

Behandlung von Sportpferden mit Corticosteroiden: Nachweiszeiten von Flumethason und Betamethason beim Pferd nach i.v. Applikation von Acutol® und i.a. Applikation von Celestovet®

Marc Machnik¹, Wolfgang Löhlein², Yvonne Schrader¹, Karsten Köhler¹, Julita Freymark³ und Wilhelm Schänzer¹

Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln¹, Löhlein & Wolf Vet Research, München² und Essex Tierarznei, München³

Zusammenfassung

Nach dem Antidoping-Reglement der nationalen und internationalen Fachverbände gilt im Pferdesport – wie auch im Humanleistungssport – bis auf wenige Ausnahmen die sogenannte Nulllösung. Das heißt der qualitative Nachweis einer Substanz, unabhängig von ihrer Konzentration, führt zu einem positiven Befund. Diese Regeln gelten im Pferdesport auch für Medikamente, die zu Therapie Zwecken eingesetzt werden. Der behandelnde Tierarzt muss daher Kenntnis über die Nachweiszeiten des eingesetzten Medikamentes haben, um nicht einen Dopingverstoß zu riskieren. Über die Nachweiszeiten von Betamethason und Flumethason gibt es nur lückenhafte Kenntnisse, wobei die Dauer in erster Linie von der Dosierung und Formulierung sowie den verwendeten Nachweismethoden bestimmt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde Acutol® (Flumethason) in Dosierungen von 4,5 bis 6,0 ml (4,2 bis 5,5 µg/kg) zehn Pferden intravenös appliziert. Celestovet® (Betamethason) wurde in Mengen von 2,0 bis 5,0 ml (50 bis 138 µg/kg) intraartikulär zur Behandlung verschiedener Gelenkserkrankungen ebenfalls bei zehn Pferden angewendet. Die Urinkonzentrationen von Betamethason bzw. Flumethason wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie bestimmt. Unter den in dieser Studie gewählten Bedingungen zeigte Betamethason eine Nachweiszeit von bis zu 45 Tagen nach i.a. Applikation (bei einem Pferd i.m. Applikation) von Celestovet®. Flumethason konnte in dieser Studie bereits 48 Stunden nach i.v. Gabe von Acutol® nicht mehr nachgewiesen werden.

Schlüsselwörter: Corticosteroide, Doping, Nachweiszeit, Pferd, Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie

Treatment of competition horses with corticosteroids: Detection times of flumethasone and betamethasone in the horse after i.v. application of Acutol® and i.a. application of Celestovet®

According to the rules of national and international sport authorities the presence of a forbidden substance in equine as well as in human sports is controlled under the policy of zero tolerance. That means that the qualitative identification of a banned substance leads to a positive doping case regardless of its quantity, except for a few threshold substances. These rules apply also to therapeutics, which are in common use in routine veterinary management of competition horses. Veterinarians must be aware of the specific detection time of a given therapeutic to avoid an unintentional doping case. Detection times for betamethasone and flumethasone are mainly dependent on the dosage, the formulation and on analytical capabilities. In the present study single intravenous injections of 4.5 to 6.0 ml of Acutol® (4.2 to 5.5 µg/kg flumethasone) and intra-articular injections (and an intra-muscular injection in one horse, respectively) of 2.0 to 5.0 ml of Celestovet® (50 to 138 µg/kg betamethasone) were administered. For both medications ten different horses were used. Concentrations of betamethasone and flumethasone were determined by a sensitive high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. In the Celestovet® study concentrations of betamethasone were still above the limit of detection 45 days after the administration. However, 48 hours after the injection of Acutol® concentrations of flumethasone were below the limit of detection of the employed analytical method.

