

Aus der Abteilung für physiologische Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Andrej Hasilik  
Abteilung für biochemische Endokrinologie  
Leiter: Prof. Dr. Jan Koolman

---

**Pharmakokinetik und Metabolismus  
des 20-Hydroxyecdysons  
im Menschen**

Inaugural Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Felix Wolfgang Brandt  
aus Thuine

Marburg  
2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg am

.....

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereich

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent:

Prof. Dr. Jan Koolman

Korreferent:

.....

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>Steroidsysteme von Tieren .....</b>	<b>4</b>
3.1.1	Bedeutung und Struktur der sechs humanen Steroidsysteme.....	4
3.1.2	Bedeutung und Struktur der Ecdysteroide bei Arthropoden .....	7
3.1.3	Vorkommen von Steroiden in Pflanzen und in der Nahrung .....	9
<b>3.2</b>	<b>Wirkungen der Ecdysteroide auf den Menschen.....</b>	<b>10</b>
3.2.1	Festgestellte Wirkungen auf einzelne Organsysteme.....	10
3.2.2	Pharmakologie der Ecdysteroide.....	15
<b>3.3</b>	<b>Doping.....</b>	<b>16</b>
3.3.1	Definition.....	16
3.3.2	Historisches .....	16
3.3.3	Verbotene Wirkstoffgruppen und Methoden.....	16
3.3.4	Doping mit Ecdysteroiden.....	21
<b>3.4</b>	<b>Ziele der Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>GERÄTE UND MATERIALIEN .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>27</b>
4.2.1	Chemikalien.....	27
4.2.2	Analysenmaterial .....	32
4.2.3	Andere Produkte .....	33

---

<b>5</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>34</b>
<b>5.1</b>	<b>Studiendesign</b> .....	<b>34</b>
<b>5.2</b>	<b>Probengewinnung und -lagerung</b> .....	<b>36</b>
5.2.1	Urinproben.....	36
5.2.2	Speichelproben .....	36
5.2.3	Blutproben .....	37
<b>5.3</b>	<b>Präparative Methoden</b> .....	<b>37</b>
5.3.1	Ausschütteln .....	37
5.3.2	Festphasenextraktion .....	38
<b>5.4</b>	<b>Analytische Methoden</b> .....	<b>39</b>
5.4.1	Photometrie.....	39
5.4.2	Dünnschichtchromatographie (DC) / High-performance-thin-layer- chromatography (HPTLC) / Färbereaktionen .....	40
5.4.3	High performance liquid chromatography (HPLC) .....	42
5.4.4	Enzym-Immunoassay (EIA).....	43
5.4.5	Externe Analyse der Urinproben mittels HPLC und Massenspektrometrie (LC/MS) .....	49
5.4.6	Externe Analyse der Serumwerte für Harnstoff und Kreatinin .....	51
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>53</b>
<b>6.1</b>	<b>Analysen relevanter humaner Steroide und bekannter Ecdysteroide als     Reinsubstanzen</b> .....	<b>53</b>
6.1.1	Photometrie.....	54
6.1.2	DC.....	55
6.1.3	HPLC .....	56
6.1.4	LC/MS .....	58
6.1.5	EIA .....	69

---

<b>6.2 Externe Analyse der Nierenretentionswerte des Probanden .....</b>	<b>70</b>
<b>6.3 Analyse des Handelspräparates Ecdysten® .....</b>	<b>70</b>
6.3.1 Photometrie.....	71
6.3.2 HPLC .....	72
<b>6.4 Erprobung verschiedener Präparationsmethoden, Anwendung auf biologische     Matrices .....</b>	<b>72</b>
6.4.1 DC.....	73
6.4.2 HPLC .....	74
6.4.3 LC/MS .....	76
6.4.4 EIA .....	76
<b>6.5 Analyse der biologischen Proben nach der Ecdysteroid-Einnahme .....</b>	<b>77</b>
6.5.1 EIA .....	77
6.5.2 HPLC .....	78
6.5.3 EIA der HPLC-Fraktionen .....	80
6.5.4 LC/MS .....	85
6.5.5 DC.....	94
<b>7 DISKUSSION .....</b>	<b>96</b>
<b>7.1 Zielsetzung .....</b>	<b>96</b>
<b>7.2 Bewertung der Befunde in Hinblick auf bisherige Erkenntnisse .....</b>	<b>96</b>
7.2.1 Analyse von Ecdysteroiden und AAS in der Literatur .....	96
7.2.2 Analyse von Ecdysteroiden im Labor .....	98
7.2.3 Pharmakokinetik von Ecdysteroiden im Säugetierorganismus in der Literatur .....	99
7.2.4 Pharmakokinetik von 20E im Menschen im Rahmen dieses Versuchs ...	100
7.2.5 Metabolismus von Ecdysteroiden im Säugetierorganismus in der Literatur .....	101

---

7.2.6	Metabolismus von 20E im Menschen im Rahmen dieses Versuchs .....	104
<b>7.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>107</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>115</b>
<b>9.1</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>115</b>
9.1.1	Abbildungen .....	115
9.1.2	Tabellen .....	116
<b>9.2</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>117</b>
<b>9.3</b>	<b>Akademische Lehrer.....</b>	<b>118</b>
<b>9.4</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>119</b>
<b>9.5</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>120</b>

# 1 Abkürzungen

14d20E	14-Desoxy-20-Hydroxyecdyson
14dE	14-Desoxyecdyson
20E	20-Hydroxyecdyson
2d20E	2-Desoxy-20-Hydroxyecdyson
2dE	2-Desoxyecdyson
AAS	Androgene anabole Steroide
Abb.	Abbildung
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization (Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck)
AVK	Arterielle Verschlusskrankheit
DC	Dünnschichtchromatographie
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Ecdyson
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (=Ethylendinitrotetraessigsäure)
EIA	Enzyimmunoassay
Hb	Hämoglobin
HDL	high-density lipoprotein (Lipoproteine hoher Dichte)
HPLC	high-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPTLC	high-performance thin layer chromatography (Hochleistungsdünnschichtchromatographie)
IOC	international olympic committee (Internationales Olympisches Komitee)
JH	Juvenilhormon
KG	Körpergewicht

---

LC/MS	liquid chromatography / mass spectrometry (Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie in Kopplung)
LC/MS/MS	liquid chromatography / mass spectrometry / mass spectrometry (Flüssigkeitschromatographie in Kopplung mit zwei Massenspektrometrien)
LD-50	lethal dose 50% (tödliche Dosis in 50% der Fälle)
LDL	low-density lipoprotein (Lipoprotein niedriger Dichte)
MS/MS	mass spectrometry / mass spectrometry (Massenspektrometrie Massenspektrometrie; sequenzielle Kopplung zweier Massenspektrometrien)
n. gem.	nicht gemessen
p.o.	per os (orale Einnahme)
PTTH	prothoracicotropes Hormon
R <sub>f</sub>	Relative to front (relativ zur Obergrenze)
RIA	Radioimmunoassay
RP	reversed phase (Umkehrphase)
RT	retention time (Retentionszeit)
SIM	selected ion monitoring (selektive Ionenüberwachung)
SPE	solid-phase extraction (Festphasenextraktion)
Tab.	Tabelle
TIC	total ion current (Gesamtionendarstellung)
TMB	Tetramethylbenzidin



## 2 Zusammenfassung

Ecdysteroide sind Steroidhormone, die in Arthropoden und im Pflanzenreich vorkommen. Sie werden vom Menschen in relevanter Menge über die Nahrung aufgenommen. In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise auf Wirkungen dieser Hormone auf den menschlichen Organismus.

Ecdysteroide finden in der Landwirtschaft (als Insektizide), als Medikamente und auch zur Leistungssteigerung bei Sportlern Verwendung. Sie wurden jedoch bisher nicht in die Dopingliste des Internationalen Olympischen Komitees aufgenommen.

Ziel dieser Arbeit war es, grundlegende pharmakologische Eigenschaften der Ecdysteroide zu untersuchen. Dies erfolgte in einem Versuch, in dem ein Proband 20 mg 20-Hydroxyecdysen als Kapsel einnahm und in den folgenden zwei Tagen Urinproben zur späteren Analyse gesammelt wurden.

Für die Analysen wurde vor allem die HPLC verwendet, zum weitgehend selektiven Nachweis von Ecdysteroiden diente ein Peroxidase-gekoppelter EIA. Die Strukturbestimmung der Metabolite erfolgte mittels LC/MS.

In Rahmen dieser Arbeit gelang es, die Probenvorbereitung von Urinproben für verschiedene analytische Methoden zu optimieren, pharmakokinetische Daten von 20E im Menschen zu bestimmen und zumindest einen Metaboliten dieser Substanz sicher zu bestimmen.

Bezüglich der Probenvorbereitung hat sich für chromatographische Verfahren wie DC, HPTLC, HPLC aber auch für die LC/MS die Schüttelextraktion mit nachfolgender Festphasenextraktion als herausragend dargestellt.

Die Pharmakokinetik zeigte einen zweigipfligen Verlauf der Ausscheidung mit Maxima bei vier bis fünf Stunden nach Einnahme und bei 21 Stunden nach Einnahme. Insgesamt konnten ca. 6% der eingenommenen Dosis 20E im Urin als immunoreaktive Steroide wiedergefunden werden.

Bezüglich des Metabolismus zeigte sich, dass in den Urinproben, die sich mit dem ersten Exkretionsmaximum nach vier bis fünf Stunden deckten, sowohl die Ausgangssubstanz 20-Hydroxyecdysen als auch das Ecdysteroid 14-Desoxy-20-Hydroxyecdysen vorlag. Nach 21 Stunden war lediglich 20-Hydroxyecdysen nachweisbar und eine um 16 Masseneinheiten schwerere Substanz, die gut vereinbar mit einer Hydroxylierung von 20E wäre.

## 3 Einleitung

### 3.1 Steroidsysteme von Tieren

#### 3.1.1 Bedeutung und Struktur der sechs humanen Steroidsysteme

Hormone sind chemische Signalstoffe. Gebildet werden sie in spezialisierten Zellen, die häufig zu endokrinen Drüsen zusammengefasst sind. Die Hormone werden ins Blut ausgeschüttet und hierüber zu den Erfolgsorganen transportiert, wo sie bestimmte physiologische und biochemische Regulationsfunktionen ausüben.

Eine wichtige Gruppe der Hormone stellen die Steroidhormone dar. Das molekulare Grundgerüst der Steroidhormone besteht aus vier gesättigten Ringen und trägt den Namen **Gonan** (s. Abb. 3-1).

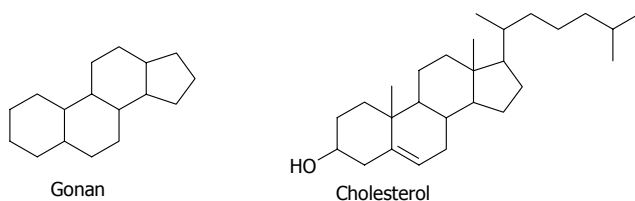


Abb. 3-1: Gonan-Gerüst und Cholesterol

Beim Wirbeltier beginnt die Synthese der Steroidhormone beim **Cholesterol**. Es stammt beim Menschen entweder aus der Nahrung oder wird de novo vom Körper synthetisiert. Die Synthese der einzelnen Steroide wird durch spezifische Enzyme katalysiert. Zu den beteiligten Reaktionstypen zählen: Hydroxylierung, Hydrierung, Dehydrierung, Isomerisierung, Spaltung und Aromatisierung.

Inaktiviert werden die Steroidhormone in der Leber. Hier finden insbesondere Reaktionen zur Erhöhung der Hydrophilie der Steroide statt, wodurch eine erleichterte Ausscheidung der Substanzen ermöglicht wird. Die Steroide werden im Sinne einer Phase-I-Reaktion reduziert oder hydroxyliert. Als Phase-II-Reaktionen dienen die Veresterung mit Schwefelsäure oder die Glykosylierung mit Glucuronsäuren. Das Steroidgrundgerüst kann vom Menschen nicht abgebaut werden. Die Ausscheidung der humanen Steroide erfolgt in den meisten Fällen mit dem Urin, zu geringerem Anteil über die Galle. Das Auftreten von Metaboliten im Urin kann für diagnostische Maßnahmen in der Medizin genutzt werden; es existieren zahlreiche klinische Tests zum qualitativen und quantitativen Nachweis bestimmter Steroidhormone im Urin.

Steroidhormone zählen zu den lipophilen Hormonen. Sie sind im Blut meist an Carrier gebunden, können jedoch nur als freie Hormone die Zellmembran durchdringen. Ihre Wirkung entfalten sie überwiegend im Zellkern der Zielzellen. Dort binden die Hormone an relativ spezifische Rezeptoren, die über allosterische Veränderung an Affinität für bestimmte DNA-Sequenzen zunehmen. Hat der Rezeptor an „sein“ DNA-Segment gebunden, kommt es zu einer Steigerung, seltener zu einer Verminderung der Transkriptionsrate der Nachbargene.

Für den Menschen sind sechs Steroidgruppen von Bedeutung, deren jeweils wichtigster Vertreter sind das **Aldosteron**, **Calcitriol**, **Cortisol**, **Estradiol**, **Progesteron** und **Testosteron** (s. Abb. 3-2).

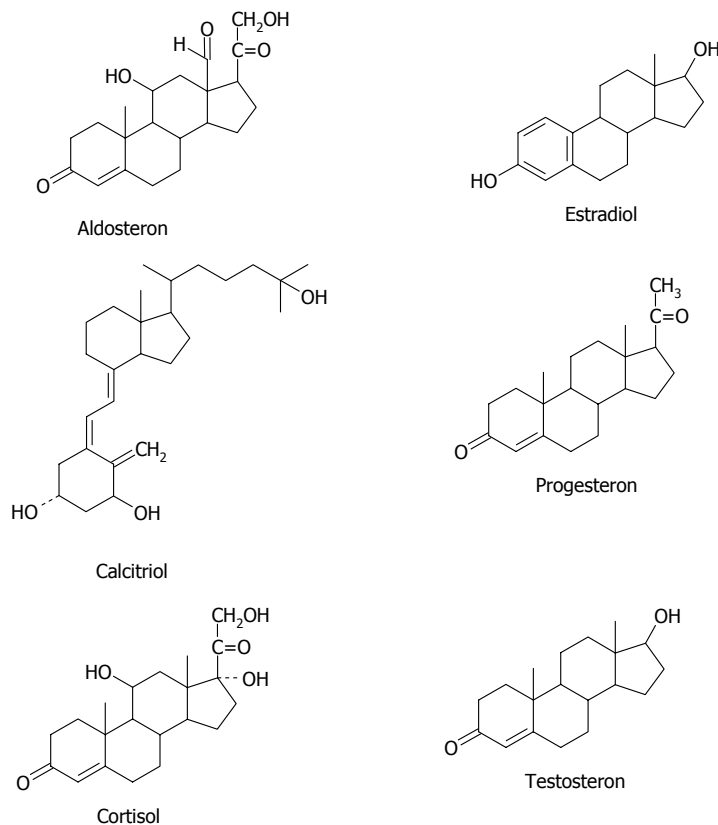


Abb. 3-2: Strukturen der wichtigsten Vertreter der humanen Steroide

Die Bedeutung des **Aldosterons** liegt in der Regulation des Elektrolythaushaltes des Menschen. Wichtigster Wirkungsort sind die distalen Tubuli der Niere. Hier fördert Aldosteron eine  $\text{Na}^+$ -Rückresorption vom Tubulus und eine aktive  $\text{K}^+$ -Sekretion in den Tubulus. Über die  $\text{Na}^+$ -Retention kommt es konsekutiv zu einem Blutdruckanstieg.

**Calcitriol** (Synonym: Vitamin-D-Hormon) reguliert den Calciumhaushalt des Menschen in Richtung einer positiven Calciumbilanz. Calcitriol fördert durch Induktion  $\text{Ca}^{2+}$ -resorbierender Proteine im Darm die enterale Calcium-Aufnahme, außerdem

stimuliert es die renale Resorption von Calcium. Am Knochen kommt es durch Calcitriol zu einem vermehrten Calcium-Umbau.

**Cortisol** hat zahlreiche Wirkungen im Sinne von Stress und Aktivierung auf den menschlichen Organismus.

Charakteristisch für Cortisol ist ferner seine Konzentrationsschwankung im menschlichen Serum mit einem Maximum am Morgen und einen Minimum am Abend. Tab. 3-1 fasst die wichtigsten Wirkungen von Cortisol auf den menschlichen Organismus zusammen.

**Estradiol** ist von großer Bedeutung für den weiblichen Organismus. Seine Funktionen sind: Proliferation des

Endometriums, Viskositätssenkung des Zervixschleims und Zervixdilataion im Sinne einer Begünstigung einer eventuellen Spermienaszension in der ersten Zyklushälfte.

Ferner bewirkt Estradiol die Ausprägung primärer und sekundärer

Geschlechtsmerkmale in der Kindheit. In der Schwangerschaft ist Estradiol essentiell, es wirkt anabol und fördert das Wachstum des graviden Uterus.

**Progesteron** ist ein Steroidhormon, welches ebenfalls vor allem im weiblichen Organismus Bedeutung hat und wie auch Estradiol zyklischen Schwankungen unterliegt. Seine Wirkungen entfalten sich vor allem in der zweiten Zyklushälfte: Es bewirkt einen Umbau des Endometriums von einem Estradiol-bedingten proliferatorischen Epithel in ein sekretorisches Epithel. Progesteron ist außerdem verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und die Entwicklung der Brustdrüsen. Im Gegensatz zu Estradiol wirkt Progesteron katabol.

**Testosteron** ist als männliches Steroidhormon zu betrachten und schon während der Fetalzeit für die Androgenisierung verantwortlich. Bis zum Ende der Pubertät bewirkt Testosteron die Entwicklung primärer und sekundärer männlicher

SYSTEM	WIRKUNG
Metabolismus	Katabole Wirkung
Herz/Kreislauf	Sensibilisierung für Catecholamine (Steigerung von Herzzeitvolumen, Steigerung des Blutdrucks durch Vasokonstriktion)
Elektrolythaushalt	Synergistisch wirkend mit Aldosteron
Immunsystem	Bildungshemmung Eosinophiler, Monozyten und Lymphozyten; somit Immunosuppression
Blutgerinnung	Steigerung der Gerinnbarkeit des Blutes durch Förderung der Thrombozytopoese

Tab. 3-1: Die wichtigsten Wirkungen des Cortisols

Geschlechtsmerkmale. Auch nach der Pubertät setzt eine bleibende Ausprägung männlicher Geschlechtsmerkmale einen entsprechenden Testosteron-Spiegel im Serum voraus. Ferner hat Testosteron einen wesentlichen anabolen Effekt auf die Muskulatur und die Knochenmasse, es fördert auch die Erythropoese. Testosteron hat außerdem psychotrope Effekte, es steigert im Tierversuch sowohl Libido als auch Aggressivität. Beim Menschen ist dieser Umstand allerdings umstritten (Schänzer, 2001).

