechnungen ebenfalls auf Grundlage des Zwei-Kompartiment-Modells vorgenommen (Tab. 19).

Die Halbwertszeit in der Eliminationsphase betrug für intramuskulär verabreichtes  $^3\text{H}$ -DHA zwischen 9 bis 12 Stunden (Tab. 12) und lag damit weit über den für Testosteron beim Pferd (TEALE und HOUGHTON, 1991) und beim Menschen (NEUMANN et al., 1996) bestimmten Werten.

Die Halbwertszeit des oral verabreichten  $^{14}\text{C}$ -DHA lag bei beiden Pferden bei etwa 3 Stunden (Tab. 19). Sie war damit 3 – 4 mal geringer als bei intramuskulär verabreichtem DHA. Dies dürfte hauptsächlich durch den ausgeprägten „first-pass effect“ der Leber, dem das oral verabreichte DHA unterlag (HOUGHTON, 1991a; LÖSCHER et al., 1991; NEUMANN et al., 1996; SNOW, 1993; SCHOENE et al., 1994), zu erklären sein.

Die mit dem Urin insgesamt ausgeschiedene Menge an intramuskulär appliziertem  $^3\text{H}$ -DHA betrug etwa 60% der verabreichten Gesamtdosis (Tab. 13). Bei oral verabreichtem  $^{14}\text{C}$ -DHA lag dieser Wert bei etwa 50% bis zum Abschluß der Urinsammelperiode (Tab. 20). Dieser Unterschied läßt sich hauptsächlich durch die unterschiedliche Applikationsweise erklären: bei der oralen Applikation gelangt ein Teil der applizierten Gesamtdosis an DHA erst gar nicht in den systemischen Kreislauf, da er erst gar nicht aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert, sondern gleich über die Faeces wieder ausgeschieden wird. Des weiteren werden sicherlich geringe Mengen der verbleibenden 40 bzw. 50% der jeweils applizierten Gesamtdosis noch über einen längeren Zeitraum über den Urin abgegeben, ähnlich, wie dies auch für Testosteron nach intramuskulärer Injektion beobachtet werden konnte. Während der größere Teil wohl über enteralem Wege via Gallenflüssigkeit mit den Faeces ausgeschieden wurde (HOUGHTON und DUMASIA, 1979). Da im Rahmen dieser Untersuchung auf eine Sammlung und scintillationsdiagnostische Aufarbeitung der Faeces verzichtet worden war, kann hier jedoch über Menge und Zeitraum, der über enteralem Wege ausgeschiedenen Wirkstoffdosis keine Auskunft gegeben werden.

Methandriol zeigt bei Pferden nach oraler Gabe von  $\leq 145 \mu\text{Ci}$  kombiniert mit je  $\leq 120 \text{ mg}$  MAD und  $\text{D}_3\text{-MAD}$  einen biexponentiellen Konzentrationsabfall im Plasma, der die Berechnung der kinetischen Parameter nach dem offenen Zwei-Kompartiment-Modell ermöglicht (Abb. 19 und Tab. 24).

Die Halbwertszeit des oral verabreichten Methandriol betrug bei Pferd 2 11,99 h (Tab. 24) und entsprach damit etwa der, von intramuskulär appliziertem  $^3\text{H}$ -DHA, d.h. die  $17\alpha$ -Alkylierung stellte einen wirksamen Schutz gegen den first-pass effect der Leber dar (HOUGHTON, 1991a; LÖSCHER et al., 1991; NEUMANN et al., 1996; SNOW, 1993; SCHOENE et al., 1994). Bei Pferd 3 betrug die Halbwertszeit von oral verabreichtem  $^3\text{H}$ -MAD mit 3,75 h (Tab. 24) jedoch nur etwa ein Drittel dieses Wertes und ist damit eher der Halbwertszeit von oral verabreichtem  $^{14}\text{C}$ -DHA (Tab. 19) vergleichbar, welches einem first-pass effect unterlag. Eine Erklärung für diesen großen Unterschied in den Halbwertszeiten konnte nicht gegeben werden. Jedoch hat Pferd 3 auch für intramuskulär verabreichtes  $^3\text{H}$ -

DHA bereits eine um etwa 2,5 h geringere Halbwertszeit gezeigt als Pferd 2 (Tab. 12). Dieses Pferd scheint daher generell über eine schnellere Verstoffwechslung verabreichter Pharmaka in der Leber zu verfügen.

Der Verlauf der Urinausscheidung von  $^3\text{H}$ -MAD-Äquivalenten (Abb. 20 + 21 und Tab. 25) glich jedoch bei beiden Pferden eher dem, von intramuskulär verabreichtem  $^3\text{H}$ -DHA (Abb. 11 +12 und Tab. 13). Bei beiden Steroiden war der Zeitpunkt, zu dem  $\geq 95\%$  der über den Urin ausgeschiedenen Dosis angefallen waren, erst nach etwa 50 Stunden erreicht, während das für oral verabreichtes  $^{14}\text{C}$ -DHA bereits nach 30 – 35 Stunden der Fall war (Tab. 20). Auch bei  $^3\text{H}$ -MAD wurden jedoch nur etwa 50% der verabreichten Gesamtdosis über den Urin ausgeschieden (Tab. 25). Genau wie  $^{14}\text{C}$ -DHA war auch Methandriol oral verabreicht worden. Es gilt hier daher ebenso die dort angeführte Erklärung für den, im Vergleich zu intramuskulär appliziertem  $^3\text{H}$ -DHA, geringeren Prozentsatz an Radioaktivität.

Da in den  $17\alpha$ -Methyltestosteron Versuchen kein radioaktiv markiertes Steroid verabreicht worden war, konnten keine Absorptions- und Eliminationskurven des Stoffes erstellt und somit auch keine pharmakokinetischen Parameter berechnet werden.

## 5.2. Auftrennung der Metaboliten im Urin

### 5.2.1. Dehydroepiandrosteron (DHA)

In Tab. 47 sind zusammenfassend die arithmetischen Mittel und die Standardabweichung der Prozentsätze von FFR, GFR und SFR als Resultat der Verstoffwechslung von DHA beim Pferd dargestellt.

