

---

## **Anreicherung endogener und exogener Steroide im Haar und ihre Bedeutung für Trainingskontrollen**

Heinrich H.D. Meyer

Technische Universität München

Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Freising-Weihenstephan

VF 0407/08/01/98

### **1 Problem**

Haaranalysen haben sich in der forensischen Medizin bereits als diagnostisches Instrument bewährt (TAGLIARO et al., 1997; MAUGH, 1978; LAKER, 1982). Gegenüber anderen Untersuchungsmaterialien, wie Blut und Urin, stellt das Haar Informationen über die Geschichte der Fremdstoffexposition eines Organismus zur Verfügung. Damit eröffnet sich mit der Haaranalyse die Möglichkeit, einen länger zurückliegenden Missbrauch von Drogen festzustellen.

Im Rahmen der Dopingkontrolle eignen sich Haare für die Erfassung von anabolen  $\beta$ -Agonisten, insbesondere für Clenbuterol und strukturell verwandte Verbindungen (GLEIXNER et al., 1996). Melanin, das Pigment der Haare, akkumuliert Clenbuterol mit hoher Affinität und die Elimination scheint vernachlässigbar. Aufgrund seiner speziellen chemischen Eigenschaften lässt sich Clenbuterol darüber hinaus sehr selektiv extrahieren und vorreinigen, so dass hier ein empfindlicher Nachweis möglich wird. Der Einsatz von Clenbuterol kann somit auch Monate später noch erfasst werden.

Die Einlagerung von Steroiden im Haar ist kaum untersucht und aufgrund erheblich größerer Matrixeffekte sind die Anforderungen an die Probenvorbereitung wesentlich aufwendiger. Das Untersuchungsmaterial Haar bietet aber die prinzipielle Möglichkeit den Missbrauch anaboler Steroide während der Trainingphase retrospektiv zu kontrollieren, auch wenn die Werte während der Wettkampfkontrolle unterhalb der Nachweisgrenzen im Blut und Urin liegen, da die Einlagerung während des Haarwachstums erfolgt und die Information erhalten bleibt.

Die resultierenden Fragestellungen des Projektes umfassen die Prüfung der Akkumulation anaboler Steroide im Haar, die Entwicklung effizienter Extraktionsverfahren, die selektive Vorreinigung sowie den hochempfindlichen Nachweis. Weiterhin ist zu prüfen, ob Melanin anabole Steroide bindet und somit zu einer besonderen Anreicherung führt in Analogie zum Clenbuterol. Zur Optimierung der Vorreinigung sollte die Einsatzmöglichkeit der Immunoaffinitäts-Chromatographie entwickelt werden.

## 2 Methoden

Validierung von Verfahren zur Solubilisation von Haaren unter Einsatz von Reduktionsmitteln zur Spaltung von Schwefelbrücken und zur quantitativen Extraktion von Steroiden aus Haaren ohne Beeinträchtigung von deren Stabilität:

- Nach Entfernung von Verunreinigungen wurden die Haare in einem Mikrodismembrator pulverisiert unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff. Die Gegenwart von 1,4-dithiothreitol (DTT) plus SDS in der wässrigen Phase war Voraussetzung für eine vollständige Extraktion.
- Einsatz der HPLC zur Anreicherung und hocheffizienten Reinigung der einzelnen anabolen Steroide.
- Kopplung von Antikörpern an Sepharose und Optimierung der Immunoaffinitäts-Chromatographie von Nortestosteron.
- Hochempfindlicher Nachweis der einzelnen Steroide mittels Enzym-Immunoassay (Methyltestosteron, Testosteron, Ethinylestradiol, 19-Nortestosteron, 19-Norethindron).
- Durchführung von Versuchen zur Prüfung der jeweiligen Akkumulation und Dynamik der Steroide im Haar.

Die entwickelten Methoden und ihre Validierung sind in vier Publikationen zusammengefasst (GLEIXNER et al., 1997 a,b,c,d).

## 3 Ergebnisse

Die Nachweisgrenze des HPLC/EIA für Ethinylestradiol, Testosteron und Methyltestosteron betrug 0,2 ng/g Haar. Vier Tage nach Beginn einer Behandlung von Kälbern waren beide Xenobiotika signifikant in den Haarproben nachweisbar und es ergaben sich keine Unterschiede in Abhängigkeit von den geprüften Haarfarben (schwarz, braun, weiß). Nach Einsatz der kontrazeptiven Pille waren Ethinylestradiol und Norethindron im Frauenhaar signifikant nachweisbar (1,5 ng/g bzw. 11,0 ng/g). Ebenso war Testosteron in allen Proben von Knaben ( $1,5 \pm 0,5$  ng/g) und Männern ( $3,8 \pm 0,5$  ng/g) vorhanden ( $n = 18$ ). Der signifikant höhere Wert bei Männern ( $p < 0,05$ ) entspricht den bekannten höheren Testosteronkonzentrationen im Plasma. Die absoluten Konzentrationen in Haar und Plasma sind in der gleichen Größenordnung.