### 3.1.2 Bedeutung und Struktur der Ecdysteroide bei Arthropoden

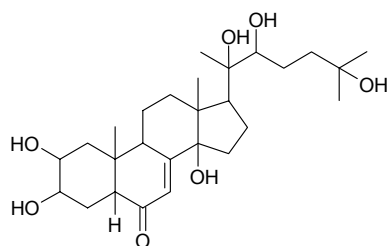
**Ecdysteroide** zählen nicht zu den humanen Steroiden. Sie werden weder im menschlichen Organismus synthetisiert, noch gibt es Anhalte für eine essentielle physiologische Wirkung.

Nachgewiesen ist diese jedoch bei den Arthropoden, für die sie das einzige Steroidsystem sind. Die erste Identifikation fand in den fünfziger Jahren als Häutungshormon bei Insekten statt, später wurden Sie auch in Krustentieren und Spinnen gefunden. Sie werden in den Häutungsdrüsen der Arthropoden synthetisiert (bei Insekten sind dies die prothorakalen Drüsen, bei Krustentieren die sogenannten Y-Organen).

Bei adulten Insekten degenerieren zwar die Häutungsdrüsen, jedoch werden weiterhin von den Gonaden Ecdysteroide gebildet; sie steuern hier die Reproduktion.

Strukturell sind die Ecdysteroide meist C-27-, C-28- oder C-29-Steroide. Sie können frei vorliegen oder in Form von Konjugaten. Ferner konnten C-24-, C-21- und C-19-Ecdysteroide isoliert werden, was sich durch die Entfernung der Seitenkette erklärt (Lafont und Horn, 1989).

**Die wichtigste, biologisch aktive Form der Ecdysteroide ist das 20-Hydroxy-Ecdyson (20E).**



20-Hydroxyecdysone

Abb. 3-3: Struktur des 20-Hydroxyecdysone

**Juvenilhormone** sind keine Steroide sondern besitzen ein Terpengerüst<sup>1</sup>. Sie sind wichtige Interaktionspartner der Ecdysteroide und entscheiden über die Art der Häutung und das Zustandekommen einer Metamorphose (s. Abb. 3-5). Auch in der Reproduktion spielen die Juvenilhormone eine Rolle im Sinne einer gonadotropen Wirkung.

Bildungsort der Juvenilhormone sind die Corpora allata.

**Die wichtigste, biologisch aktive Form der Juvenilhormone ist das Juvenilhormon III.**

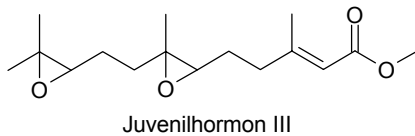


Abb. 3-4: Struktur des Juvenilhormon III

Sowohl Ecdysteroide als auch Juvenilhormone wirken auf genomischer Ebene über die Stimulation induzierbarer Gene durch Rezeptoren in den Kernen, die denen der Vertebraten ähnlich sind. Jedoch zeigen beide Substanzgruppen auch nichtgenomische Effekte, was für die Steroide der Vertebraten ebenfalls zutrifft (Falkenstein et al., 2000).

Ecdysteroide kommen auch in anderen Tieren als Arthropoden vor, so z.B. in Mollusken und Nematoden; jedoch ist die Bedeutung hier bei weitem nicht so gut erforscht wie bei den Arthropoden (Lafont, 2000).

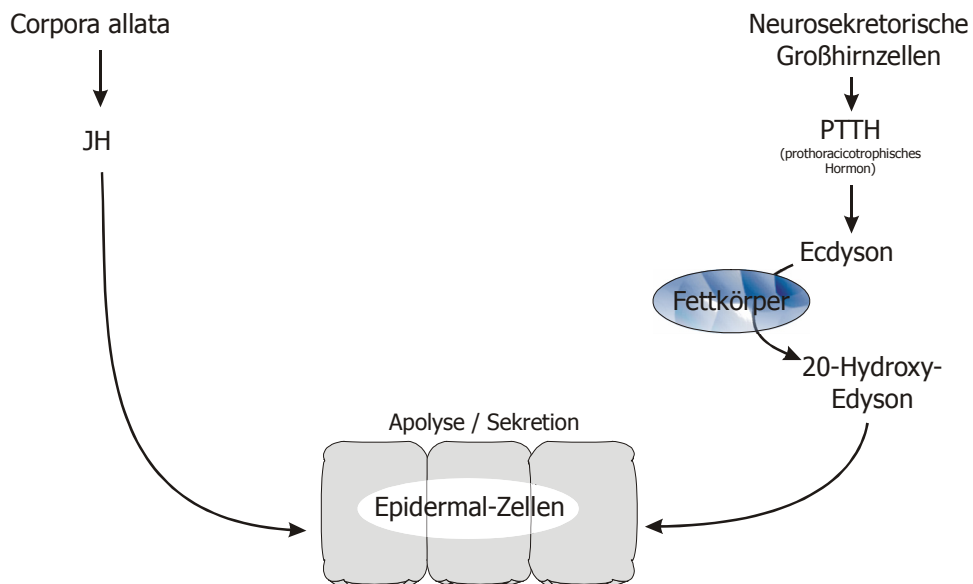


Abb. 3-5: Kontrolle der Metamorphose durch 20-Hydroxy-Ecdyson und Juvenilhormon bei den Insekten (modifiziert nach Lafont, 2000)

<sup>1</sup> Terpene sind ungesättigte Kohlenwasserstoffe mit Isoprenkomponenten

### 3.1.3 Vorkommen von Steroiden in Pflanzen und in der Nahrung

#### **Ecdysteroide**

Ecdysteroide kommen außerhalb der Tierwelt in beträchtlichen Konzentrationen im Pflanzenreich vor. Die Konzentrationen in manchen Pflanzen liegen um ein Vielfaches höher als bei den Arthropoden. Die Diversität der vorkommenden Ecdysteroide ist zwar recht groß, jedoch ist 20E wie auch bei den Arthropoden der häufigste Vertreter. Ort und Weg der Synthese sind noch nicht geklärt, auffällig ist jedoch, dass deutliche Unterschiede in den regionären Konzentrationen innerhalb einer Pflanze vorliegen.

Über die Bedeutung der Phytoecdysteroide herrscht noch nicht letzte Klarheit. Vermutet wird, dass sie ein natürlicher Schutz gegen pflanzenfressende Insekten sind. Hinweise sind, dass zum einen Pflanzen in erheblichem Maße zur Synthese von Ecdysteroiden befähigt sind, zum anderen, dass diese auch signifikant die Häutungsphysiologie der Insekten stören (Lafont und Horn, 1989).

Zu den Pflanzen, die Ecdysteroide enthalten, zählen auch Spezies, die der menschlichen Ernährung dienen. Beispielsweise wurden hohe Konzentrationen für 20E in Spinat gefunden, je nach Abschnitt der Pflanze bis zu 800 mg/kg (Grebek et al., 1996). Einige Heilpflanzen der traditionellen chinesischen Medizin sind ebenfalls ecdysteroidhaltig. Exemplarisch seien hier die gängigsten Pflanzen Suma und Leuzea genannt, denen eine analgetische und antiphlogistische Wirkung nachgesagt wird (Sláma und Lafont, 1995). Auf die genaue Studienlage der Wirkungen von Ecdysteroiden auf den Menschen geht 3.2 ein.

#### **Östrogene**

Die Wirkungen anderer in der Natur vorkommender Steroide auf den Menschen werden schon seit Langem wissenschaftlich untersucht, insbesondere gilt dies für die Gruppe der Östrogene. Der Mensch ist gleich auf zweierlei Weise Östrogenen in der Umwelt ausgesetzt: Zum einen wirken Östrogene in Form von natürlicherweise in Pflanzen vorkommenden Substanzen ein (Phytoöstrogene), zum anderen wirken auf den Menschen künstlich in die Natur gelangte Östrogene ein (Xenoöstrogene). Letztere entstammen unter anderem Pestiziden, Weichmachern, hormonellen Kontrazeptiva und diversen Kosmetikprodukten, sie sind strukturell wesentlich heterogener als die Phytoöstrogene.

Phytoöstrogene sind in Nahrungsmitteln wie Sojabohnen oder Trauben in biologisch relevanter Dosis enthalten. Es gibt gute Hinweise darauf, dass ein kausaler

Zusammenhang besteht zwischen relativ hohem Soja-Konsum in asiatischen Ländern und einer relativ geringen Inzidenz von Mamma-Carcinomen in diesen Ländern. Die Ursache hierfür soll in einer teilweisen Hemmung von angiogenetischen Faktoren liegen. Ferner ist für Phytoöstrogene ein dosisabhängiger Schutz vor der arteriellen Verschlusskrankheit (AVK) nachgewiesen.

Xenoöstrogene werden aktuell kontrovers beurteilt. Für die meisten der Substanzen konnten keine vasoprotektiven bzw. antineoplastischen Eigenschaften nachgewiesen werden, wohl aber gegenteilige Wirkungen und toxische Eigenschaften anderer Natur. Dies macht sie gemeinsam mit ihrer Lipophilie zu einer problematischen Substanz in der Nahrungskette (Dubey et al., 2000).

### **Digitalisglykoside**

Auch die therapeutisch genutzten Digitalisglykoside (Digoxin und Digitoxin) stellen Steroidhormone dar, die im Pflanzenreich (*Digitalis lutea*, gelber Fingerhut) vorkommen und erhebliche Wirkungen auf den menschlichen Organismus haben. Schon im fünften Jahrhundert wurden sie in der Volksmedizin in Irland verwendet. Heute stellen sie im klinischen Alltag Pharmaka der ersten Wahl zur Behandlung der Herzinsuffizienz dar. Digitalisglykoside erhöhen den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel über eine Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Dies hat an den Herzmuskelzellen eine positive Inotropie zur Folge. Von Bedeutung ist, dass eine klinische Besserung nur in einem engen therapeutischen Bereich stattfindet. Als Fertigarzneimittel finden nur strukturell veränderte Digitalisglykoside Verwendung, pflanzliche Essenzen sind aufgrund ihres Resorptionsverhaltens und ihrer Pharmakokinetik für den therapeutischen Gebrauch unbrauchbar.

## **3.2 Wirkungen der Ecdysteroide auf den Menschen**

### **3.2.1 Festgestellte Wirkungen auf einzelne Organsysteme**

Schon in den sechziger Jahren wurden Studien durchgeführt, um die Wirkungen von Ecdysteroiden auf den Menschen besser zu verstehen (zitiert in Sláma und Lafont, 1995). Im Folgenden sollen die wichtigsten Resultate – geordnet nach einzelnen Systemen des menschlichen Körpers – veranschaulicht werden.



### **Zellproliferation**

Die Resultate der Studien bezüglich der Zellproliferation sind mitunter unstimmig. So kam die Arbeitsgruppe von Burdette zu dem Resultat, dass Ecdysteroide auf Sarkomzellen und embryonale Fibroblasten eine wachstumsinhibierende Wirkung haben (Burdette, 1962, 1964).

Studien an He-La-Zellen<sup>2</sup> hingegen konnten keinen Effekt auf die Proliferation aufzeigen (Hoffmeister und Lang, 1963). Eine andere Arbeitsgruppe fand sogar Hinweise auf eine carcinogene Aktivität im Tierexperiment (El-Mofty et al., 1994), was allerdings kein anderes Labor bisher bestätigen konnte.

### **Proteinmetabolismus**

Die meisten Versuche zu diesem Thema wurden an der Leber der Maus durchgeführt. Viele Arbeitsgruppen kamen zu dem Resultat, dass Ecdysteroide einen stimulierenden Effekt auf die Proteinbiosynthese haben, der Mechanismus konnte jedoch bis heute nicht aufgedeckt werden. Eindeutig gezeigt werden konnte bisher nur, dass die Stimulierung der Proteinsynthese nicht nur die Ribosomen, sondern auch den Kern und die Mitochondrien betreffen (Otake et al., 1969; Syrov et al., 1978).

Bemerkenswert ist, dass die stimulierende Wirkung auf die Proteinsynthese nicht nur in der Leber vorliegt, sondern auch im Nervengewebe nachweisbar ist. Die Ursache ist hier in der Stimulierung des Enzyms Glutamat-Decarboxylase gesehen worden (Chaudhary et al., 1969). Auch der Mensch verfügt über neuroaktive Steroidhormone, dies gilt unter anderem für DHEAS<sup>3</sup>, Estradiol und Progesteron. Hierfür ist nicht der klassische Wirkmechanismus auf genetischer Ebene, sondern ein G-Protein-gebundener Mechanismus verantwortlich (Falkenstein et al., 2000).

### **Kohlenhydratmetabolismus**

Eine japanische Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt von 20E auf die Blutzuckerlage hyperglykämischer Mäuse. Im Gegensatz zu der Vergleichsgruppe der normoglykämischen Mäuse vermochte hier 20E den Blutzuckerspiegel zu senken (Yoshida et al., 1971). Es zeigte sich bei einem Versuch mit <sup>14</sup>C-markierter Glucose eine vermehrte Verstoffwechslung zu Glykogen. Aufgrund des anscheinend günstigen

---

<sup>2</sup> Zellen eines schnell wachsenden Zervixkarzinom, die zu experimentellen Zwecken gezüchtet werden

<sup>3</sup> Steroid, welches von der fetalen Nebennierenrinde produziert wird

Einflusses auf eine diabetische Stoffwechsellage wurde in Japan ein Patent für ein Antidiabetikum, das Ecdysteroide enthält, erteilt (Takahashi und Nishimoto, 1992).

### **Fettstoffwechsel**

In der Vergangenheit wurden exogen hypercholesterinämische Ratten mit verschiedenen Ecdysteroiden in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen behandelt.

Es zeigten sich bis zu 30% reduzierte Cholesterol-Spiegel im Serum je nach Dosis und verwendetem Ecdysteroid. Als Ursache nehmen die Autoren dieses Artikels eine rein physikalische Wirkung an, im Sinne einer Verdrängung von Cholesterol durch Ecdysteroide an der Zellmembran (Mironova et al., 1982).

Ferner wurde in einem anderen Labor die Verminderung des Cholesterol-Gehaltes der Leber unter Ecdysteroid-Gabe festgestellt. Die Ursache des verminderten Cholesterol-Gehaltes wurde hier in einer vermehrten biliären Ausscheidung, bei Applikation höherer Ecdysteroid-Dosen (10-50 µg/kg KG) außerdem in einer verminderten de-novo-Synthese gesehen (Lupien, 1969).

### **Immunsystem**

Viele Studien der jüngeren Zeit beschäftigen sich mit dem Einfluss von Ecdysteroiden auf das Immunsystem. Hervorzuheben ist hier die Wirkung auf inflammatorische Prozesse. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass 20E in einer Dosis von 10-20 mg/kg KG und Tag eine dem Cortisonacetat entsprechende anti-inflammatorische Wirkung hat (Kurmukov und Syrov, 1988). Die therapeutische Dosis von Cortisonacetat liegt bei 1 mg/kg KG.

Eine andere Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit der Histaminausschüttung aus Mastzellen des Peritoneums von Ratten. Auch hier zeigt sich eine anti-inflammatorische Wirkung von 20E, wahrscheinlich durch die Hemmung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Mobilisation (Takei et al., 1991).

Der Verlauf von chronischen Lungenerkrankungen unter exogenem Diabetes mellitus wurde bei Ratten jeweils mit und ohne Ecdysteroid-Gabe untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass opportunistische bronchopulmonale Erkrankungen bei Gabe von Ecdysteroiden seltener aufzutreten scheinen (Najmutdinova und Saatov, 1999)

### **Reproduktionssystem**

Die Studien der siebziger Jahre geben an, dass Ecdysteroide weder östrogen- noch testosteronartige Wirkungen haben (Ogawa et al., 1974; Prabhu und Nayar, 1974).

Diese These wird unterstützt durch eine russische Studie, die beschreibt, dass Ecdysterioide wohl anabole Wirkungen haben, jedoch als Androgen-Substitution bei kastrierten Säugetieren keine Wirkung zeigen (Syrov und Kurmoukov, 1976).

Jüngere Studien wiederum zeigen Effekte von Ecdysteroiden auf das Sexualverhalten männlicher Ratten: Während anfänglich die sexuelle Aktivität anstieg, flachte sie nach längerer Behandlung im Sinne einer Toleranzreaktion ab (Mirzaev und Syrov, 1992). Später konnte beim Menschen ein begünstigender Effekt auf die Spermatogenese nachgewiesen werden (Mirzaev et al., 2000).

Eine andere Arbeitsgruppe zeigte auf, dass 20E - direkt appliziert - anscheinend spermizide Wirkung besitzt: Bei einer Behandlung von menschlichem Samen mit 20E in der Konzentration von 20 µg/ml wurden nach einigen Minuten 100% der Spermien abgetötet. Hierfür wurden unspezifische Effekte verantwortlich gemacht (Bandara et al., 1989). Dies wurde auch im Labor der AG Koolman getestet, konnte jedoch nicht reproduziert werden.

### **Haut**

Bei externer Applikation von Ecdysteroiden wurde eine feuchtigkeitserhaltende Wirkung beschrieben (Lin und Lin, 1989).

Später wurde auch eine günstige Wirkung in der Behandlung von Psoriasis beschrieben (Meybeck et al., 1994). Es wurden bereits einige Patente für Externa, die 20E und andere Ecdysterioide enthalten, beantragt (zitiert nach Sláma und Lafont, 1995). Corticosteroid-Analoga dürfen als etablierte Therapie der Psoriasis gelten.

### **Zellkern**

In der Ukraine beschäftigten sich einige Wissenschaftler mit der Wirkung von Phytoecdysteroiden auf Versuchstiere, die erbgutschädigenden Substanzen wie Chloroform oder Chlorofos ausgesetzt waren. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Phytoecdysterioide genoprotektive Wirkungen haben; vermutet wird eine De-Repression von DNA-Reparaturmechanismen (Chabannyi et al., 1994).