Keywords: Corticosteroids, Doping, Detection time, Horse, Liquid chromatography/mass spectrometry

Einleitung

Die Antidoping-Regeln der nationalen und internationalen Verbände schreiben vor, dass kein Pferd zum Zeitpunkt des Wettkampfes in seinem Körper oder seinen Ausscheidungen ein unerlaubtes Mittel aufweisen darf. Anders als im Humanbereich benennen die Pferdesportverbände keine Substanzen sondern lediglich Substanzgruppen. Dabei unterscheiden die Deutsche Reiterliche Vereinigung (FN), das Direktorium für Vollblutzucht und Rennen sowie der Hauptverband für Traber-Zucht und -Rennen (HVT) zwischen klassischen Dopingsubstanzen, wie z.B. Stimulanzien, Sedativa, Narkotika, Anabolika, Diuretika und Peptidhormone, und verbotenen Arzneimitteln. Verbotene Arzneimittel sind Substanzen, die als Arzneimit-

tel eingesetzt werden, jedoch im Wettkampf verboten sind (Leistungs-Prüfungs-Ordnung der FN, Rennordnung des Direktoriums, Satzung und Ordnungen des HVT).

Nach diesem Reglement sind nahezu alle Substanzen im Wettkampf verboten, die nicht natürlicherweise im Pferdeorganismus vorkommen. Also auch Medikamente, die im Praxisalltag zur Therapie von kranken Pferden eingesetzt werden. Dies führt zu einem Dilemma für Tierärzte bei der Behandlung von Sportpferden, denn für einen Verstoß gegen die Antidopingbestimmungen ist der qualitative Nachweis der Substanz unabhängig von der Konzentration ausreichend. Grenzwerte gelten nur für einige endogene Substanzen und Futter-

mittelkontaminanten. Es ist für einen Tierarzt deshalb essenziell, die Nachweiszeiten für eingesetzte Medikamente zu kennen, damit ein ausreichender Zeitraum zwischen Behandlung und Wettkampf einkalkuliert werden kann. Die vorliegende Studie soll den Tierarzt dabei unterstützen und einen Anhaltspunkt für die Nachweiszeiten von Flumethason und Betamethason beim Pferd liefern. Dabei ist unter dem Begriff Nachweiszeit diejenige Zeit zu verstehen, die vom Absetzen des Medikaments bis zum Erreichen der urinären Konzentration vergeht, bei der die Identifizierung des eingesetzten Wirkstoffes oder seiner Metaboliten mit der verwendeten analytischen Methode nicht mehr möglich ist.

Für die Ausscheidungsstudien standen jeweils 10 Pferde zur Verfügung, die unterschiedliche Symptomatik zeigten. Zur Behandlung wurde 4,5 bis 6,0 ml Acutol® intravenös appliziert, Celestovet® wurde in Mengen von 2,0 bis 5,0 ml gemäß der unten angeführten Indikationen eingesetzt (Tabellen 2 und 3). Spontanurin wurde in adäquaten Zeitintervallen bis zu 45 Tage nach der Behandlung gesammelt. Die Urinkonzentrationen von Betamethason bzw. Flumethason wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) bestimmt.

Methodik

Für die Studien zur Bestimmung der Nachweiszeiten von Betamethason und Flumethason standen jeweils zehn Pferde zur Verfügung. Therapeutische Dosen von Celestovet® und Acutol® wurden unter kliniküblichen Bedingungen zur Behandlung verschiedener Krankheitsbilder beim Pferd eingesetzt. Die Studien wurden von verschiedenen Tierärzten an realem Patientengut und nicht an vorselektierten gesunden Versuchstieren durchgeführt. Zu einem überwiegenden Teil handelte es sich um ehemalige oder nach Abschluss der Therapie wieder eingesetzte Wettkampfpferde. Einzelheiten zur Population der Pferde und zur Behandlung sind den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

In der Celestovet®-Studie wurde Spontanurin nach den folgenden Zeitintervallen gesammelt: 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 Tage. Die Probenahme nach Acutol®-Behandlung erfolgte nach 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 168, 192 Stunden. Die Proben wurden

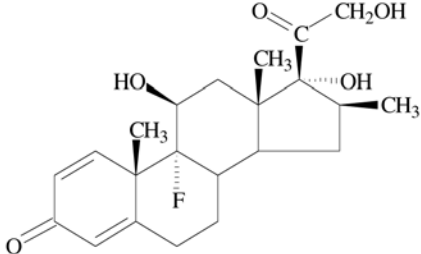
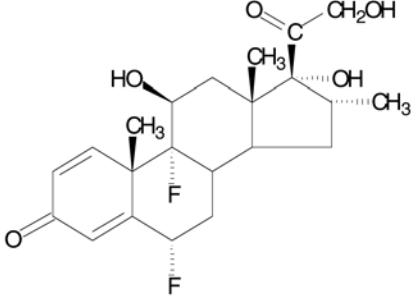
bis zur Analyse bei -20 °C gelagert und innerhalb von 6 Wochen nach Probenentnahme analysiert.

