

# Anabole Steroide in pflanzlichen Arzneimitteln für Pferde

Marc Machnik, Michael Düe\*, Maria Kristina Parr und Wilhelm Schänzer

Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln und Deutsche Reiterliche Vereinigung, Warendorf

## Zusammenfassung

Nach Bekanntwerden von Verunreinigungen durch nicht deklarierte Prohormone (Steroidprecursor) in Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) für den Humanbereich sind nun bei einem Arzneimittelpreparat für Pferde anabole Steroide nachgewiesen worden. Für die Untersuchung standen zwei Chargen eines pflanzlichen Arzneimittels (Mexican Cactus Extract) zur Verfügung, die nach einer speziellen Aufarbeitung gaschromatographisch / massenspektrometrisch analysiert wurden. In beiden Proben wurden die androgenen anabolen Steroide (AAS) Stanozolol, Mestanolon sowie 17b-Hydroxy-17a-methyl-5a-androstan-3b-ol (5a-THMT) nachgewiesen, die auf dem Etikett nicht deklariert waren. Die Konzentration von Stanozolol, das mengenmäßig als das intensivste Steroid identifiziert wurde, liegt im Bereich von 10 µg pro ml Pflanzenextrakt.

**Schlüsselwörter:** Pflanzliche Arzneimittel, anabole Steroide, Gaschromatographie / Massenspektrometrie, Doping, Stanozolol

## Anabolic steroids in plant medicines for horses

After the appearance of steroid contaminations in nutritional supplements for humans a plant essence for the treatment of horses containing anabolic steroids has been made out. However, this product claims to be an alternative to anabolic steroids. Two charges of the oily plant extract (Mexican Cactus Extract) were prepared according to a sample preparation procedure established for anabolic steroids in nutritional supplements for humans. The sample treatment comprised the extraction and purification of the analytes as well as the chemical conversion with N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) to yield the trimethylsilyl-(TMS)-derivatives of the steroids. The analysis by gas chromatography / mass spectrometry (GC / MS) revealed that both samples contained the androgenic anabolic steroids (AAS) stanozolol, 17b-hydroxy-17a-methyl-5a-androstane-3b-ol (5a-THMT) as well as mestanolone without being declared on the label. The concentration of stanozolol which has been identified as the main component of the detected steroids was estimated in the range of 10 µg per ml of the oily plant extract.

**Keywords:** Plant medicines, anabolic steroids, gas chromatography / mass spectrometry, doping, stanozolol

## Einleitung

Nachdem in NEM für den Humanbereich zahlreiche Fälle von Kontaminationen mit anabolen Steroiden bekannt wurden (Geyer et al. 2000 und 2002), die zu positiven Dopingbefunden geführt haben, sind nun bei einem pflanzlichen Arzneimittel für den Pferdesportbereich androgene anabole Steroidhormone nachgewiesen worden.

Bei dem hier untersuchten Präparat handelt es sich um eine farblose Flüssigkeit mit der Angabe "EQ Mexican Cactus Extract 250 mg /ml". Auf dem Etikett findet sich weiterhin die Information: "An alternative to anabolic steroids for horses in training. For intramuscular injection only: Horses: 1 ml weekly or as directed". Es gibt keinen Hinweis auf im Pferdesport verbotene Pharmaka.

Bei diesem Produkt gefundenen Substanzen Stanozolol (17b-Hydroxy-17a-methyl-5a-androstan-[3,2-c]-pyrazol), Mestanolon (17b-Hydroxy-17a-methyl-5a-androstan-3-on) sowie 5a-THMT (17b-Hydroxy-17a-methyl-5a-androstan-3b-ol) gehören zur Gruppe der anabolen androgenen Steroide und sind Derivate des natürlich vorkommenden männlichen Sexualhormons Testosteron. 5a-THMT kann als Prohormon von Mestanolon angesehen werden, das wie die beiden

anderen Hormone möglicherweise auch physiologisch wirksam ist. In Deutschland sind sie weder für den Gebrauch bei Menschen noch bei Tieren zugelassen. Stanozolol findet aber in anderen Ländern (USA, GB, NL, S) unter den Handelsnamen Stromba und Winstrol bei Hypogonadismus, Osteoporose und renaler Anämie im Humanbereich Anwendung. Im Sport wird durch den Missbrauch dieser Substanzen versucht, die Muskelmasse zu steigern und die Regeneration nach starker Belastung zu unterstützen. Nach dem Dopingreglement aller Pferdesportverbände gehören androgene anabole Steroide zur verbotenen Wirkstoffgruppe der anabolen Substanzen, die sich durch verschiedene Methoden nachweisen lassen (Schänzer 2000). Die hier eingesetzte Analyseprozedur wurde speziell für NEM entwickelt und beinhaltet die Extraktion und Reinigung der Steroide sowie die gaschromatographisch / massenspektrometrische Messung der derivatisierten Verbindungen.