**Tab. 47:** Prozentuale Verteilung der Metaboliten von DHA auf FFR, GFR und SFR nach Verstoffwechslung beim Pferd - arithmetisches Mittel (a.M.)  $\pm$  Standardabweichung (S.D.)

Extrakt	Prozent Radioaktivität (a.M. $\pm$ S.D.)	
	$^3\text{H}$ -DHA	$^{14}\text{C}$ -DHA
FFR	1,5 $\pm$ 1,9	0,0 $\pm$ 0,0
GFR	11,8 $\pm$ 1,5	14,3 $\pm$ 3,9
SFR	60,1 $\pm$ 6,9	58,9 $\pm$ 4,2

Die Resultate der Verteilung der DHA-Metaboliten auf FFR-, GFR- und SFR-Extrakte beim Pferd zeigten für die beiden verabreichten Steroide  $^3\text{H}$ -DHA und  $^{14}\text{C}$ -DHA keinen signifikanten Unterschied (Tab. 47).

Generell läßt sich feststellen, daß DHA nur zu einem sehr geringen Anteil unkonjugiert über den Harnweg ausgeschieden wurde. Diese Tatsache läßt sich durch die große Lipophilie und damit einhergehend ausgeprägte Hydrophobie der Steroide im Allgemeinen und folglich auch des DHA im Speziellen erklären. Diese bedingt eine schlechte Wasserlöslichkeit und somit auch eine extreme Schwierigkeit, die einzelnen Vertreter dieser Stoffklasse in unkonjugierter Form über den Urin ausscheiden zu können. Frei im Plasma zirkulierendes, unkonjugiertes DHA würde also bei Passage der Nieren nach der Exkretion mit dem Primärharn, aufgrund der bereits erwähnten Lipidlöslichkeit sowie der weitgehenden elektrischen Neutralität des einzelnen Moleküls, im proximalen Tubulus des Glomerulums zum weitaus größten Teil wieder rückresorbiert werden und damit im Organismus verbleiben (BAGGOT, 1977a).

Um DHA in einer wasserlöslichen Form ausscheidungsfähig zu machen, waren daher umfangreiche, biotransformatorische Prozesse des Phase-I- und Phase-II-Metabolismus in der Leber Voraussetzung. Diese bestanden im Rahmen des Phase-I-Metabolismus insbesondere in der Einführung von Hydroxyl(-OH)-Gruppen (s. Abb. 25 + 26). Im anschließenden Phase-II-Metabolismus erfolgte dann eine Konjugation mit, zum geringeren Teil Glucuronsäure (10-15%) und zum weitaus größeren Teil Schwefelsäure (60%) (Tab. 47) (NEUMANN et al, 1996). Diese Verteilung stimmte weitestgehend mit den Beobachtungen überein, welche bei der Untersuchung des Testosteronmetabolismus beim Pferd gemacht worden waren (HOUGHTON und DUMASIA, 1979).

Bei der Urinanalyse nach oraler und intramuskulärer Verabreichung von DHA kam es zu folgenden Verlusten an Radioaktivität (s. 4.1.2.3. Auftrennung der Metaboliten von  $^3\text{H}$ -DHA im Urin, 4.1.4.3. Auftrennung der Metaboliten von  $^{14}\text{C}$ -DHA im Urin und Tab. I - IV – im Anhang):

1. Große Schwankungen der Gesamtwiederauffindung,
2. Hohe Verluste an Radioaktivität in die verwendeten Wasch-Lösungen,
3. Hohe Verluste an Radioaktivität in den  $U_{N/E}$  bei der Verwendung der Sep Pak- $\text{C}_{18}$ -Kartusche; Part Nr.: 51910.

Da die bei der urinanalytischen Aufarbeitung von  $^3\text{H}$ -DHA und  $^{14}\text{C}$ -DHA auftretenden Probleme in etwa identisch waren, wurden in VERSUCH A und B folgende Änderungen in der Urinanalyse eingeführt (s. 4.1.2.3. Auftrennung der Metaboliten von  $^3\text{H}$ -DHA im Urin, 4.1.4.3. Auftrennung der Metaboliten von  $^{14}\text{C}$ -DHA im Urin und Tab. II - IV – im Anhang), die jedoch nur eine geringfügige Verbesserung des Extraktionsergebnisses erzielten:

1. Verwendung einer SepPak- $tC_{18}$ -Kartusche; Part Nr.: 36 800; anstelle der üblicherweise verwendeten SepPak- $C_{18}$ -Kartusche; Part Nr.: 51910,
2. Verwendung von gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung als Waschlösung für GFR und SFR.

Die Resultate verschiedener fraktionierter Chromatographien unterschieden sich für die FFR-, GFR- und SFR-Extrakte von DHA (s. 4.1.2.4. Metabolisches Profil von  $^3H$ -DHA-Äquivalenten und 4.1.4.4. Metabolisches Profil von  $^{14}C$ -DHA-Äquivalenten) deutlich voneinander: Im FFR-Extrakt von  $^3H$ -DHA und einer Gesamtwiederauffindung von >75% fand sich eine weit gestreute Verteilung der applizierten Radioaktivität über einen Großteil der gesammelten Fraktionen, sowie jeweils ein Anteil von 5-10% der applizierten Radioaktivität im Methanol-Extrakt (Abb. 13a+b und Tab. 15 + 16), In den GFR- und SFR-Extrakten von  $^{14}C$ -DHA betrug die Gesamtwiederauffindung in keinem Falle >32%, mit einer Konzentration der wiederaufgefundenen Radioaktivität auf wenige Fraktionen. Ein Nachweis von Radioaktivität im Methanol-Extrakt gelang nicht (Tab. 21). Dieses widersprüchliche Verhalten könnte durch eine unterschiedliche Polarität und / oder Hydrophilie der einzelnen, in den Extrakten vorhandenen Metaboliten bedingt sein.

Mit Hilfe spezifischer Aufarbeitungen (Destillation, Lyophilisierung) konnte nachgewiesen werden, daß es im Verlauf von Verstoffwechslung und Ausscheidung der Substanzen weder im Plasma noch im Urin zu 'Rücktausch'-Phänomen radioaktiv-markierter gegen unmarkierte Atome zwischen den Steroiden und den jeweiligen Flüssigkeiten kam (s. 4.1.2.3. Auftrennung der Metaboliten von  $^3H$ -DHA im Urin).