Die Analyse erfolgte nach einer Methode zum quantitativen Nachweis synthetischer Corticosteroide in Pferdeurin. In Kürze: Fünf ml Urin wurden mit 50 ng/ml internem Standard (Fluocortolon) versetzt. Anschließend wurden die Proben mit einem Gemisch aus K_2CO_3 und $NaHCO_3$ (Mengenverhältnis 1:2) auf einen pH-Wert von ca. 9,6 eingestellt und mit 7 ml tert.-Butylmethylether (TBME) extrahiert. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand (Etherphase) dekantiert und bis zur Trockne eingengt. Der trockene Rückstand wurde in 100 μ l Methanol aufgenommen und 10 μ l dieser Lösung wurden in das LC-MS/MS-Instrument injiziert (Agilent Technologies 1100 Series Flüssigkeitschromatograph - Applied Biosystems 4000 Q Trap Massenspektrometer). Die analytischen Bedingungen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Quotienten aus den Peakflächen von Analyt und internem Standard Fluocortolon. Zur Quantifizierung wurden Kalibrierkurven im Bereich von 0,1-5 ng/ml für Flumethason und von 0,1-75 ng/ml für Betamethason verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Die flüssigkeitschromatographisch/massenspektrometrische Analyse zeigte für beide Analyten ein lineares Verhalten über den oben angegebenen Konzentrationsbereich. Flumethason: $y = 0,1208x - 0,0054$, Korrelationskoeffizient: 0,9995; Betamethason: $y = 0,1001x - 0,0022$, Korrelationskoeffizient: 0,9997, wobei x die Konzentration und y der Quotient aus den Signalintensitäten von Analyt und internem Standard sind. Die Nachweisgrenze wurde für beide Analyten auf 0,1 ng/ml abgeschätzt. Als Nachweisgrenze ist die niedrigste in einer Probe enthaltene Konzentration definiert, die bei dem verwendeten Analyseverfahren eindeutig vom Leerwert zu unterscheiden ist. Die Urinkonzentrationen von Flumethason nach einmaliger i.v. Gabe von Acutol® lagen im untersuchten Zeitraum unter 3 ng/ml. Maximalwerte wurden nach 12 Stunden registriert, wobei Mittelwert \pm Standardabweichung 1,0 ng/ml \pm 0,5 betragen. Abbildung 1 zeigt das Ausscheidungsverhalten von Flumethason bei den 10 untersuchten Pferden. Flumethason konnte in dieser Studie mit der hier eingesetzten Methode höchstens 36 bis 48 Stunden nachgewiesen werden. Ähnliche Nachweiszeiten für Flumethason geben

Tab 1 Eingesetzte Medikamente. Preparations used in the studies.

1 ml Celestovet® enthält 12,0 mg Betamethasonacetat und 3,9 mg Betamethasonnatriumphosphat, Essex Tierarzney, München, Deutschland	1 ml Acutol® enthält 0,5 mg Flumethason Essex Tierarzney, München, Deutschland
Struktur von Betamethason: 	Struktur von Flumethason: 

Tab 2 Pferdepopulation in der Acutol®-Studie. *Population of horses of the Acutol® study.*

Pferd	Rasse	Geschlecht	Alter /a	Gewicht /kg	Erkrankung	Dosierung/ml (µg/kg)
FM1	Hannoveraner	Stute	11	600	Gonitis	5,0 (4,2)
FM2	Quarter	Stute	26	450	Gingivitis	4,5 (5,0)
FM3	Oldenburger	Stute	6	480	keine Angabe	4,8 (5,0)
FM4	Württembergischer	Stute	15	550	keine Angabe	5,5 (5,0)
FM5	Trakehner	Stute	6	550	Sinusitis	5,5 (5,0)
FM6	Criollo	Stute	5	480	keine Angabe	4,8 (5,0)
FM21	Holsteiner	Wallach	15	600	keine Angabe	6,0 (5,0)
FM22	Bayerisches Warmblut	Wallach	10	550	keine Angabe	6,0 (5,5)
FM23	Selle Francois	Wallach	6	550	Fesselträgerentzündung	6,0 (5,5)
FM24	Bayerisches Warmblut	Wallach	8	650	keine Angabe	6,0 (4,6)