### **Vitamin-D-Stoffwechsel**

Ecdysterioide scheinen Vitamin-D-synergistische Effekte zu haben.

Zum einen fand man heraus, dass 20E wie auch Vitamin D eine radikalvermindernde Wirkung hat, beide konnten die radikal-induzierte Lipidperoxidation vermindern (Kuzmenko et al., 1997).

Ferner ist 20E in der Lage, die enterale  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption bei Hühnern mit einer D-Hypovitaminose deutlich zu verbessern (Kotsiuruba et al., 1993).

### Skelettmuskuläres System

Die mit bloßem Auge fassbare Tatsache, dass in den ersten Tierexperimenten mit Mäusen diese unter 20E-Behandlung merklich an Gewicht zunahmten (Hikino et al., 1969), führte schon früh zur Untersuchung möglicher anaboler Effekte von Ecdysteroiden auf das Säugetier.

Ecdysteroiden wurden hinsichtlich ihrer anabolen Auswirkung quantitativ verglichen. Hierbei zeigte Turkesteron die größte anabole Aktivität (Syrov, 1984). Bei Turkesteron handelt es sich um ein C-27-Ecdysteroid, das sich von 20E lediglich durch eine zusätzliche Hydroxy-Gruppe an C-11 unterscheidet (s. Abb. 3-6, rot markiert).

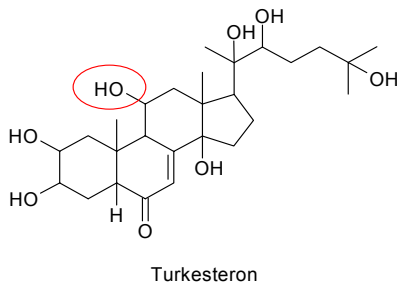


Abb. 3-6: Struktur des Turkesteron

Ferner wurden ecdysteroidhaltige pflanzliche Präparate aus *Leuzea* (Bergscharte) untereinander auf ihre anabole Wirksamkeit geprüft. Man fand in sämtlichen Fällen anabole Wirkungen jedoch in unterschiedlicher Ausprägung (Gadzhieva et al., 1995). Eine spätere Studie beschäftigte sich ausführlich mit dem Vergleich eines gängigen Anabolikums für Säugetiere, dem Metandienon (s. Abb. 3-7), und 20E. Zusätzlich wurde zwischen einer Wirkung bei gleichzeitigem Training und einer Wirkung ohne Training differenziert. Es kam bei gleicher Dosis von  $5 \mu\text{g/kg KG}$  bei beiden Steroiden zu einer signifikanten anabolen Wirkung; erstaunlicherweise vermochte 20E diese auch ohne Training hervorzurufen, was bei Metandienon nicht gegeben war (Chermnykh et al., 1988).

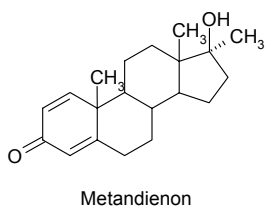


Abb. 3-7: Struktur des Metandienon

Diese Resultate veranlassten andere Wissenschaftler, Ecdysteroide auf die unerwünschten Nebenwirkungen (u.a. thymolytische und antigonadotrope Wirkungen) der klassischen Anabolika zu überprüfen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten dabei im Tierexperiment zeigen, dass bei 20E nicht die für die klassischen Anabolika typischen Nebenwirkungen auftraten (Syrov, 1984; Kuz'mitskii et al., 1990, Sergeev et al., 1991).

### 3.2.2 Pharmakologie der Ecdysteroide

Ecdysteroide gelangen nach heutigem Wissensstand überwiegend durch Nahrungsaufnahme in den menschlichen Körper (vgl. 3.1.3), jedoch findet man auch bei bestimmten Erkrankungen, vor allem bei Helminthenbefall, aber auch bei schweren Krankheitsbildern wie Schädelhirntrauma, fortgeschrittener Leberzirrhose oder bei Sepsis erhöhte Spiegel von Ecdysteroiden im Urin (Gharib et al., 1993). Diese Tatsache ließ einige Forscher hoffen, dass man mit den Ecdysteroiden einen guten Verlaufparameter für diese Erkrankungen gefunden hatte. Seine Verlässlichkeit ist aber gerade durch die starken Schwankungen infolge Aufnahme verschiedener Nahrungsmittel und anderer Einflussfaktoren stark eingeschränkt (Sláma und Lafont, 1995).

Die akute Toxizität von Ecdysteroiden wird in der Literatur als gering angegeben. Die LD-50 beträgt im Tierversuch 6,4 g/kg KG bei intraperitonealer und 9 g/kg KG bei oraler Applikation (Matsuda et al., 1970).

20E wird nur zu einem geringen Bestandteil bei oraler Gabe resorbiert. Die Resorption findet hauptsächlich im Zeitrahmen bis zu einigen Stunden nach Aufnahme statt. Die Gewebegängigkeit ist gut. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend biliär. Dies wurde mittels Tritium-markiertem 20E an Mäusen untersucht (Hikino et al., 1972). Die Geschwindigkeit der Exkretion differiert zwischen den Säugetieren erheblich. So dauert es beim Menschen ca. neun Stunden bis zur vollständigen Eliminierung, beim Schaf ca. zwei Stunden und bei der Maus weniger als eine Stunde (Simon, 1988).

Bisherige Studien zum Metabolismus von Ecdysteroiden beim Säugetier werden ausführlich im Rahmen der Diskussion (7.2.5) abgehandelt.

### **3.3 Doping**

#### 3.3.1 Definition

Doping wird durch die medizinische Kommission des internationalen olympischen Komitees (IOC) definiert: „*Doping ist die Verwendung von Substanzen aus den verbotenen Wirkstoffgruppen und die Anwendung verbotener Methoden*“. Die Regeln werden ständig überarbeitet. Aktuelle Listen einiger internationaler Sportverbände können unter [http://www.dshs-koeln.de/biochemie/rubriken/07\\_info/reglement.html](http://www.dshs-koeln.de/biochemie/rubriken/07_info/reglement.html) eingesehen werden.

#### 3.3.2 Historisches

Es existieren Berichte, dass bereits in der Antike bei sportlichen Wettbewerben stimulierende Substanzen eingenommen wurden. In welchem Ausmaß in der Neuzeit Doping praktiziert wurde, ist bis zu den sechziger Jahren unklar.

In dieser Zeit fand eine Sensibilisierung der sportlichen Institutionen statt, nachdem es zu einigen Todesfällen in Folge von Amphetamin-Einnahme gekommen war. 1964 wurde dies auch der breiten Öffentlichkeit vor Augen geführt als der Radfahrer Tom Simpson während der Tour de France zusammenbrach und starb. Ursächlich war hier die Kombination aus starker Hitze, enormer physischer Belastung und der Einnahme von Amphetaminen.

So verwundert es nicht, dass die ersten Antidopingregeln neben Narkotika auch die Klasse der Stimulantien umfassten. Seitdem wurden die Regeln ständig um weitere Gruppen erweitert.

#### 3.3.3 Verbotene Wirkstoffgruppen und Methoden

Der Übersichtlichkeit halber hat das IOC die verbotenen Wirkstoffe und Methoden in Gruppen zusammengefasst. (Tab. 3-2). Für die vorliegende Arbeit sind von Bedeutung: Anabole Wirkstoffe (I-C) und Cortikosteroide (III-D).

<b>I</b> <b>Verbotene</b> <b>Wirkstoffgruppen</b>	<b>II</b> <b>Verbotene Methoden</b>	<b>III</b> <b>Eingeschränkt</b> <b>zugelassene</b> <b>Wirkstoffgruppen</b>
<b>A</b> Stimulantien <b>B</b> Narkotika <b>C</b> Anabole Wirkstoffe <b>D</b> Diuretika <b>E</b> Peptidhormone und Analoga <b>F</b> Anti-östrogene Wirkstoffe <b>G</b> Maskierende Substanzen	<b>A</b> Blutdoping <b>B</b> Pharmakologische, chemische und physikalische Manipulation <b>C</b> Gendoping	<b>A</b> Alkohol <b>B</b> Cannabinoide <b>C</b> Lokalanästhetika

Tab. 3-2: Übersicht der einzelnen Gruppen der bei sportlichen Wettkämpfen verbotenen Wirkstoffe und Methoden

### Anabole Wirkstoffe

Diese Gruppe ist in die **anabolen adrogenen Steroide (AAS)**, Anabolika im klassischen Sinne) und die  **$\beta_2$ -Mimetika** unterteilt.

Die **AAS** lassen sich außerdem in natürliche (Testosteron und Vorläuferprodukte) und synthetische (u.a. Nandrolon) unterteilen.

Hinsichtlich der Wirkungen der AAS lassen sich die androgenen von den anabolen Wirkungen differenzieren (Tab. 3-3). Die muskelaufbauende Wirkung beruht auf einer Stimulierung der Proteinbiosynthese im Skelettmuskel, wobei Einzelheiten dieses Wirkmechanismus weiterhin ungeklärt sind. Leistungsverbessernd wirken AAS vor allem in Sportarten, die akut ein großes Maß an Kraft erfordern wie beispielsweise Gewichtheben. Verwendet werden Sie jedoch auch in anderen Bereichen (Bhasin et al., 2001)

Die synthetischen AAS haben ihr Wirkungsprofil im Vergleich zu den natürlichen mehr im anabolen Bereich, was sie für Dopingzwecke interessant macht.

<b>Androgene Wirkungen</b>	<b>Anabole Wirkungen</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vertiefung der Stimme</li> <li>• Wachstum und Entwicklung der Prostata</li> <li>• Peniswachstum</li> <li>• Wachstum und Entwicklung der Bläschendrüsen</li> <li>• Zunahme von Geschlechtstrieb und sexuellem Interesse</li> <li>• Zunehmende Körperbehaarung</li> <li>• Wachstum und Musterbildung der Schambehaarung</li> <li>• Verdichtung der Gesichtsbehaarung</li> <li>• Zunahme der Talgbildung</li> <li>• Steigerung der Aggressivität (im Tierversuch, beim Mensch nicht gesichert)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zunahme der Skelettmuskelmasse</li> <li>• Zunahme des Hb-Spiegels im Blut</li> <li>• Zunahme der Erythrozytenmenge</li> <li>• Prozentuale Abnahme des Körperfettes, Umverteilung des Körperfetts</li> <li>• Verstärkte Calcium-Aufnahme der Knochen</li> <li>• Zunahme der Körperbilanz verschiedener Elektrolyte</li> </ul>

*Tab. 3-3: Androgene und anabole Wirkungen der AAS nach Schänzer, 2001*

Als problematisch gelten bei den klassischen AAS die zahlreichen Nebenwirkungen. Diese sind größtenteils über die physiologischen Effekte des Testosterons zu erklären, die nun durch ihr Ausmaß einen unphysiologischen Charakter bekommen (Tab. 3-4).



System	Art der Wirkung
Herz-Kreislauf	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöhtes atherosklerotisches Risiko durch eine Verminderung des HDL/LDL-Quotienten</li> <li>• Zunahme der Herzmuskelmasse ohne Zunahme der Kapillarisation (relative Ischämie des Herzmuskels)</li> </ul>
Leber	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hepatotoxizität</li> <li>• Tumorinduktion</li> </ul>
Psyche	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Euphorie</li> <li>• Psychische Abhängigkeit</li> <li>• Aggressivität (fraglich, vgl. Tab. 3-3)</li> </ul>
Geschlechtsmerkmale ♀	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vertiefung der Stimme (Kehlkopfverknöcherung)</li> <li>• Klitorisvergrößerung</li> <li>• Veränderung der Fettverteilung (sog. männliches Verteilungsmuster)</li> <li>• Männliches Behaarungsmuster</li> <li>• Störung des Menstruationszyklus</li> </ul>
Geschlechtsmerkmale ♂	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brustwachstum (Gynäkomastie)</li> <li>• Abnahme des Hodenvolumens</li> <li>• Abnahme der Spermienzahl</li> </ul>
Knochen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorzeitiger Schluss der Wachstumsfugen bei Jugendlichen</li> </ul>
Sonstiges	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neigung zu Akne und Wassereinlagerung im Gewebe</li> </ul>

Tab. 3-4: Unerwünschte Nebenwirkungen der AAS

Auch in der Gruppe der anabolen Wirkstoffe (I-C) sind die  **$\beta_2$ -Mimetika** gelistet. Sie spielen im Zusammenhang mit dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle und seien hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt.  $\beta_2$ -Mimetika sind erst in den neunziger Jahren in die Wirkstoffgruppe der anabolen Wirkstoffe aufgenommen worden. Sie finden normalerweise in der Behandlung von Patienten mit obstruktiven Atemwegserkrankungen Verwendung und wirken über  $\beta_2$ -Rezeptoren im Bronchialsystem bronchodilatatorisch. Bei Anwendung in supratherapeutischen Dosen kommt es jedoch zusätzlich zu einer anabolen Wirkung, deren Mechanismus noch unklar ist.

### **Corticosteroide**

Bei den Corticosteroiden handelt es sich um Derivate des menschlichen Cortisols. Die Wirkungen entsprechen weitestgehend denen des natürlichen Cortisols; das Wirkprofil ist jedoch meist in Richtung der glucocorticoiden Wirkung verschoben, die mineralocorticoide Wirkung ist schwächer. Glucocorticoide finden in der Medizin häufig Anwendung. Einerseits sind sie bei einer Nebenniereninsuffizienz zur Substitutions-Therapie nötig, um eine Addison-Krise zu vermeiden; andererseits können sie zahlreiche Erkrankungen mit inflammatorischem Charakter günstig beeinflussen, wie z.B. Asthma (allergisch und nicht-allergisch), zahlreiche Hauterkrankungen (z.B. Neurodermitis), Hirnödemen, Autoimmunerkrankungen, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises etc. Gängige Substanzen in der Humanmedizin sind Prednison, Prednisolon und Dexamethason.

Zu beachten sind hierbei zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen der Corticoide:

- Immunsuppression, dadurch
  - Infektionsgefahr
  - Wundheilungsstörungen
  - Begünstigung von Ulzerationen im Magen-Darm-Trakt
  
- Katabolie
  - Abnahme der Skelettmuskelmasse
  - Osteoporose
  - Wachstumshemmung bei Kindern
  - Steroiddiabetes

- Cushing-Syndrom (Stammfettsucht und Vollmondgesicht infolge einer Umverteilung der Fettmasse, nur bei langfristiger Applikation); Striae
- Hautatrophie

Der Grund für den Missbrauch von Corticoiden bei Sportlern ist schwer verständlich, da es im Gegensatz zu den anabolen Wirkstoffen katabol wirkt. Es wird vermutet, dass der Missbrauch im Zusammenhang mit der euphorisierenden Wirkung der Corticosteroide steht.

Die Anwendung von Corticosteroiden ist nur systemisch verboten, bei topischer Applikation kann sie bei Vorlage eines entsprechenden Attestes (z.B. Asthma, allergische Rhinitis) erlaubt sein (Schänzer, 2001).

### 3.3.4 Doping mit Ecdysteroiden

Ecdysteroide sind von den IOC-Richtlinien bisher nicht erfasst. Es gibt jedoch gute Hinweise, dass Ecdysteroide zur Leistungssteigerung in Trainings- und Wettkampfphasen genutzt werden (Sláma und Lafont, 1995). Ferner werden über des Internet von einer wachsenden Zahl von Unternehmen Produkte mit dem Wirkstoff 20E angeboten (Tab. 3-5, Abb. 3-8). Lafont und Dinan haben eine überaus ausführliche Übersicht der Firmen aufgestellt, die ecdysteroidhaltige Produkte zur Leistungssteigerung über das Internet verkaufen, sie listet mehr als hundert Anbieter (Lafont und Dinan, 2003).

<b>Anbieter</b>	<b>Internet-Link</b>
Bridgers Fitness & Physique (North Carolina, USA)	<a href="http://www.b-fit.com/ecrusanfor.html">http://www.b-fit.com/ecrusanfor.html</a>
Fitness Connection (Maryland, USA)	<a href="http://www.fitness-connection.com/ecdybol.shtml">http://www.fitness-connection.com/ecdybol.shtml</a>
Fitness One (Wisconsin, USA)	<a href="http://www.fitnessone.com/anabolics/ecdysterone.html">http://www.fitnessone.com/anabolics/ecdysterone.html</a>
Gymgrossisten (Schweden)	<a href="http://gymgrossisten.com/test/gymshop/media/ecdysten_text.htm">http://gymgrossisten.com/test/gymshop/media/ecdysten_text.htm</a>

Thermolife (Kalifornien, USA)	<a href="http://www.thermolife.com/Products-Ecdysten.html">http://www.thermolife.com/Products-Ecdysten.html</a>
Anti-Aging-Drugs (Saint Kitts und Nevis (Mittelamerika))	<a href="http://www.anti-aging-drugs.com/?chapter=muscle">http://www.anti-aging-drugs.com/?chapter=muscle</a>
Tiger Fitness (Ohio, USA)	<a href="http://www.tigerfitness.com/Thermo%20Life%20Ecdysten.htm">http://www.tigerfitness.com/Thermo%20Life%20Ecdysten.htm</a>
Expert Fitness (Maryland, USA)	<a href="http://www.expertfitness.com/ecdysten.html">http://www.expertfitness.com/ecdysten.html</a>
Total Fitness Bodybuilding (Kanada)	<a href="http://totfit.safeshopper.com/100/743.htm?264">http://totfit.safeshopper.com/100/743.htm?264</a>

Tab. 3-5: Auswahl von Bezugsmöglichkeiten kommerzieller Ecdysteroidprodukte im Internet

The screenshot shows a Microsoft Internet Explorer browser window displaying the Thermolife website. The address bar shows the URL <http://www.thermolife.com/Products-Ecdysten.html>. The website content includes:

- Header:** Thermolife International, Products, www.thermolife.com
- Navigation:** Home, Products, Future Products, Clinical Studies, Order, Contact
- Product Information:**
  - ECDYSTEN - Russian Anabolic Formula**
  - Now with Bioperine®!
  - 15mg Ecdysterone (Ecdypure™)
  - 5mg Bioperine®
  - 90 Capsules = \$39.95**
- Suggested Use:** 1-2 Capsules 3 times per day. For best results it is also recommended to increase your daily protein intake while using this product.
- NEW:** Now with Bioperine®, a patented extract that improves the bioavailability of oral supplementation.
- Description:** Ecdysten™ - Russian Anabolic Formula is a non-hormonal anabolic supplement whose ingredients have been proven in clinical studies to be as anabolic as actual steroids while exhibiting no undesirable side effects.
- Ingredients:** The active anabolic ingredient in Ecdysten is the known steroid, Ecdysterone. Imported directly from the Soviet Union the Ecdysterone in this product is extracted from *Rhaponticum carthamoides* and is guaranteed to be 98% (or higher) pure. This (and only this) remarkable plant extract, (at this potency), has been proven in numerous clinical studies to be more anabolic than methandrostenolone (Dianabol), with no androgenic or other undesirable side effects. Ecdysten™ is a non-hormonal dietary supplement that will cause a huge increase in anabolism but will not effect hormone levels.
- Effectiveness:** Ecdysten works by increasing nitrogen retention and increasing protein synthesis at the cellular level (for this reason we strongly recommend that you increase your daily dietary intake of protein while using this product). It has been scientifically proven, without a doubt, that increased nitrogen retention and resistance training will stimulate muscle growth and burn fat as much as 20 times more effectively than without an increase in nitrogen retention.