Für die noch verbleibenden 25-30% (100% - (%FFR + %GFR + %SFR)) der mit dem Urin ausgeschiedenen Metaboliten, konnte eine Zuordnung zu einer der drei Fraktionen auch nach den vorgenommenen Änderungen in der Extraktionsmethode nicht vorgenommen werden. Eine eindeutige Erklärung für diese Verluste konnte nicht gegeben werden.

### 5.2.2. Methandriol (MAD)

In Tab. 48 sind zusammenfassend die arithmetischen Mittel und die Standardabweichung der Prozentsätze von FFR, GFR und SFR als Resultat der Verstoffwechslung von MAD beim Pferd dargestellt.

Wie schon für DHA festgestellt (Tab. 47), wurde auch  $^3H$ -MAD nur zu einem geringen Prozentsatz in unkonjugierter Form ausgeschieden. Dieser lag allerdings mit 3,8% beinahe doppelt so hoch wie für  $^3H$ -DHA (Tab. 47 + 48). Ein Anteil von 12,5% der Metaboliten wurde als Glucuronsäure-Konjugat ausgeschieden. Dieser Prozentsatz stimmte in etwa mit den für DHA bestimmten Werten überein (Tab. 47 + 48). Der weitaus größte Teil der bestimmbar Metaboliten wurde auch in diesem Falle als Schwefelsäure-Konjugat ausgeschieden.

Allerdings lag der Anteil dieser Konjugate mit 51,8% für MAD (Tab. 48) um beinahe 10% niedriger als die für  $^3\text{H}$ -DHA (60,1%) und  $^{14}\text{C}$ -DHA (58,9%) ermittelten Werte (Tab. 47 + 48).

**Tab. 48:** Prozentuale Verteilung der Metaboliten von MAD auf FFR, GFR und SFR nach Verstoffwechselung beim Pferd - arithmetisches Mittel (a.M.)  $\pm$  Standardabweichung (S.D.)

Extrakt	Prozent Radioaktivität (a.M. $\pm$ S.D.)	
	$^3\text{H}$ -MAD	
FFR	3,8 $\pm$ 1,7	
GFR	12,5 $\pm$ 4,2	
SFR	51,8 $\pm$ 5,9	

Auch bei MAD hatten also im Rahmen des Phase-I- und Phase-II-Metabolismus umfangreiche, biotransformatorische Prozesse stattgefunden, um das Steroid in eine wasserlösliche und damit über die Nieren ausscheidbare Form zu bringen (Abb. 31 - 34).

Eine fraktionierte Chromatographie erbrachte für den GFR-Extrakt von MAD die Verteilung der Radioaktivität in einige wenige Fraktionen sowie den Methanol-Extrakt (Abb. 22a und Tab. 26). Daß es, im Gegensatz zu  $^{14}\text{C}$ -DHA (Tab. 21), für GFR auch zum Auffinden weiterer Metaboliten im Methanol-Extrakt (Abb. 22a und Tab. 26) kam, deutet auf das zusätzliche Vorkommen von MAD-Metaboliten mit größerer Polarität und / oder Hydrophilie hin, als im Falle der Verstoffwechselung von DHA durch das Pferd.

Der SFR-Extrakt von MAD zeigte nach fraktionierter Chromatographie eine weitgestreute Verteilung der Radioaktivität über alle Fraktionen, mit Konzentration in insgesamt vier Peaks sowie dem Methanol-Extrakt (Abb. 22b und Tab. 26). Im Vergleich mit dem Ergebnis der fraktionierten Chromatographie des SFR-Extraktes von  $^{14}\text{C}$ -DHA (Tab. 21), gilt das für den GFR-Extrakt ausgeführt. Die Ergebnisse der gc/ms-Analyse unterstreichen diese Interpretation der jeweiligen Resultate (Tab. 36 + 39 und Abb. 25 + 26 und 31 - 34).

Für die noch verbleibenden 30-35% (100% - (%FFR + %GFR + %SFR)) der mit dem Urin ausgeschiedenen Metaboliten konnte, aus den bereits für DHA erläuterten Verlusten an Radioaktivität (s. 5.2.1. Dehydroepiandrosteron), eine Zuordnung zu einer der drei Fraktionen ebenfalls nicht erfolgen (s. 4.2.2.3. Auftrennung der Metaboliten von  $^3\text{H}$ -MAD im Urin).

### 5.2.3. 17 $\alpha$ -Methyltestosteron

Da bei den 17 $\alpha$ -MT Experimenten kein radioaktiv-markiertes Isotop verabreicht worden war, konnte der prozentuale Anteil der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Metaboliten nicht bestimmt werden. Es konnten lediglich hypothetische Rückschlüsse aus dem Verteilungsverhältnis von DHA, MAD, sowie Testosteron gezogen werden (HOUGHTON und DUMASIA, 1979; DUMASIA und HOUGHTON, 1981, 1986). Selbige legten mit großer Wahrscheinlichkeit folgende Verteilung der Metaboliten nahe: 0-5% im FFR-, 10-20% im GFR- und 50-60% im SFR-Extrakt.

## 5.3. Diskussion der massenspektrometrischen Ergebnisse

### 5.3.1. Erläuterungen zur Massenspektrometrie

Die in den VERSUCHEN A-D verabreichten Substanzgemische ermöglichten aufgrund des gleichzeitigen Vorkommens deuterierter und nicht-deuterierter Fragmente die massenspektrometrische Zuordnung von auf diese Weise charakterisierten Metaboliten zu der jeweils verabreichten Ausgangssubstanz (McLAFFERTY, 1967).

Die Massenspektren dieser Metaboliten wiesen typische „twin-ion peaks“ auf. Diese kommen dadurch zustande, daß identische Bruchstücke der einzelnen, gaschromatographisch nicht zu trennenden, deuterierten / nicht-deuterierten Metaboliten-Paare, in ein und demselben Peak im Massenspektrum nachzuweisen sind (McLAFFERTY, 1967). Diese Metaboliten-Paare unterscheiden sich jeweils lediglich um zwei oder drei Masseneinheiten voneinander (Tab. 37, 40 + 44). Dabei wird der aufsteigende Teil eines jeden solchen Peaks durch das hauptsächliche Auftreten des deuterierten, der absteigende Teil desselben Peaks durch das hauptsächliche Auftreten des nicht-deuterierten Bruchstückes markiert (Abb. 29, 30, 35, 49 + 50) (McLAFFERTY, 1967).