Tab 3 Pferdepopulation in der Celestovet®-Studie. * Angabe bezieht sich auf den reinen Wirkstoffanteil. *Population of horses of the Celestovet® study. * refers to the active compound betamethasone.*

Pferd	Rasse	Geschlecht	Alter /a	Gewicht /kg	Erkrankung	Gelenk	Dosierung /ml (µg/kg *)
BM11	Hafflinger	Stute	18	450	Spat	Tarsometatarsalgelenk	2,0 (61)
BM12	Hafflinger	Stute	18	450	Spat	Tarsalgelenk	2,0 (61)
BM13	Quarter	Stute	21	550	Spat	Tarsalgelenk	2,0 (50)
BM14	Hafflinger	Stute	15	450	Spat	Tarsalgelenk	2,0 (61)
BM16	Vollblut	Stute	19	500	Spat	Tarsalgelenk	2,0 (55)
BM21	Hannoveraner	Stute	16	590	Gonitis	Kniegelenk	5,0 (117)
BM22	Hannoveraner	Stute	12	600	Gonitis	Kniegelenk	5,0 (115)
BM23	Hafflinger	Stute	10	450	Hufgelenksentzündung	Hufgelenk	3,6 (110)
BM24	Hafflinger	Stute	15	450	Arthrose Fesselgelenk	Tarsalgelenk	4,5 (138)
BM32	Quarter	Stute	20	650	Humerusfraktur	intramuskulär	5,0 (106)

Chui et al. an, die nach intravenöser Applikation von 5 mg Flucort® bei 18 Stunden lagen (Chui et al. 1992).

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe von Betamethason nach einmaliger Injektion von Celestovet® zeigten ein anderes Verhalten. Maximale Urinkonzentrationen wurden 12 bis 24 Stunden nach Applikation gemessen und lagen im Bereich von ca. 5 bis 70 ng/ml (Mittelwert ± Standardabweichung: 38.6 ng/ml ± 26.4 ng/ml). Fünfunddreißig Tage post applicationem (p.a.) lagen die Konzentrationen immer noch über der Nachweisgrenze, in drei Fällen konnte sogar nach 45 Tagen Betamethason nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den pharmakokinetischen Daten von Dexamethason, einem Struktur analogon von Betamethason (Milewski 2006).

Das intramuskulär eingesetzte Dexamethasonisonicotinat (ca. 12 ml Voren® Depot; 0,06 mg/kg) führte zu vergleichbaren Urinkonzentrationen, wobei Milewski ebenfalls eine LC-MS-Methode einsetzte. Moderne Nachweisverfahren wie LC-MS-Verfahren (Antignac et al. 2000, Ho et al. 2006) ermöglichen einen sehr empfindlichen Nachweis für Corticosteroide in biologischen Proben, was zu langen Nachweiszeiten führt (Abb. 3). Literaturdaten der vergangenen Jahre (Chapman et al. 1977, Friedrich et al. 1990, Ribeiro Neto et al. 1997) weisen oft deutlich kürzere Ausscheidungszeiten für Corticosteroide im Pferd aus als in der vorliegenden Arbeit, was auf den limitierten Messempfindlichkeiten der dort eingesetzten Methoden beruht. Abbildung 3 verdeutlicht diesen Zusammenhang von Nachweisgrenze (engl. Limit of Detection, LOD) und Nachweiszeit.

Entscheidend für die Dauer der Nachweisbarkeit eines Corticosteroids ist nicht nur seine chemische Struktur sondern vor allem seine Formulierung. Corticosteroidester in kristalliner oder öligem Lösung (typische Depotformulierungen) sind im Allgemeinen länger wirksam und werden über einen längeren Zeitraum ausgeschieden als ihre unveresterten Analoge (Klaus und Hapke 1996). Bei der chemischen Reaktion von Carbonsäuren mit Alkoholen (Hydroxygruppen) unter Wasserabspaltung spricht man von Veresterung. Je nach Beschaffenheit dieser Carbonsäure (z.B. unterschiedliche Kettenlänge) kann die Polarität des Steroidesters beeinflusst werden. Je unpolarer das entstehende Molekül, desto besser löst es sich in fetthaltigem Gewebe und kann so in tiefere Kompartimente des Körpers eindringen. Abhängig vom Trainings- und Ernährungszustand wird das Pharmakon über einen sehr langen Zeitraum aus dem Fettgewebe freigesetzt und mit dem Urin ausgeschieden.