Abb. 3-8: Beispiel für die Internet-Vermarktung von Ecdysteroid-haltigen Produkten von Ecdysten der Firma Thermolife, Quelle: <http://www.thermolife.com/Products-Ecdysten.html>

20E vermag wie die AAS den Stoffwechsel anabol zu beeinflussen, ist jedoch auf Grund seines günstigeren Nebenwirkungsprofils und des Fehlens dieser Substanz in den Regeln des IOC für eine Leistungssteigerung bei sportlichen Wettkämpfen attraktiv (Tab. 3-6). Ferner ist der Preis von 30 bis 40 US-Dollar für eine Behandlung mit Ecdysteroiden für einen Monat relativ erschwinglich. Klassische anabole androgene Steroide kosten für den gleichen Behandlungszeitraum meist das Doppelte (basierend auf o.a. Bezugsquellen).

<b>Organsystem</b>	<b>AAS (Schänzer, 2001)</b>	<b>Ecdysteroide</b>
Herz	Gefahr einer relativen kardialen Ischämie	Kein Effekt am gesunden Herzen nachweisbar (Kurmukov und Ermishina, 1991)
Fettstoffwechsel	Verschlechterung des LDL/HDL-Quotienten	Verbesserung der Fettstoffwechsellage durch Senkung des Cholesterol-Spiegels (vgl. 3.2.1)
Leber	Hepatotoxizität bei hohen Dosen; Tumorinduktion	Bisher keine hepatotoxische Wirkung dokumentiert; Cancerogenität umstritten (vgl. 3.2.1)
Haut	Erhöhte Neigung zu Akne	Keine Publikationen bzgl. systemischer Applikation; bei lokaler Anwendung feuchtigkeitserhaltende Wirkung und Linderung einzelner Hauterkrankungen, z.B. Psoriasis (vgl. 3.2.1)
Psyche	Euphorie, Dysphorie beim Absetzen, Verdacht auf psychische Abhängigkeit	Kein Effekt auf die Psyche nachgewiesen (vgl. 3.2.1)

Tab. 3-6: Die wichtigsten Nebenwirkung der AAS im direkten Vergleich mit Ecdysteroiden

### **3.4 Ziele der Arbeit**

Folgende Tatsachen machen die Ecdysteroide für den Menschen interessant

- **Ecdysteroide werden mit der Nahrung in beträchtlichen Mengen aufgenommen**
- **Ecdysteroide besitzen Wirkungen auf den Menschen, viele davon könnten medizinisch genutzt werden**
- **Ecdysteroide werden im Sportbereich zur Leistungssteigerung genutzt**

In den vergangenen 30 Jahren wurden zahlreiche Studien zu den Wirkungen von Ecdysteroiden auf Säugetiere durchgeführt, viele davon sind wissenschaftlich überaus interessant und vielversprechend. Jedoch zeigen einige der Studien Mängel im Formellen, viele sind darüber hinaus in Russisch publiziert, was eine Verbreitung des Wissens um die Bedeutung der Ecdysteroide für den Menschen zusätzlich erschwert.

Generell fehlen bisher brauchbare Informationen über den Metabolismus der Ecdysteroide, die bis zum jetzigen Zeitpunkt publizierten Ergebnisse sind widersprüchlich. Der Metabolismus gehört jedoch zu den grundlegendsten pharmakologischen Eigenschaften einer Substanz, dies vor allem aus pharmakodynamischen und toxikologischen Gesichtspunkten.

Diese Arbeit hat deshalb die Zielsetzung, bessere Erkenntnisse über die Pharmakokinetik und den Metabolismus des 20E zu erhalten und somit die zahlreichen Wirkungen und auch die Nebenwirkungen dieser Substanz besser zu verstehen. Dies beinhaltet unter anderem eine Optimierung der Probenaufbereitung, eine Isolierung des 20E in den biologischen Proben und im optimalsten Fall die Isolierung von Metaboliten.

Um dies zu erreichen, wurde ein Selbstversuch durchgeführt, in dem einem Probanden 20E oral verabreicht wurde und nachfolgend für 48 Stunden Urin-, Speichel- und Blutproben gesammelt wurden.

## 4 Geräte und Materialien

### 4.1 Geräte

- Absaugereinheit für Festphasenextraktion: Merck KgaA, 64271 Darmstadt  
**Adsorbex** Sample Preparation Unit, Cat.  
19835
- Analysenwaage: **Sartorius** 1217 Sartorius AG, Weender Landstraße  
94-108, 37075 Göttingen
- Dispenser: **Eppendorf** Multipette plus mit Eppendorf AG,  
Combitips plus 1,0 ml bzw. 5,0 ml Barkhausenweg 1,  
22331 Hamburg
- Heizofen: **Heraeus** T 5042 Heraeus GmbH, Heraeusstraße 12-14,  
63450 Hanau
- HPLC, bestehend aus:
- Pumpe: **Merck** L-6210 Intelligent Pump
  - UV-Detektor: **Merck** L-4200
  - Interface: **Merck** D-6000
  - Fractionssammler: **Pharmacia** Nr. 124105
  - Software: **Hitachi** HPLC-Manager 2
  - Merck KgaA, 64271 Darmstadt
  - Merck KgaA, 64271 Darmstadt
  - Merck KgaA, 64271 Darmstadt
  - Amersham Biosciences Europe GmbH, Munzinger Straße 9,  
79111 Freiburg
  - Hitachi Instruments, Inc., 3100  
N. First Street, San Jose, CA  
95134, USA

Kreisschüttler: **Edmund Bühler** KL-2

Johanna Otto GmbH, Am Ettenbach 6,  
72379 Hechingen

Lyophilisator, bestehend aus

- Motor: **AEG** AMEB 71
- Kühlaggregat: **Heto** C4-110
- Vakuumentrifuge: **Heto** Hetovac VR-1
- EHG Elektroholding GmbH,  
Bockenheimer Landstraße 101,  
60352 Frankfurt/Main
- Heto-Holten A/S,  
Gydevang 17-19,  
3450 Allerød, Dänemark
- Heto-Holten A/S,  
Gydevang 17-19,  
3450 Allerød, Dänemark

Magnetrührgerät: **Heidolph** MR2002

Heidolph Instruments GmbH & Co.  
KG, Walpersdorfer Straße 12, 91126  
Schwabach

Mikroplattenphotometer: **Anthos** AR2001

Anthos Mikrosysteme GmbH,  
Kimplerstraße 290-292, 47807 Krefeld

Mikroplattenwascher: **Anthos** AW1

Anthos Mikrosysteme GmbH,  
Kimplerstraße 290-292, 47807 Krefeld

pH-Meter: **Knick** 761 calimatic

Knick Elektronische Messgeräte  
GmbH & Co., Beuckestraße 22, 14163  
Berlin

Pipetten: **Gilson** Pipetman div. Größen

Gilson International Deutschland, Otto-  
Hahn-Straße 17, 65520 Bad Camberg



Spektrophotometer: <b>Hitachi</b> U-2000	Hitachi Instruments, Inc., 3100 N. First Street, San Jose, CA 95134, USA
Sprühbox mit Ventilator: <b>Desaga</b> Nr. 124105	Desaga GmbH, In den Ziegelwiesen 9, 69168 Wiesloch
Ultraschallbad: <b>Bandelin</b> Sonorex RK 106	Bandelin Ultraschall Apparatebau GmbH, Heinrichstraße 3-4, 12207 Berlin
Vortex für Eppendorfcups: <b>Heidolph</b> Typ 54113	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Straße 12, 91126 Schwabach
Wasseraufbereitungssystem: <b>Millipore</b> Milli-Q Reagent grade water system	Millipore GmbH, Am Kronberger Hang 5, 65824 Schwalbach
Zentrifuge: <b>Heraeus</b> Megafuge 2.0R	Heraeus GmbH, Heraeusstraße 12-14, 63450 Hanau
Zerstäuber zum Aufsprühen von Reagenzien auf DC-Platten: <b>Preval</b> Sprayer 58 ml	Precision valva corporation, P.O. Box 309, Yonkers, NY 10702, USA

## **4.2      *Materialien***

### 4.2.1      Chemikalien

$\beta$ -Estradiol Minimum 98%	Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, 82041 Deisenhofen
--------------------------------	---

---

14-Desoxy-20-Hydroxyecdysone	Geschenk von Prof. René Lafont, UFR 927 der Université Pierre et Marie Curie, Bâtiment A, 7 Quai Saint Bernard, 75005 Paris, Frankreich
14-Desoxyecdysone	Geschenk von Prof. René Lafont, UFR 927 der Université Pierre et Marie Curie, Bâtiment A, 7 Quai Saint Bernard, 75005 Paris, Frankreich
1-Butanol zur Analyse	Merck KGaA, 64271 Darmstadt
20-Hydroxyecdysone	Geschenk von Prof. René Lafont, UFR 927 der Université Pierre et Marie Curie, Bâtiment A, 7 Quai Saint Bernard, 75005 Paris, Frankreich
2-Desoxy-20-Hydroxyecdysone	Geschenk von Prof. René Lafont, UFR 927 der Université Pierre et Marie Curie, Bâtiment A, 7 Quai Saint Bernard, 75005 Paris, Frankreich
2-Desoxyecdysone	Geschenk von Prof. René Lafont, UFR 927 der Université Pierre et Marie Curie, Bâtiment A, 7 Quai Saint Bernard, 75005 Paris, Frankreich
2-Succinyl-20-hydroxyecdysone gekoppelt an Peroxidase	Geschenk von Dr. Max De Reggi, Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, Frankreich

---

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA
Acetonitril ROTI®SOLV HPLC	Carl Roth GmbH&Co, 76185 Karlsruhe
Anti-Kaninchen-IgG aus Ziegen-Antiserum, Produkt-Nummer R2004	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA
Cortison, Minimum 98%	Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, 82041 Deisenhofen
d-Aldosteron, Minimum 98%	Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, 82041 Deisenhofen
DBL-2-Antikörper gegen Ecdysteroide vom Kaninchen	Bestände der AG Koolman (Pascual et al., 1995)
Diethylether Rotipuran $\geq 99,5\%$ p.a.	Carl Roth GmbH&Co, 76185 Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat-3-hydrat zur Analyse	Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, 82041 Deisenhofen
di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat zur Analyse	Merck KgaA, 64271 Darmstadt

---

Ecdyson	Geschenk von Prof. René Lafont, UFR 927 der Université Pierre et Marie Curie, Bâtiment A, 7 Quai Saint Bernard, 75005 Paris, Frankreich
Ethanol absolut zur Analyse	Riedel-de Haën Laborchemikalien GmbH & Co KG, 30926 Seelze
Ethylacetat zur Analyse	Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Hydrocortison Minimum 98%	Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, 82041 Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse	Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Methanol zur Analyse, Reag. ACS, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur.	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, 30926 Seelze
Natriumcarbonat wasserfrei zur Analyse	Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Natriumchlorid zur Analyse	Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat zur Analyse	Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Perhydrol 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zur Analyse	Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Progesteron Minimum 99%	Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, 82041 Deisenhofen
Rinderalbumin	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA

---

Schwefelsäure zur Analyse 95-97%	Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Testosteron	Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, 82041 Deisenhofen
Thimerosal, ca. 98% (HPLC) 2- (Ethylmercurimercapto)-benzoesäure Natriumsalz	Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, 82041 Deisenhofen
Titriplex (Ethylendinitrotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat) zur Analyse	Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Trichlormethan/Chloroform ROTIPURAN $\geq$ 99% p.a.	Carl Roth GmbH&Co, 76185 Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-2-hydrat pro analysi	Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Tween 20 rein (Poloxythylene sorbitan-M monolaurat)	Serva Feinbiochemica, Carl-Benz- Straße 7, 69115 Heidelberg
Vanillin DAB7	Merck KgaA, 64271 Darmstadt
Zitronensäure, wasserfrei	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA

## 4.2.2 Analysenmaterial

### DC-Platten:

- DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254, Art. 5715
- HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254, Art. 5629
- HPTLC-Platten Lichrospher Si 60 F-254s, Art. 1.15445
- Merck KgaA, 64271 Darmstadt
- Merck KgaA, 64271 Darmstadt
- Merck KgaA, 64271 Darmstadt

### Extraktionssäulen für die Probenvorbereitung:

- LiChrolut RP-18 (200 mg), Art. 1.02014
- SepPak Vac 3cc 200 mg C<sub>18</sub>, Art. WAT054945
- Merck KgaA, 64271 Darmstadt
- Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, MA 01757, USA

### HPLC-Säulen:

- Lichrospher 100 RP-18 (5 µm), Art. 1.16177
- Chromolith Performance RP-18e, Art. 1.02129
- Merck KgaA, 64271 Darmstadt
- Merck KgaA, 64271 Darmstadt

Mikrotiterplatten: **Nunc** F 96 Maxisorb

Nunc GmbH & Co. KG, Hagenauer  
Straße 21a, 65203 Wiesbaden

### 4.2.3 Andere Produkte

Bio-Magermilchpulver	Heirler Cennovis GmbH, 78303 Radolfzell
Ecdysten Russian Anabolic Compound Dietary Supplement	Thermo-Life International, San Carlos, CA 94070, USA
Kanülen für S-Monovetten 25mm, Ø0,8mm Art. 85.1373	Sarstedt, Postfach 12 20, 51582 Nümbrecht
S-Monovetten Kalium-EDTA, 4ml Art. 03.1068	Sarstedt, Postfach 12 20, 51582 Nümbrecht
S-Monovetten Lithium-Heparin, 9ml Art. 02.1065	Sarstedt, Postfach 12 20, 51582 Nümbrecht

## 5 Methoden

### 5.1 *Studiendesign*

Für die Durchführung des eigentlichen Experiments waren zahlreiche Vorversuche nötig.

Als erstes galt es festzustellen, welche zur Verfügung stehenden analytischen Methoden überhaupt für das Experiment geeignet sind. Ferner musste Klarheit darüber bestehen, welche Formen der Probenvorbereitung am wahrscheinlichsten zum späteren Erfolg führen könnten. Außerdem galt es, humane und Ecdysteroide analytisch zu charakterisieren, um hiernach spätere Analysen auszurichten bzw. Interferenzen frühzeitig zu erkennen. Für die quantitative Beurteilung war außerdem wichtig, die Nachweisgrenzen der unterschiedlichen Methoden zu kennen.

Es wurde zusätzlich vor dem Versuch noch eine Blutentnahme zur Bestimmung von Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff durchgeführt, um eine mögliche signifikante Einschränkung der Nierenfunktion des Probanden zu erkennen.

Den letzten Schritt vor dem Experiment stellte die Analyse des zur Verfügung gestellten 20E-haltigen Handelspräparates dar, um einerseits sicherzustellen, dass tatsächlich die angegebene Menge 20E im Präparat enthalten ist und andererseits auszuschließen, dass das Präparat mit anderen Steroiden verunreinigt ist.

Im eigentlichen Experiment wurde dem Probanden zum Zeitpunkt  $t=0$  Blut entnommen und jeweils eine Speichelprobe und eine Urinprobe gewonnen. Dann wurde eine Einmaldosis von zwei Kapseln des Handelspräparates Ecdysten gegeben, welche jeweils 10 mg 20E enthalten<sup>4</sup>. Bis  $t=12\text{h}$  wurden stündlich Urin- und Speichelproben gesammelt, später in wachsenden Intervallen. Blutproben wurden zum Zeitpunkt  $t=0$  und  $t=2\text{ h}$  entnommen, sie dienten weniger der Identifikation von Metaboliten, sondern sollten vielmehr im Falle eines fehlenden Ecdysteroid-Nachweises in Urin und Speichel als Nachweis einer quantitativ signifikanten enteralen Resorption dienen.

Ferner wurden die Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr dokumentiert. Dies hätte evtl. später auftretende analytische Artefakte aufklären können; denkbar sind unter anderem:

---

<sup>4</sup> Seit Anfang 2002 enthält das Fertigprodukt 15mg 20E pro Kapsel (vgl. Abb. 3-8)



- Nachweis falsch hoher Ecdysteroidmengen infolge Aufnahme von Ecdysteroiden aus Nahrungsquellen (Dinan, 2001)
- Störungen photometrischer Analysen durch UV-absorbierende Nahrungsmittel
- Konzentrations- oder Verdünnungsphänomene bei entsprechend starker Änderung des Trinkvolumens oder Aufnahme von diuretisch wirkenden bzw. flüssigkeitsretendierenden Substanzen

Tab. 5-1 zeigt den tatsächlichen zeitlichen Ablauf des Versuchs.