In Tab. 49 sind die aus früheren, bereits am HFL durchgeführten Experimenten, bekannten und für mit MO-TMS derivatisierte (s. 3.5.4.2. MO-TMS-Derivatisierung), anabole Steroide (Abb. 1) charakteristischen Bruchstücke der gc/ms-Analyse erläutert (HOUGHTON, 1991b, 1992b; SCHOENE et al., 1994). Als M<sup>+</sup>-Ion wird dabei der unfragmentierte und (im allgemeinen) vollständig derivatisierte, aufgrund der Elektrischen Ionisation jedoch einfach positiv geladene Metabolit bezeichnet. Bei der Chemischen Ionisation zeichnet sich M<sup>+</sup> meist dadurch aus, daß er eine um 1 höhere Masse besitzt, als sein durch EI entstehendes Pendant (SCHOENE et al., 1994). Die deuterierten Analoga der Ringfragmente (Tab. 49) besitzen die Masseneinheiten m/z 146, m/z 221 und m/z 234 (Tab. 40, 41, 44 + 45). Ein ebensolches Analogon besteht für m/z 129 nicht, da im Falle des DHA eine Markierung mit

Deuterium im A-Ring vorliegt (Abb. 9a). Wie in Tab. 49 dargestellt, erfolgt eine Anlagerung von Trimethylsilyl (TMS) an die im Steroidmetaboliten vorhandenen Hydroxyl(-OH)-Gruppen. Die so entstehende Molekülmasse von M+, sowie die im Massenspektrometer typischerweise entstehenden Fragmente M-90, M-180, M-270, etc., geben somit Aufschluß, über die Anzahl, der durch biotransformatorische Prozesse des Phase-I-Metabolismus in das ursprünglich verabreichte Steroid (hier: DHA, MAD & 17 $\alpha$ -MT) eingefügten Hydroxyl(-OH)-Gruppen (Abb. 25, 26, 31 – 34 + 38 – 48 und Tab. 37, 38, 40, 41, 44 + 45). Gleiches gilt für Methoxyamin (MO) als Indikator für das Vorhandensein von Keto-Gruppen im Steroidmolekül (Abb. 34, 39, 40, 47 + 48 und Tab. 39 - 41, 43 – 45 + 49) (DUMASIA, 1981; TEALE und HOUGHTON, 1988, 1991).

**Tab. 49:** Charakteristische Fragmente von Steroidmolekülen in der gc/ms-Analyse nach MO-TMS-Derivatisierung (Vergleiche Tab. 37, 38, 40, 41, 44 + 45)

m/z-Ratio des Fragments (u)	Fragment
M+	Vollständig derivatisierter, einfach positive geladener, unfragmentierter Metabolit Anlagerung von Trimethylsilyl (TMS) an Hydroxyl(-OH)-Gruppen
129	C <sub>3</sub> -hydroxiliertes A-Ring (DHA)
143	C <sub>17</sub> -hydroxiliertes und -methyliertes D-Ring (MAD, 17 $\alpha$ -MT)
218 / 231	C <sub>17</sub> -hydroxiliertes und -methyliertes & C <sub>16</sub> -hydroxiliertes D-Ring (MAD, 17 $\alpha$ -MT)
231	C <sub>17</sub> -hydroxiliertes und -methyliertes & C <sub>15</sub> -hydroxiliertes D-Ring (MAD, 17 $\alpha$ -MT)
M-15	Abspaltung einer Methylgruppe (-CH <sub>3</sub> ) von TMS
M-90	Abspaltung des gesamten TMS-Moleküls
M-180	Abspaltung von zwei TMS Molekülen
M-270	Abspaltung von drei TMS-Molekülen
M-31	Anlagerung von Methoxyaminhydrochlorid (MO) an Keto(-C=O)-Gruppen Abspaltung des gesamten MO-Moleküls

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

Aufgrund des charakteristischen Auftretens von Ionen(paaren) der typischen Fragmente von Steroidmetaboliten im Massenspektrometer, läßt sich also für jeden einzelnen Metaboliten eine Liste typischer Fragmentationen(paare) erstellen (Tab. 37, 40 + 44). Mit Hilfe



entsprechender Tabellen kann dann, wie bei den NACHWEIS-Experimenten von MAD & 17 $\alpha$ -MT (Tab. 42 + 46) geschehen, eine Identifizierung eventuell vorhandener Metaboliten in zur Dopingkontrolle eingesandten Analyseflüssigkeiten (hier: Urin) vorgenommen werden. Diese, aus früheren gc/ms-analytischen Untersuchungen von Steroiden am HFL gewonnenen Erkenntnisse (TEALE und HOUGHTON, 1988, 1991) in Verbindung mit Erfahrungswerten in Bezug auf die Wahrscheinlichkeit der Anlagerung von Hydroxylgruppen an prädestinierte C-Atome des Steroidmoleküls im Verlauf des Phase-I-Metabolismus beim Pferd (DUMASIA, 1981; DUMASIA und HOUGHTON, 1981, 1986, 1988; DUMASIA et al., 1989) ließen eine weitgehende Festlegung von Strukturformeln für die einzelnen, aufgefundenen Metaboliten zu (Abb. 25, 26, 31 – 34 + 38 – 48). Dabei wurde im Rahmen dieser Untersuchung beim Auftreten von Isomeren ein- und desselben Metaboliten jedoch darauf verzichtet, durch entsprechende Referenzsubstanzen eine eindeutige Definition der Stereochemie des einzelnen Isomers vorzunehmen.