Tab 4 LC-Parameter. LC parameters.

Instrument	Agilent Technologies 1100 Series
LC-Säule	M&N Nucleodur [®] C18 Pyramid, 70x4 mm, 5 μ m
Laufmittel	A = 5 mM Ammoniumacetat in H ₂ O, 0,1 % Essigsäure B = Acetonitril
Gradient	0 % B \rightarrow 100 % B in 7 min, 100 % B für 2,5 min; Reequilibration bei 0 % B für 2,5 min
Fluss	800 μ l/min
Injektionsvolumen	10 μ l, splitless

Tab 5 MS-Parameter. MS parameters.

Instrument	Applied Biosystems 4000 Q Trap Massenspektrometer
Interface	ESI, 550 °C
Ionisationsmodus	
Betamethason	Negativ
Flumethason	Positiv
Ionenübergänge	
Betamethason;	m/z 451 \rightarrow 307; m/z 435 \rightarrow 375 (Acetat-
Fluocortolon	Addukte)
Flumethason;	m/z 411 \rightarrow 391; m/z 377 \rightarrow 171 (M + H ⁺)
Fluocortolon	
Aquisitionsmodus	MRM
Kollisionsgas	N ₂ , 5,0 x 10 ⁻⁵ torr
Kollisionsenergie	
Betamethason;	
Fluocortolon	- 22 V; - 44 V
Flumethason;	+ 13 V; + 27 V
Fluocortolon	

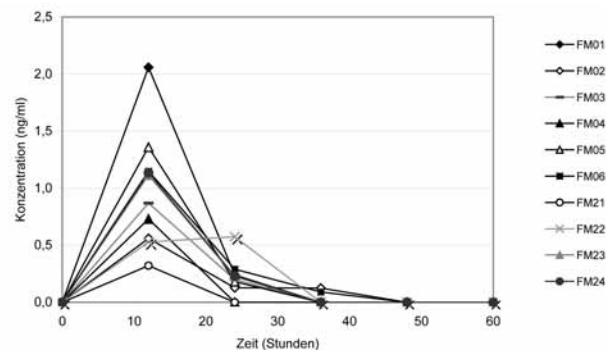


Abb 1 Urinkonzentrationen von Flumethason nach intravenöser Applikation von Acutol[®] über den Zeitraum von 60 Stunden p.a..
Urinary concentrations of flumethason after i.v. application of Acutol[®] over 60 hours p.a..

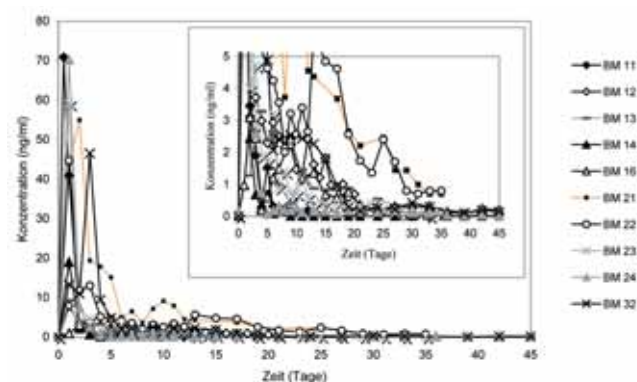


Abb 2 Urinkonzentrationen von Betamethason nach intraartikulärer Applikation von Celestovet[®] über einen Zeitraum von 45 Tagen p.a..
Urinary concentrations of betamethason after i.a. application of Celestovet[®] over 45 days p.a..