## Methodik

Zwei Proben, davon ein ungeöffnetes Originalgebinde, standen dem Labor für die Untersuchung zur Verfügung. Das Untersuchungsmaterial wurde gemäß der Analysenprozedur

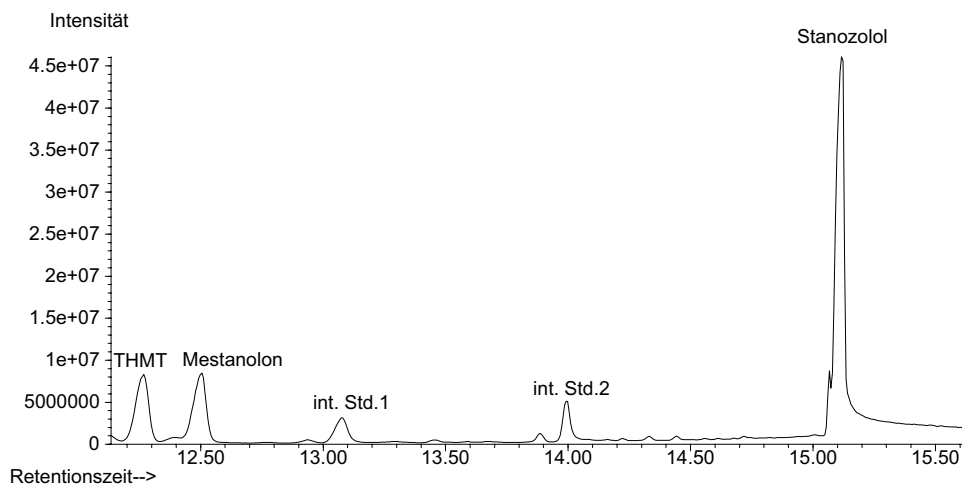
für NEM nach Geyer et al. (2000) aufgearbeitet. In Zusammenfassung: 500 µl der Probe wurden in 5 ml Methanol gelöst. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand dekantiert, eingengt und anschließend basisch gegen n-Pentan extrahiert. Nach Reextraktion mit 95 %igem Methanol wurde die methanolische Phase getrocknet und mit 100 µl N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) / NH<sub>4</sub>I / Ethanthiol (Mischungsverhältnis 1000/2/3) derivatisiert. 2 µl der Lösung wurden in das Gaschromatographie / Massenspektrometrie-Instrument (Hewlett Packard HP 6890 plus / HP 5973) injiziert.

### Ergebnisse und Diskussion

Die gaschromatographisch / massenspektrometrische Analyse ergab positive Befunde für AAS. In beiden Proben konnten die AAS Stanozolol, 17b-Hydroxy-17a-methyl-5a-androstan-3b-ol (5a-THMT) und Mestanolon nachgewiesen werden (Chromatogramm in Abb. 1). Die Massenspektren der Trime-

(höchste Signalintensität). Der im Rahmen dieser Untersuchung erfolgte qualitative Nachweis erlaubt keine genauen Konzentrationsangaben der enthaltenen Steroide. Die Konzentration von Stanozolol wurde aber in Relation zum internen Standard und durch Vergleich mit einer Referenzprobe (Konzentration 5 µg/ml) abgeschätzt. Sie liegt im Bereich von 10 µg / ml. In niedrigeren Konzentrationen (<< 1µg/ml) konnten weitere AAS nachgewiesen werden, von denen nur Methyltestosteron identifiziert wurde. Bei den anderen Verbindungen handelt es sich um 17a-Methyl-3-keto-Steroide, deren A-Ring-Konfiguration (z.B. 5a/5b) nicht eindeutig angegeben werden kann (Daten nicht gezeigt).

Die in dieser Studie detektierten AAS unterliegen dem Arzneimittelgesetz. Ihre Herstellung erfolgt unter strengen Qualitätskontrollen (Good Manufacturing Practices-(GMP)-Bedingungen) ausschließlich durch pharmazeutische Unternehmen. Stanozolol, 5a-THMT sowie Mestanolon sind also als Inhaltsstoffe in pflanzlichen Essenzen und NEM grundsätzlich verboten. Natürliche Quellen für synthetische AAS in pflanzlichen