### 5.3.2. gc/ms-Daten von DHA

Die gc/ms Analyse von DHA führte zur Feststellung von drei Hauptmetaboliten dieses Steroides beim Pferd: DHA, Androstendiol und Androstandiol. Von ersterem konnten jeweils mehrere Isomere in den GFR- und SFR- Extrakten aufgefunden werden. Für FFR gelang eine Darstellung von Metaboliten in der gc/ms-Analyse nicht (Tab. 36). Als Quintessenz sämtlicher durchgeführter Experimente ließen sich für GFR von DHA alle vier möglichen Androstendiol- (-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -, -3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -, -3 $\beta$ ,17 $\alpha$ - und -3 $\beta$ ,17 $\beta$ -OH), sowie ein Androstandiol-Isomer, für SFR von DHA drei mögliche Androstendiol-, sowie ein weiteres Androstandiol-Isomer ermitteln. Auf eine genauere Bestimmung der Stereochemie der einzelnen Isomere wurde jedoch verzichtet. Es kann aber davon ausgegangen werden, daß es sich bei den beiden zeitlich zuerst auffindbaren Androstendiol-Isomeren der GFR um die 17 $\beta$ -, bei den beiden zeitlich nachfolgenden um die 17 $\alpha$ -Isomere handelt. Wie aus früheren Untersuchungen bekannt ist, werden 17 $\beta$ -Isomere von Steroiden unter den erwähnten gc/ms-analytischen Bedingungen vor 17 $\alpha$ -Isomeren von der Gaschromatographiesäule eluiert (DUMASIA, 1992).

Sowohl die für die einzelnen Fraktionen erstellten Gaschromatogramme, als auch die Massenspektren der jeweiligen Metaboliten wiesen starke Verunreinigungen auf, während die Steroide selber oft nur in sehr geringer Konzentration anzutreffen waren. Hauptursache für letzteres Phänomen sind sicherlich die bei der Extraktion aufgetretenen Verluste an Radioaktivität und somit Metaboliten. Diese führten dazu, daß z.T. lediglich 1/10 bis 1/20 der ursprünglich im U<sub>24</sub> vorhandenen Metaboliten, weiter aufgeteilt auf FRR, GFR und SFR, zur gc/ms-Analyse gelangten.

Es konnten somit nur solche Metaboliten eindeutig bestimmt werden, welche in hoher Konzentration im U<sub>24</sub> und somit anschließend in den einzelnen Extrakten vorhanden waren. Metaboliten geringerer Konzentration dagegen wurden im massenspektrometrischen Bild von Hintergrund- und Fremdverunreinigungen überlagert, so daß sie nicht eindeutig oder gar nicht zu bestimmen waren. Als Fremdverunreinigungen finden sich vor allem bestimmte Futterbestandteile, sowie aus den zur Extraktion und Analyse verwendeten Gerätschaften ausgewaschene Substanzen (TEALE, 1992).

Zur zweifelsfreien Bestimmung weiterer / aller Metaboliten des DHA beim Pferd wäre es daher notwendig, die verwendete Extraktionsmethode so zu optimieren, daß der hohe Verlust an Radioaktivität möglichst gänzlich unterbunden werden kann. Die im Rahmen dieser Arbeit dahingehend unternommenen Versuche erbrachten dabei jedoch nicht den gewünschten Erfolg.

### 5.3.3. gc/ms-Daten von MAD

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich und in der Diskussion dargelegt, bestand auch für MAD das Problem hoher Verluste an Radioaktivität während der Extraktion. Dieses konnte mit den aufgezeigten Methoden wiederum nicht zufriedenstellend gelöst werden. Dadurch bedingt war die eindeutige Bestimmung einiger, im massenspektrometrischen Bild zu erahnender Metaboliten des MAD beim Pferd nicht möglich. Diese lediglich zu vermutenden Metaboliten wurden deshalb im Ergebnisteil nicht aufgeführt, sollen jedoch in Tab. 50 kurz aufgelistet werden:

**Tab. 50:** Übersicht, über weitere, nicht näher bestimmbare Metaboliten des MAD

m/z-Ratio	Metabolit
M+ = 624/627	Tetrol
M+ = 536/539	Triol
M+ = 538/541	Gesättigtes Triol – Hydroxylierung (und
D-Ring-Fragment = 143/146	Derivatisierung) erfolgten nicht im D-Ring, sondern vermutlich im B-Ring

Vier Metaboliten des MAD ließen sich mittels der gc/ms-Analyse eindeutig für GFR und SFR bestimmen. Dabei kamen in den beiden Fraktionen keine identischen Metaboliten vor (Tab. 39). Für FFR gelang eine Darstellung von Metaboliten in der gc/ms-Analyse nicht.

Das für SFR nachzuweisende MAD unterschied sich in der gaschromatographischen Retentionszeit und im massenspektrometrischen Bild von dem MAD, welches für GFR bestimmt werden konnte. Da letzteres mit dem verabreichten MAD (Kontrolle mit gc/ms-Daten des Standards) identisch war, lag es nahe, eine stereochemische Umwandlung des MAD während des Phase-I- und -II-Metabolismus anzunehmen (s. auch 17 $\alpha$ -MT; SCHOENE et al., 1994). Wiederum wurde eine genauere Bestimmung der Stereochemie dieses Isomers im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht vorgenommen.

Für GFR ließen sich neben den eindeutig zu definierenden Metaboliten I, IV & V zwei nicht näher bestimmbare Metaboliten (VI & VI) feststellen, welche sich hauptsächlich aufgrund ihrer prominenten m/z 143/146 Peaks als solche zu erkennen gaben. Sie lagen - ausgehend von ihrer gaschromatographischen Retentionszeit - in ihrer Polarität zwischen derjenigen von MAD, sowie derjenigen der gesättigten Tetrole, so daß es sich bei ihnen wahrscheinlich um weitere Diol- oder Triol-Isomere handelt (Tab. 39). Ihre Struktur konnte jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht eingehender bestimmt werden.

Einen weiteren, nur hypothetisch genauer zu charakterisierenden Metaboliten stellte IX dar. Das M<sup>+</sup>-Paar m/z 642/645 zusammen mit den weiteren auffindbaren Fragmentationen(paaren) m/z 624/627 und m/z 534/537, sowie den typischen D-Ring-Fragmenten m/z 218/221 und m/z 231/234 ließen darauf schließen, daß es sich bei IX um ein derivatisiertes 3,(6/7),16,17-Tetrol handelte, welches eine weitere, nicht-derivatisierte Hydroxylgruppe (u H<sub>2</sub>O = 18; 624/627 + 18 = 642/645) enthielt (Tab. 39 – 41) (SCHOENE et al., 1994).