<b>Zeit</b>	<b>Urinprobe</b>	<b>Speichelprobe</b>	<b>Trinken [ml]</b>	<b>Essen</b>	<b>Sonstiges Ereignis</b>
<b>07. Mrz</b>	<b>Nr.</b>	<b>Nr.</b>			
09:45			200	1 Stück Kuchen, 1 Magermilchjoghurt	Blutentnahme 1
09:55	1	1	200	Belegtes Brot	
10:00			150	2 Kekse	Einnahme von 2 Kapseln Ecdysten [entspricht 20mg 20E] p.o.
11:00	2	2	50	2 Kekse	
12:00	3	3	300		Blutentnahme 2
13:00	4	4			
14:00	5	5	50	1 Pizza, 1 grüner Salat, 1 Kuchen, 1 Obstsalat	
15:00	6	6	200		
16:00	7	7			
17:00	8	8			
18:00	9	9		2 Kekse	
19:00	10	10	150	2 Kekse	
20:00	11	11			
22:00	12	12	200	Rotkohl, Spätzle, Salat	

<b>08. Mrz</b>					
07:00	13	-			
08:00	14	13	150	2 Stücke Kuchen	
10:00	15	14	50	2 Kekse	
12:00	16	15		2 Kekse	
14:00	17	16	200	Suppe, Rindfleisch, Kartoffeln, Rote Beete	
16:00	18	-			
20:00	19	17	200	Frühlingsrollen, Pilze, Birne, Schokolade	
23:00	20	-	100		
<b>09. Mrz</b>					
08:00	21	18	100	Joghurt, Kuchen	

Tab. 5-1: Zeitlicher Ablauf des Selbstversuches

## 5.2 Probengewinnung und -lagerung

### 5.2.1 Urinproben

Die Urinproben wurden unmittelbar nach dem Sammeln bei  $-70\text{ °C}$  tiefgefroren und schnellstmöglich einer Gefriertrocknung unterzogen. Zur Trockensubstanz wurden jeweils 20 ml Methanol zwecks Extraktion hinzugegeben, die Suspension wurde für 20 min ins Ultraschallbad gegeben bis makroskopisch keine Konkreme mehr sichtbar waren. Danach wurde für 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert, die flüssige Phase wurde gekühlt gelagert, die verbliebene Festsubstanz verworfen.

### 5.2.2 Speichelproben

Die Speichelproben (jeweils ca. 1 ml) wurden ebenfalls direkt nach dem Sammeln bei  $-70\text{ °C}$  tiefgefroren und schnellstmöglich einer Gefriertrocknung unterzogen. Zur verbliebenen Festsubstanz wurden jeweils 0,5 ml Methanol hinzugegeben. Nach

ca. 5 min im Ultraschallbad wurden die Proben für 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert, die flüssige Phase wurde gekühlt gelagert, die Festsubstanz wurde verworfen.

### 5.2.3 Blutproben

Die Blutprobe zur Bestimmung für Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff wurde mit einer Lithium-Heparin-S-Monovette entnommen und unmittelbar zur externen Analyse dem Zentrallabor des Klinikums der Philipps-Universität Marburg übersandt.

Die beiden Blutproben für die Ecdysteroid-Bestimmung wurden mit Kalium-EDTA-S-Monovetten gesammelt. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Monovetten für 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert und gleichzeitig auf 4°C gekühlt. Das Plasma wurde abpipettiert und bei -70°C gelagert.

## 5.3 *Präparative Methoden*

Die Analyse von biologischen Proben erfordert meist eine Präparation, um einerseits einer Schädigung der Geräte infolge bleibender Verunreinigungen vorzubeugen und um andererseits Ergebnisse zu erhalten, die möglichst arm an störenden Überlagerungen und somit gut interpretierbar sind.

Der Übergang zwischen Herstellung einer lagerungsfähigen Probe und Präparation ist mitunter fließend, dies wird an dem Beispiel der Lösung in einem organischen Lösungsmittel anschaulich, da dies die Probe zum einen konserviert, zum anderen aber auch Proteine, welche die Analyse stören, denaturiert. Diese tauchen dann als Festsubstanz auf, die verworfen wird.

### 5.3.1 Ausschütteln

Liegen in einem Gefäß zwei Lösungsmittel vor, die nach dem Umschütteln zwei Phasen bilden (z.B. Diethylether/Wasser), so ist bei gegebener Temperatur das Verhältnis der Konzentration eines bestimmten Stoffes in der Oberphase zu der in der Unterphase konstant (Nernstsches Verteilungsgesetz).

$$K = C_{\text{Oberphase}}/C_{\text{Unterphase}}$$

Somit kann man Steroide bei entsprechender Wahl der Lösungsmittel in der organischen Phase relativ anreichern, wobei sich Salze in der wässrigen Phase sammeln. Diese Methode ist wenig selektiv, jedoch einfach in der Anwendung.

### 5.3.2 Festphasenextraktion

Eine weitere Methode zur Präparation steroidhaltiger Proben ist die Festphasenextraktion. Das Prinzip der Festphasen-Extraktion beruht auf der Flüssigkeitschromatographie. Man macht sich eine starke, jedoch reversible Bindung zwischen dem Analyten und der Oberfläche einer stationären Phase zu nutze.

Die stationäre Phase liegt meist in Form von Kieselgel in einem kleinen Plastikröhrchen vor (Abb. 5-1). Nach Konditionierung der stationären Phase mit einem geeigneten Lösungsmittel wird die flüssige Probe aufgegeben. In einem folgenden Waschschriff können mit einem anderen Lösungsmittel die reversibel am Kieselgel gebundenen Substanzen abgewaschen (eluiert) werden. Zum Transport der Flüssigkeiten über die Säule kann ein leichtes Vakuum an ihrem unteren Ende angelegt werden. Im Wesentlichen unterscheidet man Normal-phase- und Reversed-phase-Festphasenextraktion.

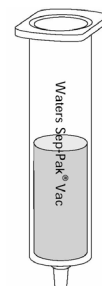


Abb. 5-1:

Kieselgelröhrchen zur Festphasenextraktion

Die Reversed-phase-Variante benutzt als Probenmatrix ein eher polares Lösungsmittel (in der Regel Wasser); das Kieselgel der Festphase ist mit Alkyl- oder Aryl-Seitenketten derivatisiert und somit eher apolar.

Diese Variante eignet sich für apolare bis mäßig polare Analyten. Sie bleiben über van-der-Waals-Kräfte an den Seitenketten der Festphase hängen. Nach dem Waschschriff mit dem Lösungsmittel der Probe kann mittels eines apolaren Lösungsmittels / Lösungsmittelgemisches der Analyt von der Säule entfernt werden.

Bei der Normal-Phase-Variante ist die Situation umgekehrt: Die Probenmatrix ist apolar, das Kieselgel der stationären Phase trägt polare funktionelle Gruppen. Die Bindung des eher polaren Analyten an die stationäre Phase findet über Interaktion der jeweils polaren Gruppen statt, so z.B. über Wasserstoff-Brückenbindungen. Eluiert wird mit einem stärker polaren Lösungsmittel als das der Probenmatrix.

Handelt es sich bei den Analyten um Steroide, so ist die Reversed-Phase-Variante vorzuziehen (Steroide des Menschen: Supelco Bulletin, 1998; Ecdysteroide: Lafont und Beydon, 1988).

Die Festphasenextraktion ist wesentlich selektiver als das Ausschütteln, jedoch kostenintensiver und aufwändiger in der Handhabung. Sie kann auch mit dem Ausschütteln kombiniert werden, wobei zuerst auszuschütteln ist.

## 5.4 Analytische Methoden

### 5.4.1 Photometrie

Die Photometrie beruht auf dem Gesetz von Beer-Lambert, welches besagt, dass die Extinktion von Licht von der Konzentration der absorbierenden Substanz in einer Lösung und der durch diese Lösung zurückgelegten Wegstrecke abhängig ist:

$$E = \varepsilon_{\gamma} \cdot c \cdot l$$

$E$  ist hierbei die Extinktion,  $\varepsilon_{\gamma}$  der für den Stoff und die angewandte Wellenlänge spezifische Extinktionskoeffizient,  $c$  die Konzentration des zu testenden Stoffes und  $l$  die Länge, die das Licht durch die zu testende Lösung zurücklegen muss.

Die Wellenlänge, bei der ein Stoff am stärksten absorbiert, ist von seiner molekularen Struktur abhängig; die hierfür verantwortlichen Bindungen bzw. Gruppen werden Chromophore genannt. Bei den Steroiden sind dies vor allem C=C und C=O-Doppelbindungen, ihre maximale Extinktion liegt meist zwischen 200 und 300 nm (UV-Bereich) (Nes und McKean, 1977). Viele Ecdysteroide haben bei 242 nm ihr Extinktionsmaximum, es handelt sich hier um eine 14 $\alpha$ -hydroxy-7-en-6-on-Chromophore (s. Abb. 5-2; Dinan, 2001).

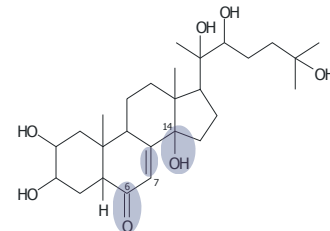


Abb. 5-2: Chromophore des 20E

Nachteile der Photometrie sind ihre mangelnde Eignung für die Analyse von Stoffgemischen und die schwache Sensitivität herkömmlicher Geräte. Große Vorteile der Photometrie sind einfache Anwendbarkeit, gute Reproduzierfähigkeit und geringe Kosten.

Die Photometrie ist somit in diesem Kontext nur für die Charakterisierung bekannter Substanzen geeignet.

#### 5.4.2 Dünnschichtchromatographie (DC) / High-performance-thin-layer-chromatography (HPTLC) / Färbereaktionen

Die Dünnschichtchromatographie stellt sowohl eine analytische als auch eine semipräparative Methode dar, wobei im Rahmen dieser Arbeit nur der analytische Gesichtspunkt eine Rolle spielt.

Die Dünnschichtchromatographie besteht aus einer stationären und einer mobilen Phase. Die stationäre Phase stellt eine dünne Schicht Kieselgel dar, die auf einer Glas-, Aluminium- oder Kunststoffplatte aufgebracht ist. Die mobile Phase ist ein flüssiges Laufmittel, welches über die stationäre Phase infolge der Kapillarkräfte wandert.

Die Proben werden in flüssiger Form in der Nähe des unteren Endes der Platte aufgetragen und nach Trocknung in eine spezielle Kammer gestellt, an deren Boden das Laufmittel steht. Das Laufmittel steigt dann an der Platte nach oben und transportiert die verschiedenen zu analysierenden Substanzen unterschiedlich schnell, was in der verschiedenen Stärke der reversiblen Bindung der Analyten an die stationäre Phase begründet ist. Die Chromatographie gilt als beendet, wenn das Laufmittel den oberen Rand der Chromatographieplatte *fast* erreicht hat.

Das chromatographische Verhalten einer Substanz wird durch den  $R_f$ -Wert definiert:

$$R_f = \text{Wanderungsstrecke der Substanz} / \text{Wanderungsstrecke des Laufmittels}$$

Der  $R_f$ -Wert ist spezifisch für die zu analysierende Substanz und für die Art der mobilen und stationären Phase.

Die Dünnschichtchromatographie kann als Normal-phase durchgeführt werden, wobei die stationäre Phase meist aus  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Cellulose oder Cellulosederivaten besteht oder aber als Reversed-phase-Chromatographie, die unter anderem für die Steroidanalyse häufig verwendet wird (Nes und McKean, 1977). Bei ihr besteht die stationäre Phase meist aus mit Kohlenwasserstoffketten derivatisiertem  $\text{SiO}_2$ , sie ist also im Gegensatz zur Normal-Phase-Chromatographie apolar.

Es existieren Weiterentwicklungen der DC, die sich durch kleinere Körnchengrößen der stationären Phase und somit besseres Trennverhalten auszeichnen. Es wird in diesem Zusammenhang auch von der High-performance-thin-layer-chromatography (HPTLC) gesprochen.

Für die mobile Phase werden üblicherweise Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische verwendet, deren Zusammensetzung für ein bestimmtes Trennproblem meist nach Versuch und Irrtum optimiert wird (Pingoud und Urbanke, 1997).

Problem der Dünnschichtchromatographie ist, dass die meisten zu analysierenden Stoffe in der vorhandenen Konzentration optisch nicht ausreichend hervortreten. Dieses Problem kann unter anderem durch die Verwendung von Färbereaktionen gelöst werden. Für die Steroide gelten folgende Färbereaktionen als geeignet:

- Die Platte kann mit 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> besprüht werden und auf 100 °C erhitzt werden, hierdurch werden Steroide zersetzt und erscheinen dunkelbraun. Nachteil dieser Färbereaktion ist jedoch ihre ungenügende Spezifität, da die meisten ungesättigten Heteroatom-haltigen organischen Verbindungen so reagieren.
- Selektiver für Steroide ist die Reaktion mit in Schwefelsäure gelöstem Vanillin als Sprühreagenz (Lafont und Beydon, 1988).

Eine Verwendung von radioaktiv markierten Substanzen in Verbindung mit einem geeigneten Scanner scheidet beim Versuch am Menschen aus ethischen Gründen aus.

Eine weitere Möglichkeit, um kleinere Steroidmengen besser sichtbar zu machen, ist die Verwendung von DC-Platten mit Fluoreszenzindikator. Hierfür geeignet sind solche Indikatoren, die bei UV-Licht von 254 nm Wellenlänge zum Fluoreszieren angeregt werden. Liegt auf der Platte eine Substanz vor, die in diesem Bereich Licht absorbiert, erscheint diese auf der Platte bei Betrachtung unter einer entsprechenden UV-Lampe als dunkler Fleck. Die so beschichteten Platten sind gut geeignet zum Nachweis vieler Steroidhormone (vgl. 5.4.1).

Probleme der Dünnschichtchromatographie sind die mäßige Sensitivität (je nach verwandter Färbereaktion), die mangelhafte Quantifikation und ihre Störanfälligkeit, was eine Reproduktion der Ergebnisse oft erschwert.

Auf eine Probenvorbereitung kann häufig verzichtet werden, was zusammen mit dem Kostenfaktor ein Vorteil der Methode ist.

Grundsätzlich kann man sagen, dass die DC heutzutage im analytischen Kontext infolge der Entwicklung anderer überlegenerer Methoden allenfalls orientierenden Charakter hat.

### 5.4.3 High performance liquid chromatography (HPLC)

Die HPLC ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei der sich die stationäre Phase in einer Säule befindet, die mobile Phase mit hohem Druck und hoher Durchflussgeschwindigkeit (in der Regel 1-4 ml/min) über die Säule läuft und die in ihr gelösten Substanzen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit mitnimmt. Dieses Phänomen erklärt sich durch unterschiedlich starke, reversible Bindungen der Analyten an die stationäre Phase der Säule.

Die Zeit, die eine bestimmte Substanz vom Eintritt in das System bis zum Erscheinen im Detektor braucht, wird als Retentionszeit (RT) bezeichnet. Sie ist spezifisch für das System, die Methode und die Substanz.

Die stationäre Phase kann polar (so genannte Normal-phase-HPLC) oder apolar sein (Reversed-phase-HPLC), ferner existieren Säulenfüllungen im Zwischenbereich.

Die mobile Phase kann als konstantes Lösungsmittelgemisch vorliegen (isokratische Elution) oder im Laufe einer Trennung variieren (Gradientenelution). Die Probensubstanzen können mit unterschiedlichen Methoden detektiert werden. Abb. 5-3 zeigt den allgemeinen Aufbau einer HPLC-Anlage.

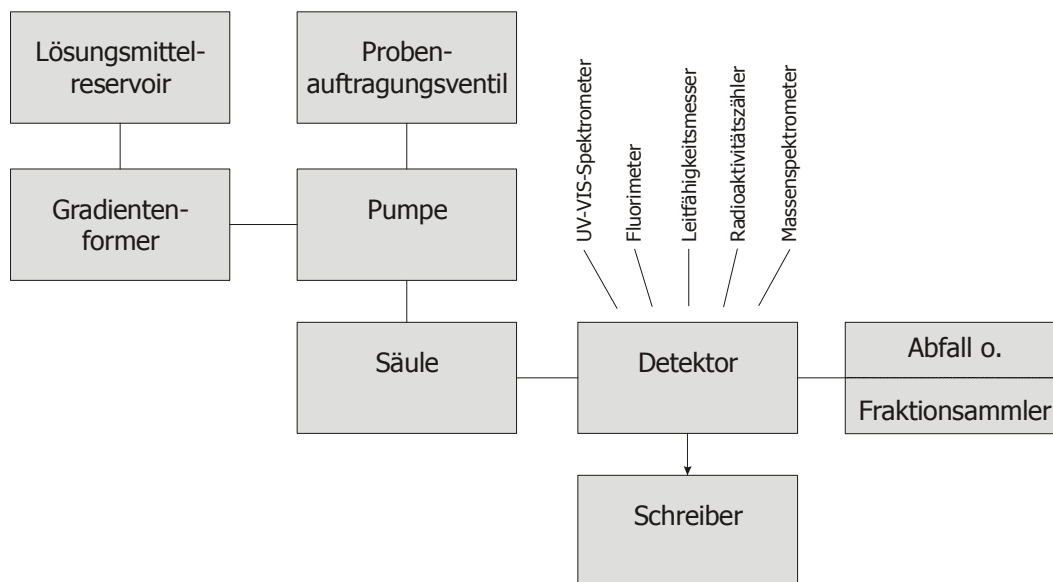


Abb. 5-3: Allgemeiner Aufbau der HPLC, modifiziert nach Pingoud und Urbanke, 1997

Für die Trennung und Analyse von steroidhaltigen biologischen Proben konnten sich weitgehend Methoden mit Reversed-phase-Säulen durchsetzen, wobei die Detektion häufig mittels UV-Photometrie durchgeführt wird (Merck applications, 2001; Lafont und Beydon, 1988).



Nachteilig sind die zwingende Aufbereitung biologischer Proben und die hohen Anschaffungskosten der Technik zu erwähnen.

Vorteile sind die einfache Handhabung, die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und vor allem der Nachweis von Steroidmengen bis in den Nanogrammbereich.

#### 5.4.4 Enzym-Immunoassay (EIA)

Das Prinzip des EIAs ist eine kompetitive Bindung. Bei ihr konkurrieren die zu bestimmenden Substanz (Ligand) und eine ähnliche Substanz, die enzymgekoppelt ist (sog. Tracer), um Bindungen mit vorgeformten Antikörpern. Je nach Menge der zu bestimmenden Substanz stellt sich ein bestimmtes Gleichgewicht zwischen den AK-fixierten Substanzen ein. Die Lage dieses Gleichgewichts bestimmt das Ausmaß der enzymatischen Aktivität durch den an den Antikörpern gebundenen Tracer.

Bei niedriger Konzentration der zu bestimmenden Substanz wäre die enzymatische Aktivität durch ein Überwiegen des Tracers hoch und umgekehrt. Die enzymatische Aktivität kann durch Zugabe eines geeigneten Substrates mittels einer Färbereaktion sichtbar gemacht werden und photometrisch durch Vergleich mit internen Standards quantifiziert werden. Abb. 5-4 zeigt das Funktionsprinzip des in dieser Arbeitsgruppe angewandten EIAs für Ecdysteroide.