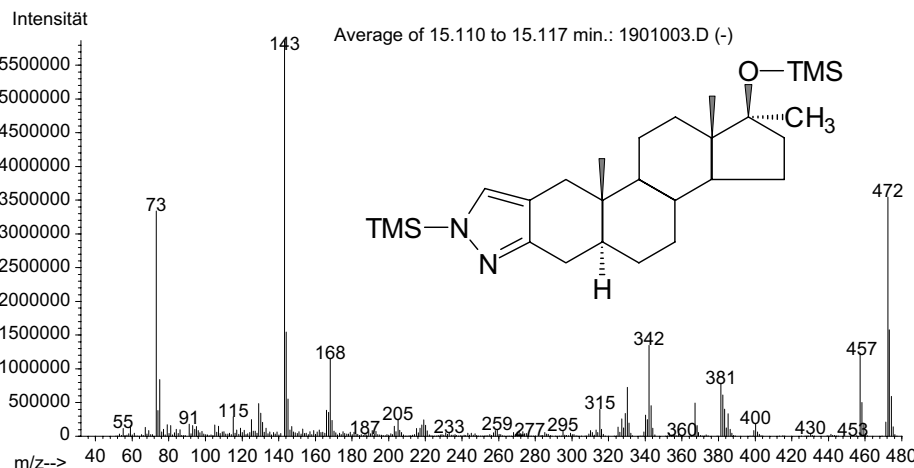
**Abb 1:** Totalionenchromatogramm (TIC) des untersuchten Präparates. In der Abbildung ist zu erkennen, dass Stanozolol den intensivsten Signalausschlag verursacht. Seine Konzentration liegt ungefähr bei 10 µg/ml Probenvolumen. THMT = 17b-Hydroxy-17a-methyl-5a-androstan-3b-ol, int. Std. = interner Standard. Detaillierte Angaben zu den Analysenbedingungen finden sich bei Geyer et al. (2000).

Total Ion Chromatogram (TIC) of the product. The diagram shows stanozolol as the most intensive peak. Its concentration is approximately 10 µg/ml of sample volume. For GC-MS conditions refer to Geyer et al. (2000).

thylsilyl-(TMS)-Derivate sind in Abbildungen 2 bis 4 gezeigt. Detaillierte Angaben zu den Analysenbedingungen finden sich bei Geyer et al. (2000).

Anhand des Totalionenchromatogramms (TIC, Abb. 1) sind die Mengenverhältnisse der drei Steroide abzuschätzen. Als Hauptwirkkomponente konnte Stanozolol identifiziert werden

Präparaten kommen nicht in Betracht. Eine systematische Beimischung der Steroide kann daher nicht ausgeschlossen werden, zumal die Steroide beider Proben in annähernd gleicher Konzentration vorlagen. Als alternative Ursache für das Vorhandensein von AAS in NEM wird eine Kontamination bei der Herstellung dieser Produkte diskutiert (Geyer et al. 2000). Dies ist insbesondere wahrscheinlich, wenn Hersteller von

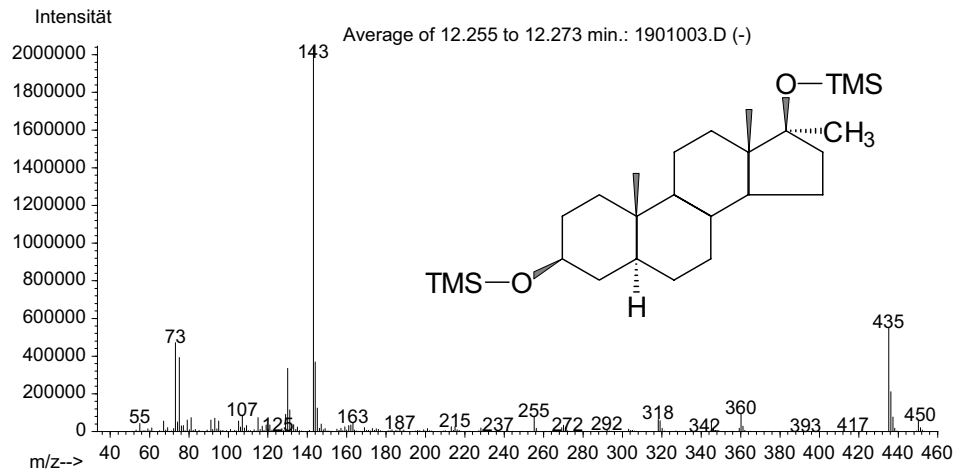


**Abb 2:** Struktur und EI-Massenspektrum von Stanozolol-bis-TMS. Aufgenommen nach gaschromatographischer Trennung und Elektronenbeschuss im Massen-selektiven Detektor.

Structure and EI-mass spectrum of stanozolol-bis-TMS. Obtained after gas chromatography and electron impact fragmentation by means of a mass selective detector.