Häufigste Anlagerungsstelle der fünften (-OH)-Gruppe in diesen Pentol-Steroiden stellt das C<sub>11</sub>-Atom dar. Die räumliche Anordnung der Hydroxylgruppe an dieser Stelle, in enger Nachbarschaft zur Methylgruppe des C<sub>17</sub> und eventuell auch zu den TMS-Molekülen der derivatisierten C<sub>6/7</sub>- und / oder C<sub>15/16</sub>-, sowie C<sub>17</sub>-Atome, könnte dazu geführt haben, daß die fünfte Hydroxylgruppe aus 'Platzmangel' nicht mehr derivatisiert werden konnte. In diesem Falle ergab sich für M<sup>+</sup> nicht der für ein vollständig derivatisiertes M<sup>+</sup> eines solchen Pentol-Steroids zu erwartende Wert von m/z 714/717, sondern lediglich der von m/z 642/645 (HOUGHTON, 1994 a; SCHOENE et al., 1994). An eindeutig zu definierenden Metaboliten fanden sich für GFR von MAD zwei gesättigte Tetrol-Isomere (IV): M<sup>+</sup> = m/z 626/629 und vier (-OH)-Gruppen sowie ein Keto-Triol (V): M<sup>+</sup> m/z 579/582 und Keto-Gruppe plus drei (-OH)-Gruppen (Tab. 39 – 41).

Für SFR ließ sich, neben den eindeutig zu definierenden Metaboliten I, II & III ein nicht näher bestimmbarer Metabolit (VIII) feststellen, welcher sich hauptsächlich aufgrund seines prominenten m/z 143/146 Peaks als solcher zu erkennen gab (Tab. 39 – 41). Auch dieser Metabolit besaß seinem gaschromatographischem Verhalten nach eine Polarität, welche zwischen derjenigen von MAD einerseits, sowie derjenigen eines gesättigten Triol-Isomers

andererseits einzuordnen wäre. Die Wahrscheinlichkeit lag deshalb nahe, daß es sich auch bei diesem Metaboliten um ein Diol- oder Triol-Isomer handelte. Abschließend ließ sich weiterhin feststellen, daß sich für SFR eine geringere Anzahl polarer Metaboliten (lediglich Diole und Triole) bestimmen ließ, als für GFR (Diole, evtl. Triole, Tetrole, Keto-Triole und Pentole).

Es bleibt abzuwarten, ob bei einer weitergehenden Untersuchung der MAD-Metaboliten beim Pferd, nach dem erfolgreichen Ausschluß der bereits oben erwähnten Extraktionsverluste, diese Resultate bestätigt werden können. So haben inzwischen bereits am HFL vorgenommene lc/ms-analytische Untersuchungen von MAD-haltigem U<sub>24</sub> ergeben, daß große Teile der mit den Waschlösungen verlorengehenden Radioaktivität aus mit Schwefelsäure konjugierten Metaboliten bestehen. Eine genauere Charakterisierung dieser Metaboliten hat jedoch noch nicht stattgefunden (HOUGHTON, 1994b).

Auch die Ergebnisse der MAD-NACHWEIS-Experimente waren aufgrund der schon mehrfach beschriebenen Extraktionsprobleme wenig vielversprechend. So ließ sich in dem kombinierten GFR- und SFR-Extrakt lediglich die Ausgangssubstanz MAD (Metabolit I) als prominentester Metabolit nachweisen. Dies gelang relativ gut bis einschließlich U<sub>8</sub>, d.h., bis etwa 50 h nach der Applikation (Tab. 42).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß mit der angewendeten Urinextraktionsmethode in Kombination mit anschließender gc/ms-analytischer Aufarbeitung der Extrakte ein sicherer und zufriedenstellender Nachweis von MAD und seinen Metaboliten nicht eindeutig gelang. Die beschriebene Methode eignet sich also nicht zum zweifelsfreien Nachweis einer unerlaubten MAD-Anwendung beim Pferd im Rahmen einer routinemäßigen Dopinganalytik. Es bleiben daher die weiteren Ergebnisse der lc/ms-analytischen Untersuchungen von MAD, welche seit kurzem am HFL durchgeführt werden, abzuwarten.

#### **5.3.4. gc/ms-Daten von 17 $\alpha$ -MT**

Im Gegensatz zu den beiden bisher beschriebenen Substanzen zeigten die gc/ms-analytischen Aufarbeitungen von 17 $\alpha$ -MT recht vielversprechende Ergebnisse. Insgesamt gelang die eindeutige massenspektrometrische Darstellung von 18 Metaboliten mit teilweise mehreren Isomeren für die Verstoffwechslung von 17 $\alpha$ -MT beim Pferd. Von diesen fanden sich drei als jeweils identische Isomere in mindestens zwei Fraktionen (II, VIb, VIIb), sowie einer als jeweils identisches Isomer in allen drei Fraktionen (VIa) (Tab. 43).

Diese große Anzahl einfach zu bestimmender Metaboliten könnte darauf hinweisen, daß möglicherweise die bei der Extraktion von DHA und MAD aufgetretenen Verluste bei 17 $\alpha$ -MT nicht, oder nur in sehr geringem Ausmaß, vorkamen. Wie ja auch für Testosteron keine solchen Verluste beobachtet werden konnten (HOUGHTON und DUMASIA, 1979). Zum

Nachweis der Richtigkeit dieser Annahme wäre jedoch eine Verabreichung von radioaktiv-markiertem  $17\alpha$ -MT an Versuchspferde erforderlich. Aus welchem Grund aber die für DHA und MAD beschriebenen Verluste bei  $17\alpha$ -MT nicht aufzutreten schienen, kann z.Zt. nicht erklärt werden.