Als erster Arbeitsschritt werden die Vertiefungen der Microtiterplatten (Wells) mit Antikörpern gegen Antikörper der Klasse IgG von Kaninchen beschichtet (Coating). Im zweiten Arbeitsschritt werden die Proben bzw. Standards, der Tracer und die Anti-Ecdysteroid-AK<sup>5</sup> in die Wells gegeben. Nach einigen Stunden Inkubationszeit sind die Komplexe aus Anti-Ecdysteroid-AK und Ecdysteroid (Ecdysteroid der Probe oder Tracer) an den Anti-IgG-AK an der Wand der Wells gebunden. Nach Spülen der Wells wird die Indikatorlösung (enthält Wasserstoffperoxid und TMB als Chromogen) in die Wells gegeben. Das Enzym Peroxidase des Tracers wandelt nun Wasserstoffperoxid und TMB zu Wasser und einem blauen Farbstoff um. Als letzter Schritt wird die Reaktion mit 2 M Schwefelsäure gestoppt, wodurch die Färbung nach gelb umschlägt.

---

<sup>5</sup> DBL-2-AK vom Kaninchen, vgl. Pascual et al., 1995

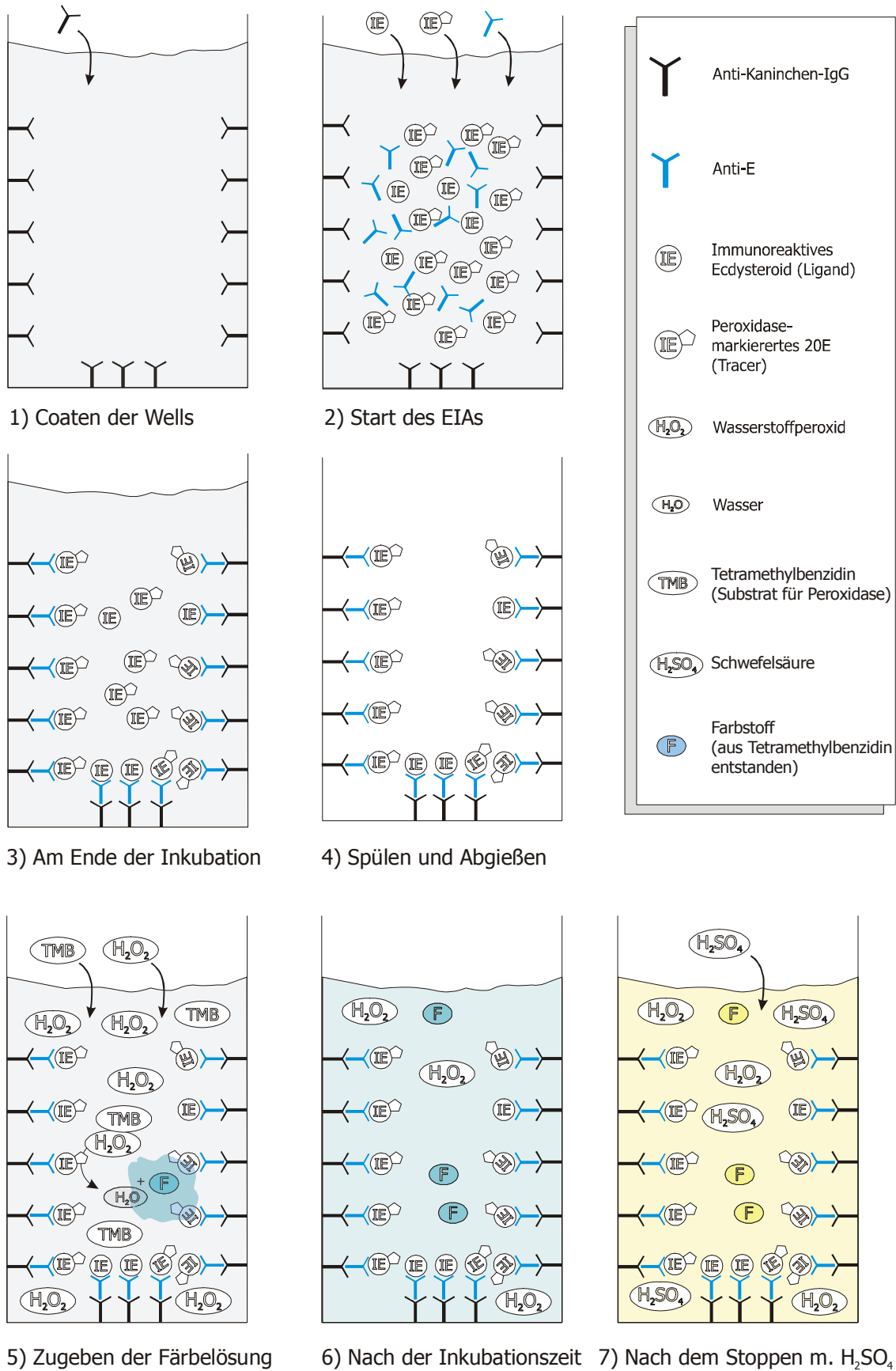


Abb. 5-4: Prinzip des Ecdysteroid-EIAs

Die generellen Vorteile des EIAs liegen in der guten bis sehr guten Spezifität (abhängig vom Antikörper) und in seiner hervorragenden Sensitivität (für die hier angewandte Methode mit Ecdysteroiden bis in den Picogrammbereich). Weiterer Vorteil ist, dass die Proben meist keiner aufwendigen Vorbereitung unterzogen werden müssen, lediglich müssen sie in einem wässrigen Medium vorliegen, da organische Lösungsmittel die AK denaturieren würden.

Nachteil der Methode ist die lange Zeitspanne zwischen erster Idee und endgültiger Etablierung. Ferner ist der EIA anfällig gegen kleinste Veränderungen der Konzentration der verwendeten Chemikalien, auch kann seine Qualität durch Umwelteinflüsse wie Temperatur und Lichteinstrahlung beeinflusst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Anwendung des EIAs nach folgender Vorschrift verfahren:

#### 1. 1M Phosphatpuffer herstellen

- 45,65 g Dikaliumhydrogenphosphat · 3H<sub>2</sub>O in 200 ml Aqua dest. lösen
- 6,81 g Kaliumdihydrogenphosphat in 50 ml Aqua dest. lösen
- Die zweite Lösung in die erste titrieren bis pH 7,4 erreicht ist
- 0,1% Thiomerosal hinzugeben zur Stabilisierung
- *Anm.: Diese Lösung ist ca. ein Monat lang haltbar, ihre Haltbarkeit ist durch Einfrieren jedoch verlängerungsfähig.*

#### 2. Sättigungspuffer herstellen

- Folgende Substanzen auf 100 ml Aqua dest. auffüllen:
  - 10 ml des Phosphatpuffers
  - 2,34 g NaCl
  - 0,037 g Titriplex EDTA
  - 1 g Milchpulver
- *Anm.: Der Puffer wurde stets sofort verwendet und nicht gelagert.*

### 3. Waschpuffer herstellen

- Folgende Substanzen auf 1 l Aqua dest. auffüllen
  - 10 ml 1M Phosphatpuffer
  - 0,5 ml Tween 20
  - *Anm.: Der Puffer wurde stets sofort verwendet und nicht gelagert.*

### 4. Coaten der Platten

- 2 mg des Anti-Kaninchen IgG-Antikörpers in 15 ml des Phosphatpuffers und 285 ml destilliertem Wasser lösen (=6,67 µg/ml)
- Titrieren von je 200 µl in jedes Well der Mikroplatten, Abdecken der Platten und Inkubation über 24 Stunden
- Spülen der Platten mit Waschpuffer
- Einfüllen von je 200 µl Sättigungspuffer pro Well, Abdecken der Platten, Lagerung bei +4 °C
- *Anm.: Die so hergestellten Platten können über Monate verwendet werden, sollten jedoch mindestens 12 Stunden inkubieren.*

### 5. Aufgeben der Proben

- Auftragen der Proben nach dem Schema in Tab. 5-2
- Die Felder A1/A2 dienen als Referenzleerwert für die spätere photometrische Messung und nicht mit Proben befüllt.
- B1/B2 erfassen die unspezifische Bindung, somit den Anteil des Tracers, der an die Anti-Rabbit-IgG-AK haftet, anstatt an den Anti-Ecdyson-AK.
- C1/C2 erfassen die maximale enzymatische Aktivität des jeweiligen EIAs. Hier liegt der Tracer im Überschuß gegenüber den Anti-E-AK vor.
- D1-H2 und A3-C4 sind die quantitativen Standards für 20E. Unter der Vorstellung, dass 20E das einzige immunoreaktive Steroid in den zu analysierenden Proben ist, kann hierdurch ein quantitativer Rückschluß auf die Menge von 20E in den Proben gezogen werden. In allen anderen Fällen ist dieser Rückschluss allenfalls semiquantitativ.
- Die übrigen Felder stehen für die biologischen Proben zur Verfügung.

6. Inkubation für mindestens 6 Stunden bei Raumtemperatur und Lichtschutz
7. Herstellen des Färbepuffers
  - In 80 ml Aqua dest. lösen:
    - 1,47 g Tri-Natriumcitrat-2-hydrat
    - 0,78 g Di-Natriumhydrogenphosphat · 2H<sub>2</sub>O
  - Mit Zitronensäure auf pH 5,5 einstellen und auf 100 ml auffüllen
  - *Anm.: Der Färbepuffer kann einige Wochen gekühlt gelagert werden.*
8. Herstellung der Färberagenz
  - 2,5 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in 0,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) lösen
  - Diese Mischung in 20 ml Färbepuffer lösen, 10 µl Wasserstoffperoxid hinzugeben und sofort verwenden
  - *Anm.: Färbereagenz muss in Polypropylen-Gefäßen (kein Glas!) angesetzt und sofort verbraucht werden!*
9. Waschen mit Waschpuffer (s. 3.)
10. Befüllen der Wells mit je 150 µl Färbereagenz (s. 8.), Inkubation unter Lichtschutz für 30 Minuten
11. Stoppen der Färbereaktion durch Zugabe von je 50µl 2M Schwefelsäure pro Well
12. Messen der Absorption bei 450 nm, als Referenzwellenlänge zum Abfangen von Verfälschungen durch unspezifische Absorption wird 620 nm verwendet
13. Die Absorptionswerte der Standards werden in ein Diagramm eingetragen (s. Beispiel in Abb. 5-5). Zwischen den Messpunkten wird interpoliert, Verfälschungen durch Mess-Ausreißer mittels einer polynomischen Trendlinie vermindert. Die Ecdysteroid-Mengen in den biologischen Proben werden grafisch aus dem Standarddiagramm ermittelt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Leerwert = nur Färbereagenz	Leerwert = nur Färbereagenz	S-6 1810 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	S-6 1810 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	6	6	14	14	22	22	30	30
<b>B</b>	Unspez.Bdg 100 µl Puffer +50 µl Tracer	Unspez.Bdg 100 µl Puffer +50 µl Tracer	S-7 3625 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	S-7 3625 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	7	7	15	15	23	23	31	31
<b>C</b>	Max. Bdg. (je 50 µl Puffer, Tracer, Antiserum)	Max. Bdg. (je 50 µl Puffer, Tracer, Antiserum)	S-8 7250 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	S-8 7250 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	8	8	16	16	24	24	32	32
<b>D</b>	S-1 56 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	S-1 56 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
<b>E</b>	S-2 112 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	S-2 112 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
<b>F</b>	S-3 225 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	S-3 225 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
<b>G</b>	S-4 450 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	S-4 450 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
<b>H</b>	S-5 900 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	S-5 900 pg 20E in 50µl +50 µl Tracer +50 µl Antiserum	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37

Tab. 5-2: Pipettierschema der EIAs

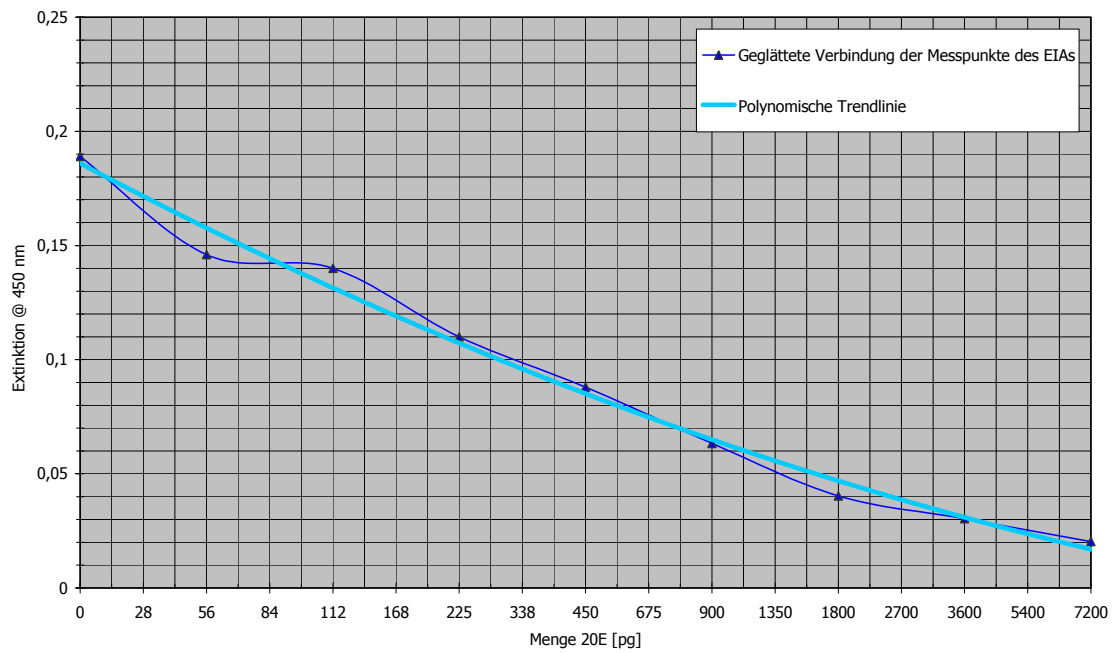


Abb. 5-5: Standardkurve für 20E im EIA

#### 5.4.5 Externe Analyse der Urinproben mittels HPLC und Massenspektrometrie (LC/MS)

Die LC/MS verbindet die HPLC als Trennsystem (auf das Prinzip wurde in 5.4.3 eingegangen) mit der Massenspektrometrie, die es ermöglicht, die per HPLC aufgetrennten Substanzen unmittelbar zu charakterisieren. Ein neuerer Artikel bestätigt die Bedeutung der LC/MS-Analyse bei der Identifikation von Ecdysteroiden, insbesondere in Verbindung mit dem hier verwendeten Trennprinzip (Le Bizec et al., 2002).

Für die HPLC wurde ein RP-18-System verwendet, das in seinen Trenneigenschaften prinzipiell denen der im eigenen Labor verwendeten HPLC entspricht (Pumpe: PE LC-200 Micro-Pump (PE Sciex, Foster City, CA, USA); Säule: 50x2.1mm 5µm HyPURITY ADVANCE (Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA, USA)). Ausgegangen wurde von einer mobilen Phase mit 10% Acetonitril, dieses Gemisch wurde für eine Minute gehalten. Binnen neunzehn Minuten wurde der Acetonitril-Gehalt um 80% erhöht, so dass nach zwanzig Minuten der Acetonitril-Gehalt in der mobilen Phase 90% betrug. In einem späteren Auftrag wurde die HPLC-Methode geändert, hier wurde in 9 Minuten der Acetonitril-Gehalt von 10% auf 90% erhöht. Ergebnisse der langsamen Methode sind mit einem „a“ in der Abbildung gekennzeichnet, solche der schnellen Methode mit einem „b“. Die Flussrate bei beiden Methoden betrug 150 µl/min.

Prinzip der Massenspektrometrie ist, aus neutralen Substanzen Ionen zu erzeugen und diese nach Masse und Ladung zu trennen. Mittels eines Registrierungssystems können die aufgetrennten Ionen dann quantitativ und qualitativ erfasst werden. Bei dieser Methode wird der Analyt zerstört, ein wesentlicher Unterschied zu den bisher dargestellten Methoden

Somit besteht ein Massenspektrometer im Allgemeinen aus drei Komponenten:

##### **Ionisierungsquelle, Massentrennsystem und Detektionssystem.**

Für den Ionisierungsprozess stehen vielfältige Methoden zur Verfügung, das externe Labor führte eine chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) durch (Heated nebulizer ion source (PE Sciex, Foster City, CA, USA)). Unter atmosphärischen Bedingungen wird hierbei das Eluat aus der HPLC mit Luft vermischt und verdampft. Die Moleküle der Luft und des verwendeten Lösungsmittels werden durch elektrische

Entladung einer Korona-Nadel ionisiert. Diese reagieren wiederum mit den Analyten und ionisieren diese (s. Abb. 5-6). In dieser Form kann der Analyt der Massenspektrometrie zugeführt werden. Zu beachten ist, dass das entsprechende Ion im Molekulargewicht um eine Einheit zunimmt infolge der Protonierung.

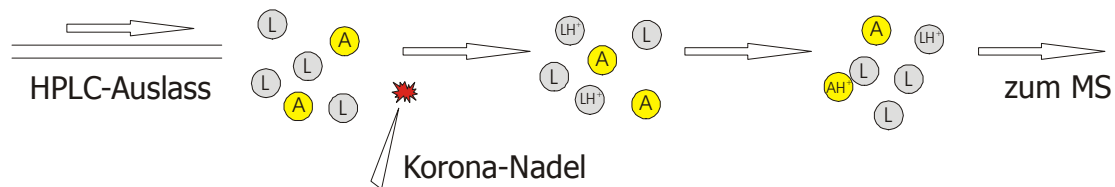


Abb. 5-6: Prinzip der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI);

*L=Lösungsmittel, A=Analyt*

Als Massentrennsystem stand ein Triple-Quadrupolmassenanalysator (API 3000 LC/MS/MS System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) zur Verfügung. Ein Quadrupol besteht aus vier stabförmigen Metallelektroden, die wie ein Massenfilter wirken, das unter vorgegebenen Bedingungen nur Ionen eines bestimmten Massen-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) passieren lässt. Durch Variation der Spannungen über den zwei Elektrodenpaaren lassen sich in zwei Ebenen Filterfunktionen realisieren. Wenn die Flugrichtung der Analyten zum Detektor als z-Achse definiert ist, so lassen sich in der xz-Ebene und in der yz-Ebene Ionen herausfiltern. Somit kann man gleichzeitig höhere und niedrigere Massenbereiche als den gewünschten ausblenden. Im Triple-Quadrupol-Massenanalysator sind drei solcher Systeme hintereinandergeschaltet. Der erste Quadrupol selektiert Ionen *einer* bestimmten Masse zur Analyse. Der zweite Quadrupol hat keine massenselektierende Funktion, er fungiert lediglich als „Tunnel“. Jedoch findet hier die Fragmentierung der eingangs selektierten Ionen statt. Im dritten Quadrupol werden die so erhaltenen Fragmente gefiltert und anschließend detektiert.