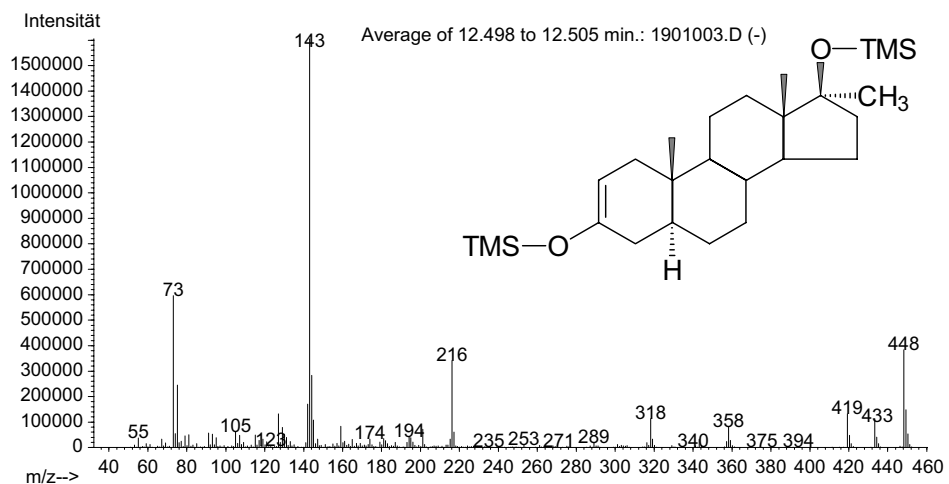
**Abb 3:** Struktur und EI-Massenspektrum des TMS-Derivats von 5 $\alpha$ -THMT.

Structure and EI-mass spectrum of 5 $\alpha$ -THMT-bis-TMS



**Abb 4:** Struktur und EI-Massenspektrum des TMS-Enol-Derivats von Mestanolon.

Structure and EI-mass spectrum of mestanolon-bis-TMS.



NEM auch Prohormone von Steroiden (Dehydroepiandrosterone (DHEA), Androstendiol, Androstendion) in ihrer Produktpalette haben. Im Gegensatz zu Prohormon gehören Stanozolol, 5 $\alpha$ -THMT sowie Mestanolon zur Gruppe der 17-Methylsteroiden, die keine Vorstufen (precursor bzw. Prohormon) endogener Steroide darstellen. Neben den hormonellen Wirkungen haben 17-alkylierte Steroide lebertoxische Effekte (Kew et al. 1976). Ihre gesundheitsschädigenden Wirkungen sind von der aufgenommenen Menge und der Dauer der Applikation abhängig. Bei Einhaltung der auf dem Etikett enthaltenen Empfehlungen zur Art und Häufigkeit der Dosierung erscheint eine physiologische Wirksamkeit unwahrscheinlich, wobei allerdings die Analyse von 2 Produkten nicht ausschließen kann, dass höhere Konzentrationen in weiteren Produkten möglich sind. Inwiefern mit dem o.a. Präparat durch höhere Dosierungen anabole Effekte und Nebenwirkungen zu erwarten sind, insbesondere bei Stuten und Wallachen, müssen weitere Untersuchungen klären. Dabei ist zu berücksichtigen, dass durch die gleichzeitige Applikation mehrerer Steroide synergistische Effekte auftreten können.

Vor der Einnahme solcher Präparate muss gewarnt werden, da durch ihren Gebrauch nicht nur eine Gesundheitsgefährdung, sondern auch die Gefahr eines positiven Dopingbefundes besteht.

## Literatur

- Geyer H., M. Bredehöft, Ute Mareck-Engelke, Maria Kristina Parr und W. Schänzer (2002): Hohe Dosen des Anabolikums Metandienon in Nahrungsergänzungsmitteln gefunden. Dtsch. Apoth. Ztg. 142, 29-50
- Geyer H., Ute Mareck-Engelke, U. Reinhart, M. Thevis und W. Schänzer (2000): Positive Dopingfälle mit Norandrosteron durch verunreinigte Nahrungsergänzungsmittel. Dtsch. Z. Sportmed., 51, 378 - 382
- Geyer H., Maria Kristina Parr, Ute Mareck-Engelke, G. Sigmund und W. Schänzer (2000): Analysis of nutritional supplements for dope substances, in: Biotechnology 2000. The world congress on biotechnology 3. - 8. Sept. 2000, Berlin, Book of abstracts, 3 236 - 238
- Kew M.C., B.V. Collier und C.M. Prowse (1976): Occurrence of primary hepatocellular cancer and peliosis hepatitis after treatment with androgenic steroids, S. Afr. Med. J., 50, 1233
- National Research Council Subcommittee on horse nutrition (1989): Nutrient requirements of horses, National Academy Press, Washington, 5th edition
- Schänzer W. (2000): Dopingkontrollen und aktueller Stand der Nachweismethoden, Dtsch. Z. Sportmed., 51, 260 - 266

Dr. Marc Machnik  
 Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln  
 Carl-Diem-Weg 6, 50933 Köln  
 E-Mail: m.machnik@biochem.dshs-koeln.de