Für  $17\alpha$ -MT gelang erstmals die eindeutige Darstellung von Metaboliten auch für FFR (Tab. 43). Insgesamt ließen sich für diese Fraktion elf Metaboliten bestimmen (Tab. 43). Dabei gelang die Zuordnung einer Strukturformel für acht (I – VIb) dieser Metaboliten (Abb. 7, 38 – 40, 42 + 43). Während die restlichen Metaboliten sich lediglich durch das Vorkommen markanter Peaks bei  $m/z$  143/146 (XII, XIII und XV) als solche zu erkennen gaben (Tab. 43 + 44) - Die Metaboliten I bis III (Abb. 7, 38 + 39) kamen dabei jeweils in zwei unterschiedlichen Isomeren vor. Somit konnte also ebenso für die Ausgangssubstanz  $17\alpha$ -MT mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Veränderung der Isomerie im Rahmen des Phase-I-Metabolismus konstatiert werden, wie das auch für MAD der Fall war (SCHOENE et al., 1994). Auch hier wurde wiederum auf eine genauere Bestimmung der Isomerie verzichtet (Abb. 7, 38 + 39 und Tab. 43). Bei diesen Ergebnissen erstaunte, daß sich gerade relativ unpolare Metaboliten -  $17\alpha$ -MT, gesättigte u. ungesättigte Keto-Diole – im FFR-Extrakt fanden. Es erschien merkwürdig, daß gerade diese, bereits aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit schwer ausscheidbaren Metaboliten, zusätzlich noch in unkonjugierter Form vorlagen.

Für GFR von  $17\alpha$ -MT ließen sich insgesamt zehn Metaboliten auffinden (Tab. 43). Von diesen waren drei mit Metaboliten der FFR (VIa, XII & XIII), sowie zwei weitere mit Metaboliten der SFR (VIa & VIIb) identisch. Für vier der aufgefundenen Metaboliten (XII, XII – XV und XVIII) war eine strukturelle Zuordnung nicht möglich. Lediglich das Auftreten charakteristischer twin-ion Peaks von  $m/z$  143/146 (XII – XV) wies darauf hin, daß dem  $m/z$ -Bild stoffwechselbedingte Steroidderivate des  $17\alpha$ -MT zugrunde liegen mußten. Auch die  $gc/ms$ -Aufarbeitung mittels CI ließ für den Metaboliten XII keine weitergehenden Rückschlüsse auf seine Struktur zu (Ergebnisse nicht gezeigt). Der markante, das massenspektrometrische Bild dominierende Peak bei  $m/z$  231/234 des Metaboliten XVIII wies eindeutig darauf hin, daß es sich bei diesem um einen am  $C_{15}$ -Atom hydroxylierten (und derivatisierten) Stoffwechselabkömmling des  $17\alpha$ -MT handelte. Detailliertere, strukturelle Rückschlüsse ließen sich im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht ziehen (SCHOENE et al., 1994). Für sechs der zehn Metaboliten gelang auch eine Darstellung mittels Strukturformel (Abb. 42, 45 + 47). Bei zwei der aufgefundenen Metaboliten (VIIb und IX) handelte es sich dabei um je zwei Strukturisomere (Tab. 43). Bei dem Metaboliten IX deuteten  $M^+$ , sowie die Fragmentationen darauf hin, daß es sich um ein Stoffwechselprodukt des  $17\alpha$ -MT handelte, welches im Rahmen des hepatischen Phase-I-Metabolismus die ursprüngliche Ketogruppe am  $C_3$ - und die Hydroxylgruppe am  $C_{17}$ -Atom behalten, sowie

zwei weitere Hydroxylgruppen hinzugefügt bekommen hatte. Aufgrund des Auftretens von Fragmentationen sowohl bei  $m/z$  218/221 als auch bei  $m/z$  231/234 erschien die Postulierung einer  $C_{16/17}$ -Hydroxylierung zulässig (Tab. 44 + 45). Während genauere Angaben über die Hydroxylierungsposition im B-Ring nicht gemacht werden konnten (SCHOENE et al., 1994). Des Weiteren fanden sich ausschließlich gesättigte Metaboliten für GFR; Und zwar neben den beiden Isomeren des gesättigten 3,(6/7),16,17-Tetrols (VIIb), auch ein gesättigtes (6/7)-Triol (VIa) (Abb. 42 + 45 und Tab. 43 – 45).

Für SFR von  $17\alpha$ -MT ließen sich insgesamt zwölf Metaboliten auffinden (Tab. 43). Von diesen war einer mit einem Metaboliten der GFR (VIIb), sowie ein weiterer (VIa) mit einem Metaboliten der FFR und GFR identisch. Ein weiterer Metabolit der SFR (XI) stimmte in seiner gaschromatographischen Retentionszeit mit Metabolit I, d.h. einem Isomer der FFR, überein. Jedoch konnte aus dem massenspektrometrischen Bild des ersteren nicht eindeutig auf seine Struktur geschlossen werden. Er wurde deshalb als weiterer, unbekannter Metabolit geführt (Tab. 43 + 44). Ferner fanden sich insgesamt acht eindeutig zu definierende Metaboliten (II, V, VIa, VIb, VIIa, VIIb, VIII und X), von denen einer (V) in Form von zwei Stereoisomeren nachzuweisen war (Abb. 38, 41, 42 – 46 + 48 und Tab. 43). Für die übrigen drei aufgefundenen Metaboliten (XI, XVI und XVII) war eine strukturelle Zuordnung nicht möglich. Lediglich das Auftreten charakteristischer twin-ion Peaks von  $m/z$  143/146 oder  $m/z$  642/645 wies darauf hin, daß dem massenspektrometrischen Bild stoffwechselbedingte Steroidderivate des  $17\alpha$ -MT zugrunde liegen mußten (Tab. 43 - 45). Dabei gilt für den Metaboliten XVII bezüglich der zugrundeliegenden, als wahrscheinlich angenommenen Struktur, das bereits bei MAD für den - dort allerdings für GFR aufgefundenen - Metaboliten IX Ausgeführte (s. 5.4.3. gc/ms-Daten von MAD). Von den acht eindeutig bestimmbaren Metaboliten ließ sich das gesättigte Diol (II) mit hoher Wahrscheinlichkeit als 17-Hydroxy- $17\alpha$ -methyl-5 $\beta$ -androstano-3-ol genau definieren. Basis für diese Annahme war die Übereinstimmung charakteristischer Merkmale wie z.B. der relativen Intensität von  $m/z$  270 dieses Metaboliten mit den für 17-Hydroxy- $17\alpha$ -methyl-5 $\beta$ -androstano-3-ol als  $17\alpha$ -MT-Stoffwechselprodukt beim Menschen bestimmten Charakteristika (SCHÄNZER et al., 1992). Insgesamt fanden sich für SFR mit vier gesättigten Triolen (V, VIa & VIb), einem Tetrol (VIII), zwei gesättigten Tetrolen (VIIa & VIIb), einem angenommenen Pentol (XVII), sowie einem gesättigten Keto-Triol (X) die, im Vergleich zu FFR und GFR, Metaboliten mit der größten Polarität (Tab. 43).