In der Kopplung einer HPLC mit einem Triple-Quadrupol-Massenanalysator sind unter anderem folgende Analysenmethoden möglich:

- Trennung eines Substanzgemisches im Sinne einer konventionellen HPLC, wobei jedoch nicht per UV-Absorption detektiert wird sondern mittels genereller Ionenzählung (sog. total ion current = TIC).
- Trennung eines Substanzgemisches im Sinne einer konventionellen HPLC mit einer Massenselektivität (sog. selected ion monitoring = SIM)



- Trennung eines Substanzgemisches im Sinne einer konventionellen HPLC mit einer Massenselektivität und nachfolgender Fragmentierung des so isolierten Produkts (sog. MS/MS, product ion mode<sup>6</sup>)

Für die Analyse der Ecdysteroid-Standards fanden SIM und MS/MS Anwendung. Für die Analyse der biologischen Proben wurden die Methoden TIC, SIM und MS/MS verwendet.

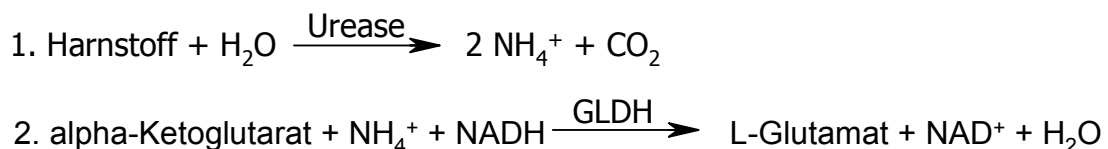
Für die SIM-Methode wurden Massen verwendet, die entweder bisher beschriebenen Ecdysteroid-Metaboliten entsprachen oder die einfachen metabolischen Reaktionen wie Hydroxilierung, Dehydroxilierung, Hydrierung, Dehydrierung etc. entsprechen. Von den Maxima der SIM-Analyse wurden MS/MS-Ausschriebe angefertigt.

Die Optimierung der Methode bzgl. der Parameter der Ionenquelle und des Massenanalysators erfolgte durch Dr. Horst Schweer in der Kinderklinik der Philipps-Universität Marburg.

#### 5.4.6 Externe Analyse der Serumwerte für Harnstoff und Kreatinin

Die Analysen der Nierenretentionsparameter zur Sicherstellung einer ausreichenden Nierenfunktion des Probanden für das Experiment fanden im Zentrallabor des Klinikums der Philipps-Universität Marburg unter Verwendung von etablierten Methoden statt.

Die Harnstoff-Bestimmung erfolgte mittels eines für klinisch-chemische Analysenautomaten entwickelten Sets nach der Urease-GLDH-Methode (UREA/BUN für klinisch-chemische Analysenautomaten (Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim)). Es handelt sich hierbei um einen kinetischen UV-Test. Der Probe werden Puffer, Enzyme und Substrate zugegeben, worauf zwei Reaktionen stattfinden:

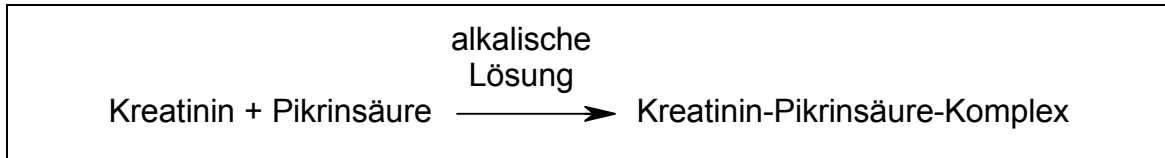


Der Extinktionsabnahme durch den Verbrauch von NADH wird kinetisch gemessen.

---

<sup>6</sup> im Verlauf nur als MS/MS bezeichnet, gemeint ist immer der product ion mode

Die Kreatininbestimmung erfolgte ebenfalls mittels eines Sets, das für klinisch-chemische Analysenautomaten entwickelt wurde (CREA für klinisch-chemische Analysenautomaten (Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim)). Der Test basiert auf der Methode nach Jaffé:



Der Kreatinin-Pikrinsäure-Komplex färbt die Lösung gelb-orange. Die Intensität der Färbung (direkt proportional zur Kreatinin-Konzentration) wird per Photometer kinetisch gemessen.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 *Analysen relevanter humaner Steroide und bekannter Ecdysteroide als Reinsubstanzen*

Folgende Steroide wurden analysiert:

#### **Humane Steroide:**

- Aldosteron
- Cortisol
- Cortison
- Estradiol
- Progesteron
- Testosteron
- *Anm.: Auf eine Bestimmung von Calcitriol wurde wegen der unverhältnismäßig hohen Kosten verzichtet. Die Zuverlässigkeit der Analysen der anderen humanen Steroide erlaubt es, für spätere Überlegungen den Literaturwert zu übernehmen.*

#### **Ecdysteroide:**

- 20E und E
- 14dE und 14d20E
- 2dE und 2d20E
- Inokosteron
- Makisteron
- Ponasteron
- Muristeron

### 6.1.1 Photometrie

Die reine Photometrie eignet sich kaum für die Analyse von Stoffgemischen, jedoch ist sie zur Analyse von Reinsubstanzen gut geeignet. Dies ist nützlich, um sich über den günstigsten Wellenlängenbereich bei der photometrischen HPLC-Analyse klar zu werden.

Zur Analyse im Spektrometer wurden von einigen Steroiden 50 µg kristalline Substanz in jeweils 1 ml Methanol gelöst. Ihre Extinktion wurde in Quarzküvetten im Spektrometer zwischen 220 und 300 nm Wellenlänge gemessen. Abb. 6-1 zeigt die entsprechenden Spektren, Tab. 6-1 die quantitativen Auswertungen einschließlich der Literaturwerte.

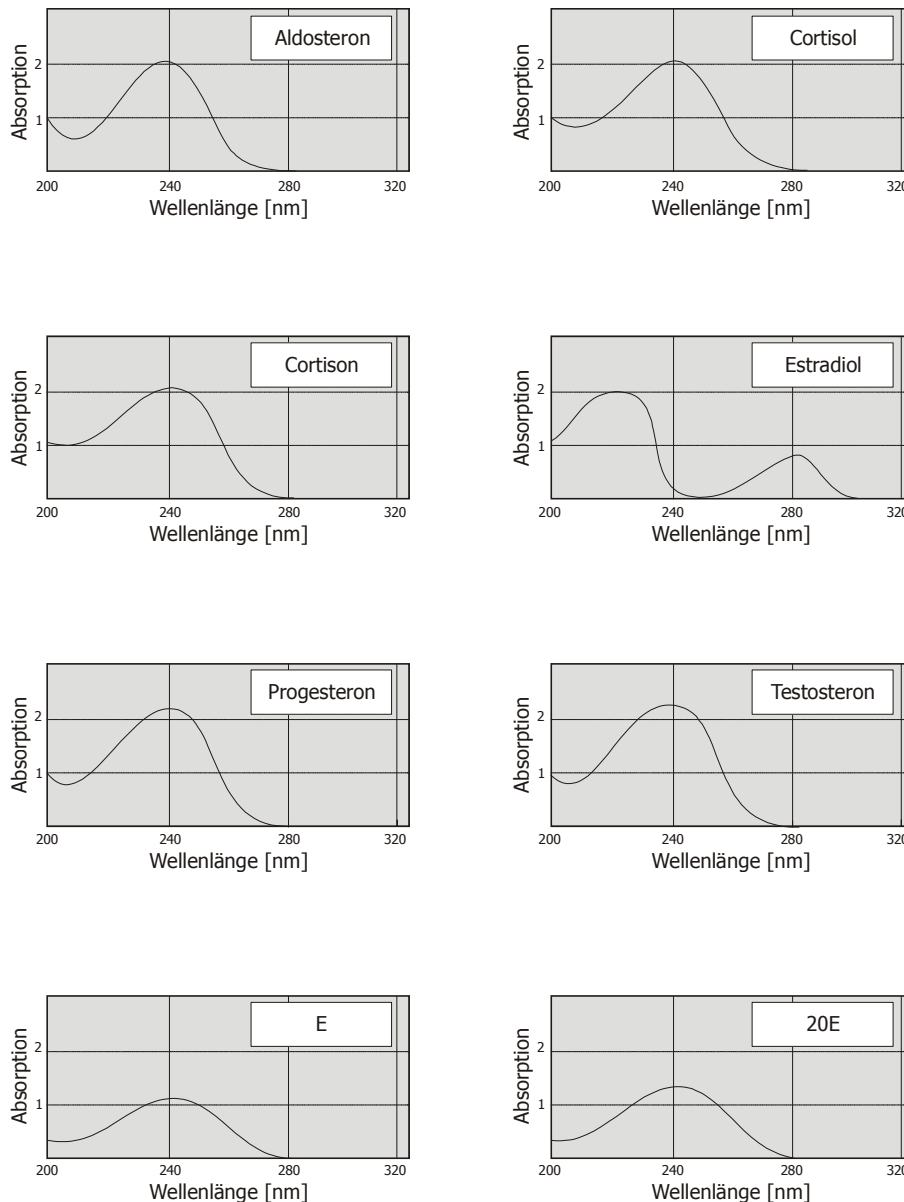


Abb. 6-1: UV-Spektren einiger Steroide

	Molmasse (g/mol)	Extinktions- maximum [nm Wellenlänge]	Extinktions- maximum [nm Wellenlänge] <i>Literaturwert</i>	Extinktions- koeffizient [l/mol×cm]	Extinktions- koeffizient [l/mol×cm] <i>Literaturwert</i>
<b>Aldosteron</b>	360,5	239	240	14.800	15.000
<b>Calcitriol</b>	416,6	n. gemessen	264	n. gemessen	19.000
<b>Cortisol</b>	362,5	241	242	14.750	16.000
<b>Cortison</b>	360,5	239	237	14.500	14.000
<b>Estradiol</b>	272,4	281; 223	272; 239	2240; 5520	1.900; k.A.
<b>Progesteron</b>	314,5	239	240	13.900	16.600
<b>Testosteron</b>	288,4	238	238	12.800	15.100
<b>20E</b>	480	242	242	11.190	12.400
<b>E</b>	464	242	240	12.470	12.677

Tab. 6-1: Extinktionsmaxima und Extinktionskoeffizienten ausgewählter Steroide

Quellen der Literaturwerte:

- 1) Aldosteron, Calcitriol, Cortisol, Cortison: O'Neil et al., 2001
- 2) Estradiol, Progesteron, Testosteron: Dawson et al., 1972
- 3) 20E, E: Lafont und Wilson, 1996

Sowohl die Spektren als auch die Extinktionskoeffizienten zeigen, dass sich Ecdysteroiden und humane Steroide im Bereich der Photometrie ähnlich sind. Der Literatur zu Folge betragen die Ausscheidungsraten für einzelne Steroidhormone bis zu mehrere mg pro Tag im Urin (Gower, 1975). Störende Überlagerungen sind aus diesem Gesichtspunkt nicht auszuschließen.

Hinsichtlich der Nachweisgrenze der Photometrie gilt, dass Ecdysteroidkonzentrationen von ca. 10 µg/ml noch nachweisbar wären, gesetzt der Fall die Probe ist rein (hypothetische Extinktion: 0,25).

### 6.1.2 DC

Für die Dünnschichtchromatographie wurden verschiedene Platten getestet (konventionelle DC-Platten, neuere HPTLC-Platten, Normal- und Reversed-phase-Platten). Für den Nachweis von Steroiden schienen Lichrospher® Si-60 HPTLC-Platten mit Fluoreszenzindikator (254 nm) am günstigsten zu sein. Beim Laufmittel wurde für die Analyse der Reinsubstanzen ein Chloroform/Ethanol-Gemisch im Verhältnis 80:20 verwendet. Diese Methode beruht auf den bisherigen Erfahrungen der Arbeitsgruppe.

10 µg von E, 20E und einigen humanen Steroiden wurden auf eine DC-Platte aufgetragen (gelöst in jeweils 5 µl Methanol).

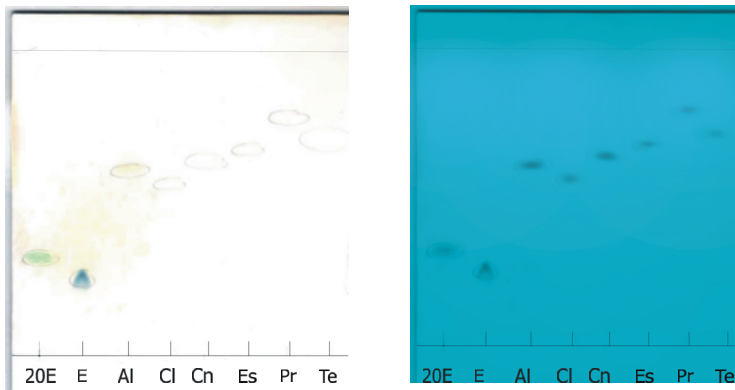


Abb. 6-2: DC einiger Steroide, links nach  $H_2SO_4$ -Vanillin-Behandlung, rechts bei Betrachtung unter UV-Licht der Wellenlänge 254nm  
 Al=Aldosteron, Cl=Cortisol, Cn=Cortison, Es=Estradiol,  
 Pr=Progesteron, Te=Testosteron

Steroid	R <sub>f</sub> -Wert
Aldosteron	0,56
Cortisol	0,52
Cortison	0,59
Estradiol	0,65
Progesteron	0,73
Testosteron	0,65
20E	0,23
E	0,31

Tab. 6-2: R<sub>f</sub>-Werte einiger Steroide

Abb. 6-2 zeigt die DC-Platten, Tab. 6-2 fasst die R<sub>f</sub>-Werte zusammen. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden noch Verdünnungsreihen mit 20E hergestellt und nach o.a. Methode Dünnschichtchromatographien angefertigt. Beim Farbnachweis mit der Vanillin- $H_2SO_4$ -Reagenz konnten bis 500 ng 20E, unter UV-Betrachtung bis zu 200 ng 20E eben noch nachgewiesen werden.

### 6.1.3 HPLC

Die Methodik der HPLC ließ sich aus der Literatur (Lafont und Beydon, 1988) bzw. Erfahrungen des eigenen Labors übernehmen.

Für die Analysen wurde eine Gradientenelution mit Acetonitril und Wasser durchgeführt (Beginn bei 10% Acetonitril, Steigerung auf 40% in 10 Minuten, teils auf 70% in 20 Minuten zur Analyse der humanen Steroide). Als Detektor diente ein Photometer, das auf 242 nm eingestellt wurde (bzw. 272 nm zur Detektion von Estradiol).

Signifikante Abweichung zu den in der Vergangenheit verwendeten Methoden war der Einsatz einer RP-18-Chromolith®-Säule, die sich im Labor im Vergleich zur konventionellen RP-18-Säule durch schärfere Trennungen und einen schnelleren Programmablauf (3 ml/min maximale Flussrate im Gegensatz zu 1 ml/min bei konventionellen Säulen) hervorhat.

Für die HPLC-Analyse wurden je 50 µg 20E bzw. humane Steroide in 30%iger Ethanol-Lösung zusammengegeben. 100 µl des so erhaltenen Steroidgemisches wurden in das HPLC-System injiziert. Abb. 6-3 zeigt den HPLC-Ausschrieb, die Retentionszeiten sind in Tab. 6-3 zusammengefasst.

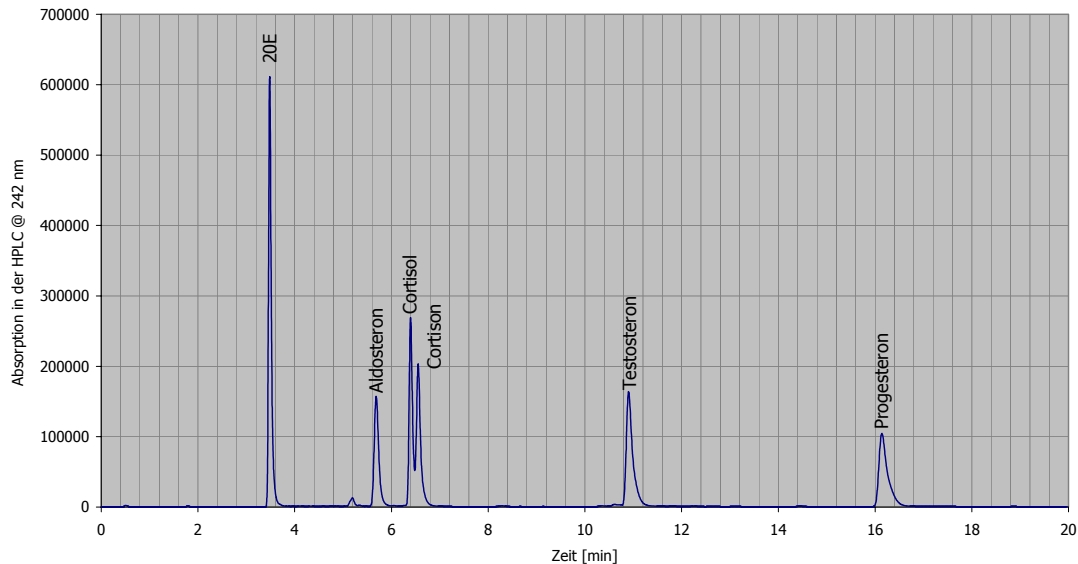


Abb. 6-3: HPLC eines Steroidgemisches

Ferner wurden noch Verdünnungsreihen von 20E angefertigt und in der HPLC getestet. Es stellte sich heraus, dass Mengen bis 10 ng noch sichtbar waren. Die Nachweisgrenzen für die humanen Steroide werden etwas höher liegen, wie aus o.a. Abb. ersichtlich.