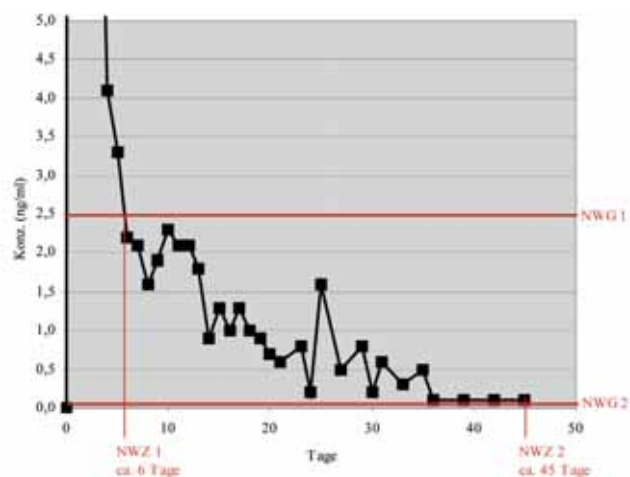


Abb 3 Zusammenhang von Nachweisgrenze und Nachweiszeit. Gemittelte Urinkonzentrationen von Betamethason in der terminalen Ausscheidungsphase nach Applikation von Celestovet[®]. NWG = Nachweisgrenze, NWZ = Nachweiszeit.
Inter-relation of limit of detection and detection time. Mean urinary concentrations of betamethason in the terminal phase after application of Celestovet[®]. NWG = limit of detection, NWZ = detection time.

Die Nachweisbarkeit einer Substanz ist jedoch nicht nur von ihren molekularen Eigenschaften und der damit verbundenen Halbwertszeit abhängig, sondern auch von der Dosierung (einmalig/mehrfach) sowie der Art der Anwendung (systemisch wie z.B. i.m./i.v./s.c./oral oder lokal wie z.B. i.a./der-

mal/konjunktival/respiratorisch/etc.). Dabei lässt sich die Nachweiszeit eines Medikaments, die nach einer definierten Dosierungsanleitung erhalten wurde, auf ein anderes Dosierungsregimen nur ungenau übertragen.

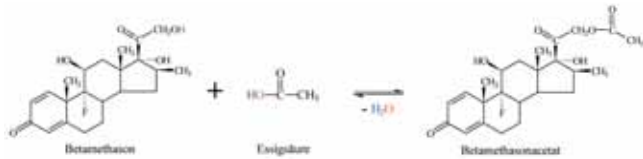


Abb 4 Veresterung am Beispiel von Betamethasonacetat.
Ester reaction yielding betamethasone acetate.

Der Faktor Pferd ist ebenfalls eine entscheidende Einflussgröße für die Nachweiszeit eines Medikaments, wobei Körpergewicht, Fettdepots, Ernährung, Gesundheitszustand sowie die Leistungsfähigkeit von Enzym- und Organsystemen eine Rolle spielen. Bei den hier genannten Nachweiszeiten sollte bedacht werden, dass die Daten anhand einer limitierten Anzahl von Pferden unter definierten Bedingungen erhalten wurden. Diese sind unter Umständen nicht übertragbar auf das eigene Pferd und/oder auf eigene Therapiebedingungen. Bei der in dieser Studie eingesetzten Anzahl von jeweils 10 Pferden kann jedoch angenommen werden, dass die Ergebnisse den Durchschnitt der Gesamtpopulation widerspiegeln. Durch zusätzliche Berücksichtigung einer Sicherheitsspanne, die zur Nachweiszeit addiert wird, erhält man die sogenannte Karenzzeit (Absetzzeit, Wartezeit).

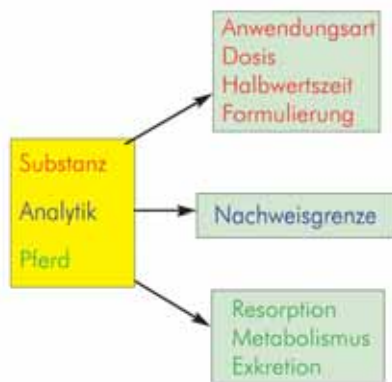


Abb 5 Einflussfaktoren auf die Nachweisbarkeit einer Substanz.
Parameters influencing the detectability of a substance.

Typischerweise werden bei der Berechnung von Karenzzeiten falsche Annahmen gemacht, die zu vermeintlich sicheren Prognosen über das Risiko eines positiven Dopingbefundes führen.