Auch die  $17\alpha$ -MT-NACHWEIS-Experimente zeigten recht vielversprechende Ergebnisse. So ließen sich in den untersuchten GFR- und SFR-Extrakten jeweils mehrere Metaboliten nachweisen (Tab. 46). Die einzelnen Analysesubstanzen wurden dabei mit Hilfe von Ionen-Chromatogrammen von  $m/z$  143,  $m/z$  218 und / oder  $m/z$  231 (d.h., typischer D-Ring-Fragmente  $17\alpha$ -hydroxylierter u. -methylierter Steroidderivate) auf das Vorkommen von

Metaboliten untersucht. Dieses "Single Ion Monitoring" (SIM) erlaubt eine zeitsparende und routinemäßige Kontrolle von Analysematerial, setzt jedoch möglichst hintergrundfreie Extrakte und eine gewisse Mindestkonzentration der einzelnen Metaboliten voraus.

Für GFR ergaben sich beim SIM des m/z 143 zwei Metaboliten und zwar das gesättigte Diol (II) sowie das gesättigte (6/7)-Triol (VIa) (Tab. 43 + 46). Das SIM von m/z 218- und m/z 231-Ionen ermöglichte zusätzlich das Auffinden von zwei Isomeren des gesättigten Triols (VIb) (Tab. 43 + 46).

Für SFR ergab das SIM von m/z 143 den eindeutigen Nachweis von Metabolit II, wobei die gaschromatographische Retentionszeit und Scannummer jedoch nicht mit den für GFR ermittelten Werten übereinstimmten (Tab. 43 + 46). Daraus ließ sich schließen, daß der für GFR bestimmte Metabolit II ein Stereoisomer des für SFR ermittelten darstellte. Das SIM von m/z 218 und m/z 231 von SFR führte zur eindeutigen Bestimmung von insgesamt drei Metaboliten (V, VIb und VIIb) (Tab. 43 + 46).

Die in diesen NACHWEIS-Experimenten erzielten Ergebnisse legten nahe, daß sich für die routinemäßige Dopinganalyse zum Nachweis einer mißbräuchlichen 17 $\alpha$ -MT Anwendung beim Pferd besonders folgende Metaboliten für ein Screening-Verfahren eignen (Tab. 51):

**Tab. 51:** Übersicht, über die zur Dopinganalyse mittels gc/ms im SIM geeigneten Metaboliten des 17 $\alpha$ -Methyltestosteron

Metabolit	
Metabolit II	gesättigtes Diol
Metabolit VIa	gesättigtes (6/7)-Triol
Metabolit VIb	gesättigtes (16/17)-Triol
Metabolit VIIb	gesättigtes (16/17)-Tetrol

SIM = Single Ion Monitoring

Die in Tab. 51 aufgeführten Metaboliten ließen sich in allen im Verlauf des 17 $\alpha$ -MT-NACHWEIS-Experimente gesammelten Urinproben nachweisen. Da im Verlauf dieser Experimente der Urin lediglich über etwa 2 Tage gesammelt worden ist, läßt sich keine Aussage darüber treffen, bis zu welchem Zeitpunkt nach der Applikation der Nachweis einer mißbräuchlichen Anwendung von 17 $\alpha$ -MT beim Pferd längstens möglich ist. Eine dem Testosteron vergleichbare Dauer der Nachweisbarkeit kann lediglich angenommen werden (HOUGHTON und DUMASIA, 1979). Um konkrete Angaben zu diesem Punkt machen zu können, wäre jedoch die Durchführung eines Langzeitversuches notwendig.

### 5.3.5. Abschließende Betrachtungen zu den gc/ms-Ergebnissen von DHA, MAD & 17 $\alpha$ -MT

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente und Analysen im Verlauf der DHA- und MAD-Verabreichungen haben zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis geführt:

Für DHA gelang mittels gc/ms-Analyse lediglich die eindeutige Darstellung von drei Metaboliten mit teilweise mehreren Isomeren, für MAD lediglich die eindeutige Darstellung von neun Metaboliten mit teilweise mehreren Isomeren. Es gelang jedoch aufgrund der geschilderten Probleme nicht, mittels der verwendeten Extraktionsmethode eine routinemäßig einsetzbare Nachweismethode für MAD im Rahmen der gc/ms-analytischen Möglichkeiten zu entwickeln.

Für (DHA und) MAD erscheint dagegen die flüssigkeitschromatographische / massenspektrometrische (lc/ms), analytische Aufbereitung entsprechender Extrakte zur Bestimmung und / oder zum Nachweis der jeweiligen Metaboliten vielversprechend (HOUGHTON, 1994b).

Für 17 $\alpha$ -MT, die dritte Substanz, deren Verstoffwechslung durch das Pferd Gegenstand dieser Arbeit war, ergab die Aufarbeitung und Analyse achtzehn verschiedene Metaboliten mit teilweise mehreren Isomeren. Von diesen erwiesen sich aufgrund der NACHWEIS-Experimente insgesamt vier Metaboliten (II, VIa, VIb & VIIb) als geeignet, im Rahmen eines gc/ms-analytischen Verfahrens zum Nachweis einer mißbräuchlichen 17 $\alpha$ -MT-Applikation beim Pferd als aufzufindende Screeningsubstanzen eingesetzt zu werden (Tab. 46). Es ist die SIM-Methode unter Berücksichtigung der Ionen m/z 143, m/z 218 und m/z 231 zu verwenden. Zusätzlich können für die einzelnen Metaboliten noch weitere, massenspektrometrisch prominente Ionen zur Erstellung eindeutiger Ionen-Chromatogramme eingesetzt werden, z.B.: Metabolit II - m/z 270, 345 + 435; Metabolit VIa - m/z 268, 358, + 448; Metabolit VIb - m/z 358, 448 + 538 und Metabolit VIIb - m/z 446, 536 + 626 (Tab. 44 + 45), um eine schnellere Auffindbarkeit der gesuchten Substanzen zu ermöglichen.