Entwicklung der IAC für 19-Nortestosteron (NT): Nach Aufreinigung des Immunglobulins erfolgte die Kopplung an Sepharosegel und die weitere Charakterisierung unserer Säulchen ergab eine Bindungskapazität von ca. 20 ng NT pro Säulchen. Die Nachweis-

grenze im Kälberhaar betrug 2,8 ng NT/g bei Einsatz der Kombinationsmethode IAC/EIA. In den ersten 21 Lebenstagen betrug der Gehalt an NT  $14,2 \pm 2,4$  ng NT/g. Im Alter ab 50 Tage war NT im Haar nicht mehr nachweisbar.

#### 4 Diskussion

Diese initialen Studien und Methodenentwicklungen zeigen, dass xenobiotische Steroide nach deren Applikation an Tier und Mensch im Haar nachweisbar sind. Ebenso wird endogenes Testosteron im Humanhaar in Abhängigkeit von der zirkulierenden Konzentration im Plasma eingelagert. Melanin bzw. die Haarfarbe scheinen bedeutungslos für die Einlagerung zu sein.

In der bovinen Plazenta endogen produziertes NT (MEYER et al., 1992) wird ebenfalls während des fötalen Haarwachstums eingelagert, wie mit Hilfe einer neu entwickelten IAC gezeigt wurde.

Zusammenfassend ergibt sich, dass Haare geeignet sind, das Vorkommen endogener und xenobiotischer Steroide zu erfassen. Eine retrospektive Erkennung des Missbrauchs wird damit möglich. Die Akkumulationsfaktoren sind aber gering, sonstige Einlagerungen im Haar führen zu starken Matrixeffekten und es sind noch erhebliche methodische Entwicklungen erforderlich, wenn dieses Phänomen in der Dopingkontrolle genutzt werden soll. Weiterhin eröffnet sich auch die Option orale und parenterale Applikationen zu differenzieren, wie es anhand des NT-Metaboliten Spektrums im Fett möglich ist (MEYER et al., 1989).

#### 5 Literatur

- GLEIXNER, A.; SAUERWEIN, H.; MEYER, H.H.D.: Detection of the anabolic  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist clenbuterol in human scalp hair by HPLC/EIA. *Clinical Chemistry* 42 (1996), 1869-1871
- GLEIXNER, A.; MEYER, H.H.D.: Detection of estradiol and testosterone in hair of cattle by HPLC/EIA. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 357 (1997a), 1198-1201
- GLEIXNER, A.; MEYER, H.H.D.: Methods to detect anabolics in hair: Use for food hygiene and doping control. *American Laboratory* 28 (1997b), 44-47
- GLEIXNER, A.; SAUERWEIN, H.; MEYER, H.H.D.: Accumulation of the Xenobiotic Anabolic Steroids Ethinyloestradiol and Methyltestosterone in Calf Hair. *Food and Agricultural Immunology* 9 (1997c), 27-35
- GLEIXNER, A.; SAUERWEIN, H.; MEYER, H.H.D.: Detection of the Anabolic Steroid Methyltestosterone in Hair by HPLC-EIA. *Chromatographia* 45 (1997d), 49-51
- LAKER, M.: On determining trace element levels in man: The uses of blood and hair. *The Lancet* 8292 (1982), 260-262

MAUGH, H.T.: Hair: a diagnostic tool to complement blood serum and urine. *Science* 202 (1978), 1271-1273

MEYER, H.H.D.; HARTMANN, F.; RAPP, M.: Distinction between oral and parenteral 19-nortestosterone application by residue analysis in kidney fat of veal calves using HPLC/EIA methods. *Journal of Chromatography* 489 (1989), 173-180

MEYER, H.H.D.; FALCKENBERG, D.; JANOWSKI, T.; RAPP, M.; RÖSEL, E.; VAN LOOK, L.; KARG, H.: Evidence for the presence of endogenous 19-nortestosterone in the cow peri partum and in the neonatal calf. *Acta Endocrinologica* 126 (1992), 369-373

TAGLIARO, F.; SMITH, F.P.; DE BATTIATI, Z.; MANETTO, G.; MARIGO, M.: Hair analysis, a novel tool in forensic and biomedical science: new chromatographic and electrophoretic/electrokinetic analytical strategies. *Journal of Chromatography & Biomedical Application* 689 (1997), 261-271