Häufig verbreitetes aber fehlerbehaftetes Rechenbeispiel für die Karenzzeit eines Pharmakons: Die mittlere Nachweiszeit (nicht zu verwechseln mit der tatsächlichen Nachweiszeit) z.B. für Flumethason nach einmaliger i.v. Gabe sei unter den beschriebenen Bedingungen 24 Stunden. Die Streuung um diesen Mittelwert wird durch die Standardabweichung (s) charakterisiert und soll bei ± 8 Stunden liegen. Für eine 99,7%ige Sicherheit muss die dreifache Standardabweichung (3×8 h) zur gemittelten Nachweiszeit (24 h) addiert werden. Das heißt nach einer Karenzzeit von 48 Stunden wäre in 997

von 1000 Pferden Flumethason nicht mehr nachweisbar. Tatsächlich gilt diese Berechnung nur bei einer Gaußverteilung der Nachweiszeiten. Das natürlich vorkommende Verhalten von Nachweiszeiten ist aber schief verteilt und zwar in Richtung längerer Nachweiszeiten. Hinzu kommt, dass Nachweiszeiten und Nachweisgrenzen eines analytischen Verfahrens sich nicht linear verhalten. Eine kleine Änderung der Nachweisgrenze hat eine große Änderung der Nachweiszeit zur Folge, wie Abbildung 3 zu entnehmen ist. Zur Abschätzung von Karenzzeiten ist es daher zwingend erforderlich, die Daten hinsichtlich ihrer Verteilung zu prüfen und durch geeignete mathematische Operationen (z.B. Logarithmierung) zumindest näherungsweise auf eine Gaußverteilung zu transformieren. In unserem Beispiel ergibt sich nach logarithmischer Transformation eine Karenzzeit für Flumethason von 70 Stunden mit einem Vertrauensbereich von 99,7 % (3 s). Eine Berechnung der Karenzzeit für Betamethason wurde aufgrund der interindividuellen Schwankungen hinsichtlich des Ausscheidungsverhaltens an dieser Stelle nicht vorgenommen.

Der Tierarzt muss beim Einsatz von Medikamenten bei Leistungspferden das Risiko anhand aller ihm zur Verfügung stehender Erkenntnisse abschätzen. Dabei sollen ihn die Ergebnisse dieser Studie unterstützen und einen Anhaltspunkt für die Nachweiszeiten von Corticosteroiden unterschiedlicher Formulierung beim Sportpferd liefern.

Literatur

- Antignac J.-P., B. Le Bizec, F. Monteau, F. Poulain und F. Andre (2000): Collision-induced dissociation of corticosteroids in electrospray tandem mass spectrometry and development of a screening method by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 33 - 39
- Chapman D.I., M.S. Moss und J. Whiteside (1977): The urinary excretion of synthetic corticosteroids by the horse, *Vet. Rec.* 100, 447 - 450
- Chui Y.C., B. Esaw und V. Robillo (1992): Detection and Confirmation of Flumethasone in Equine Urine, in: *Proceedings of the 9th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians Vol 1 Analytical Topics*, New Orleans, Dupre's Printing & Copying, Baton Rouge, Louisiana, 121-131
- Friedrich Anita, H.W. Hagedorn und R. Schulz (1990): Nachweis von Dexamethason im Pferd, *Tierärztl. Prax.* 18, 613-617
- Ho E. N. M., D. K. K. Leung, T. S. M. Wan und N. H. Yu (2006): Comprehensive Screening of anabolic steroids, corticosteroids, and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography – mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1120, 38 – 53
- Klaus Ana-Maria und H.-J. Hapke (1996): Natürliche und synthetische Glukokortikoide beim Sportpferd: eine Literaturübersicht, *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 103, 494-500
- Milewski M. (2006): Untersuchung zur Pharmakokinetik des Arzneistoffes Dexamethason hinsichtlich der Dopingrelevanz beim Pferd, *Vet Med. Diss.* Hannover
- Ribeiro Neto L. M., H. S. Spinosa and M. C. Salvadori (1997): The Use of ELISA Tests and Immunoaffinity Chromatography Combined with Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography for Dexamethasone Detection in Equine Urine, *J. Anal. Toxicol.* 21, 393-395

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