Steroid	RT[min]
Aldosteron	5,69
Cortisol	6,39
Cortison	6,55
Estradiol <sup>1</sup>	10,43
Progesteron	16,13
Testosteron	10,91
20E	3,48
E <sup>2</sup>	5,59
2d20E <sup>2</sup>	5,76
2dE <sup>2</sup>	7,19

Tab. 6-3: Retentionszeiten einiger Steroide  
in der konventionellen HPLC

(<sup>1</sup> = bei 272 nm statt 242 nm gemessen,

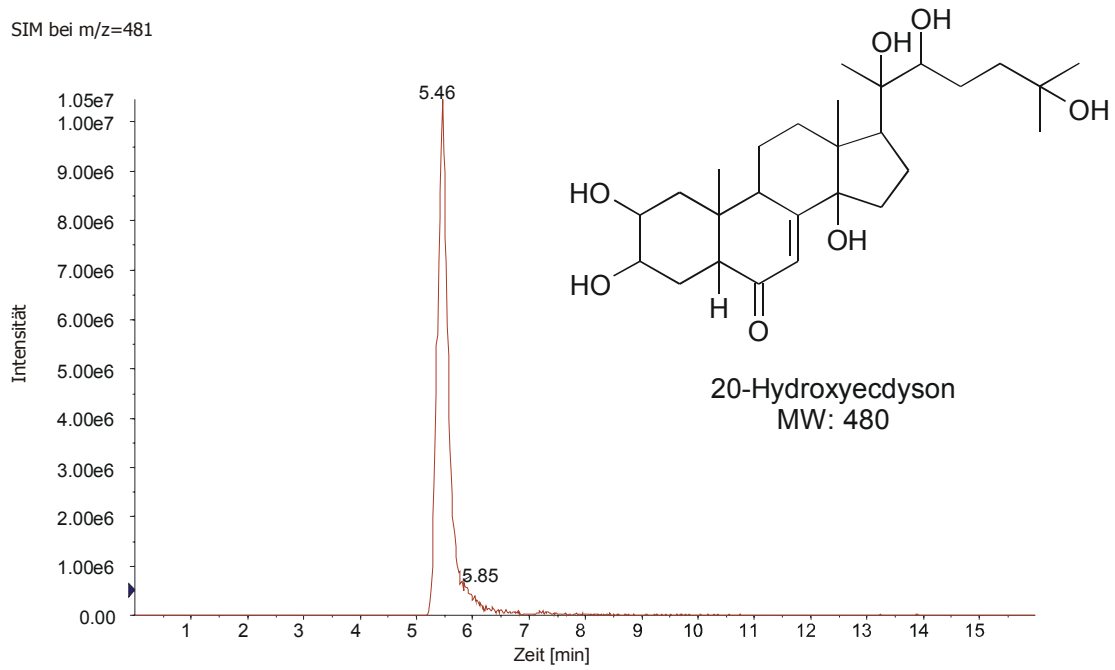
<sup>2</sup> = in separaten Läufen bestimmt)

#### 6.1.4 LC/MS

Für die LC/MS wurden neben 20E auch einige andere Ecdysteroid-Derivate als Referenzen analysiert, um später möglicherweise über Analogien die Struktur eines Metaboliten aufdecken zu können. Die Abb. 6-4 bis Abb. 6-11 zeigen einige durchgeführten Analysen von Ecdysteroiden. Im oberen Bereich ist jeweils der SIM-Ausschrieb zu sehen, im unteren Bereich die MS/MS-Analyse der Maxima der SIM-Methode.

Tab. 6-4 fasst die Retentionszeiten einiger Ecdysteroiden in der LC/MS zusammen. Die Massen der Ionenfragmente, die im MS/MS-Modus entstanden sind, stellt Tab. 6-5 dar.





MS/MS von 5,293 bis 5,628 min

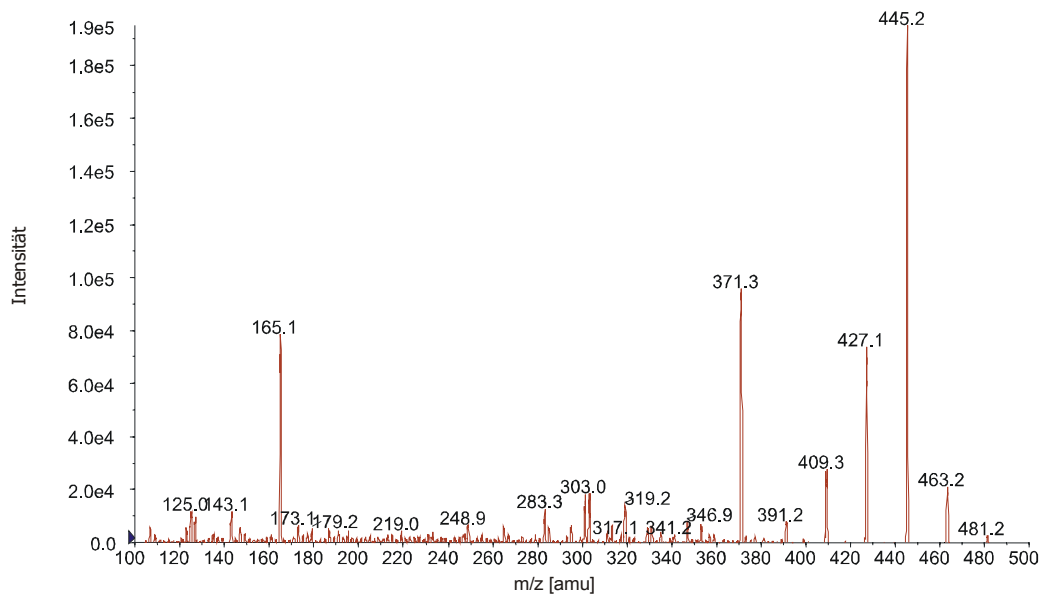


Abb. 6-4: LC/MS von 20E, Methode „a“

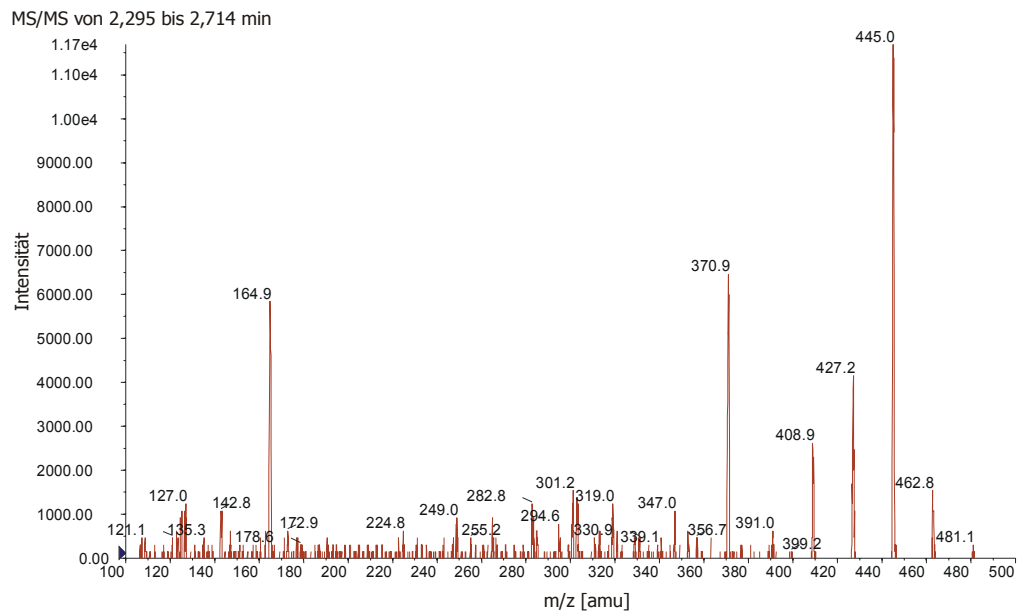
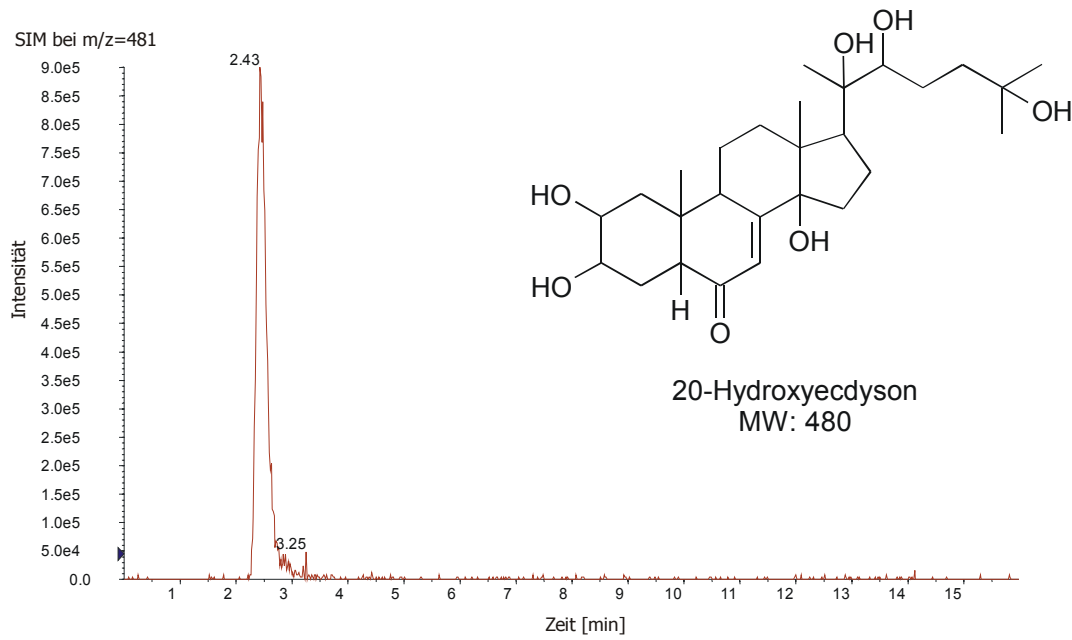


Abb. 6-5: LC/MS von 20E, Methode "b"

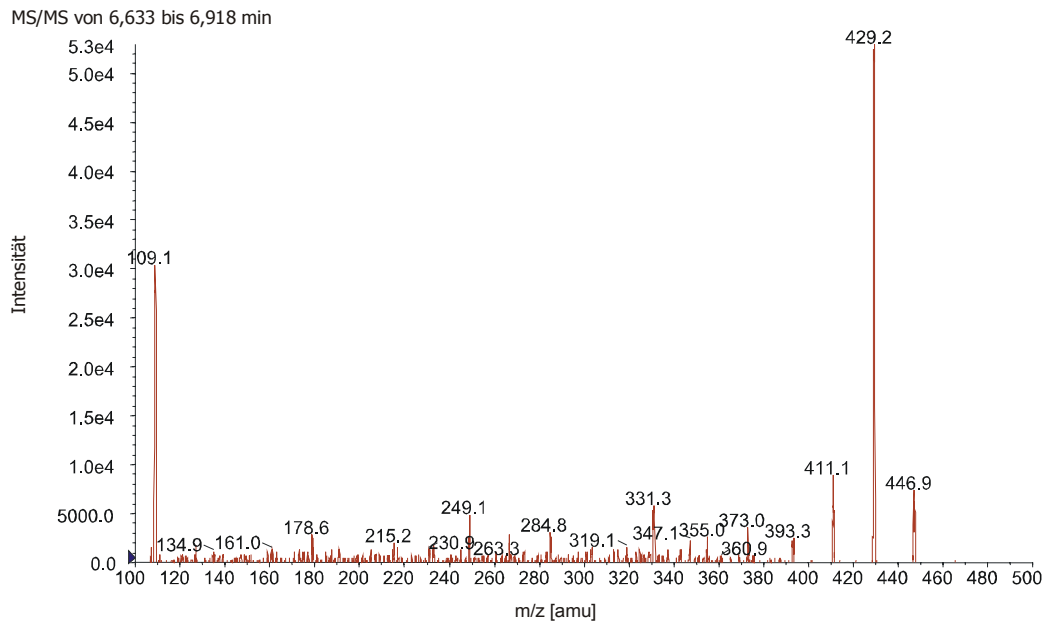
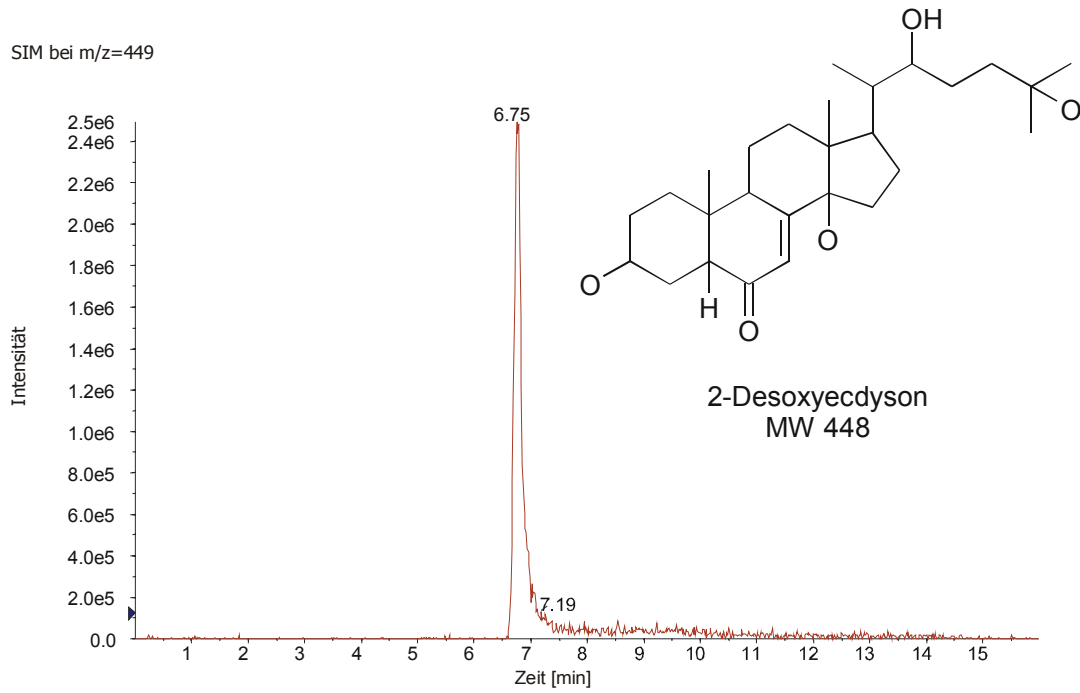


Abb. 6-6: LC/MS von 2dE, Methode "a"

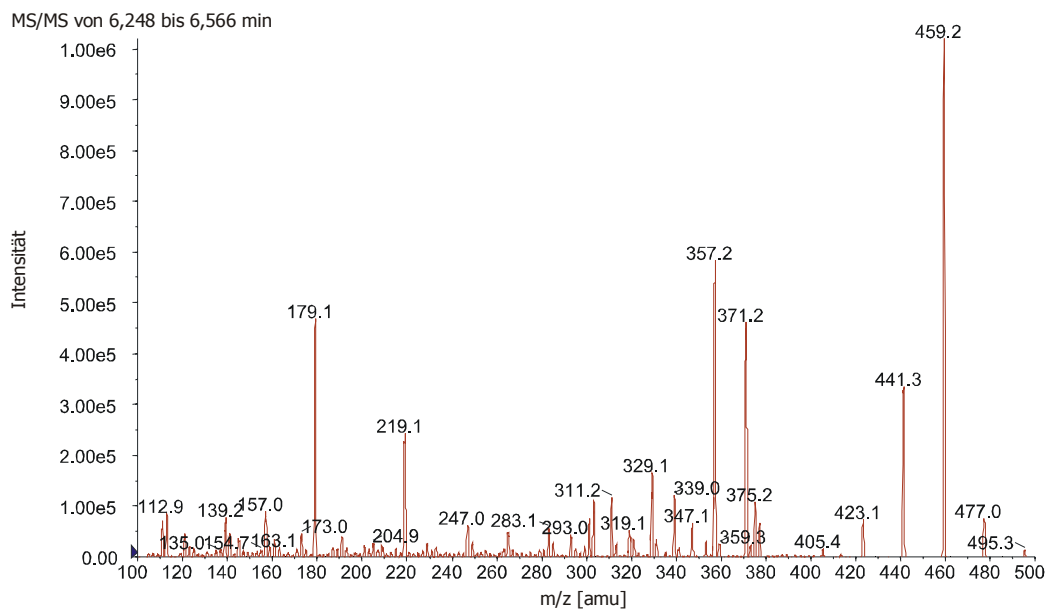
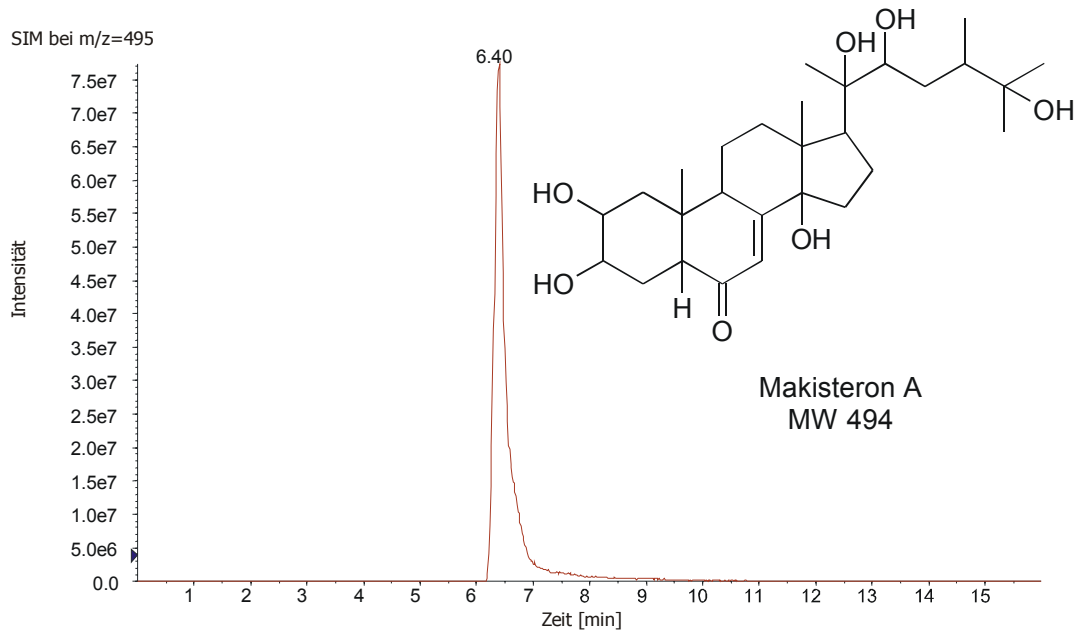


Abb. 6-7: LC/MS von Makisteron, Methode "a"

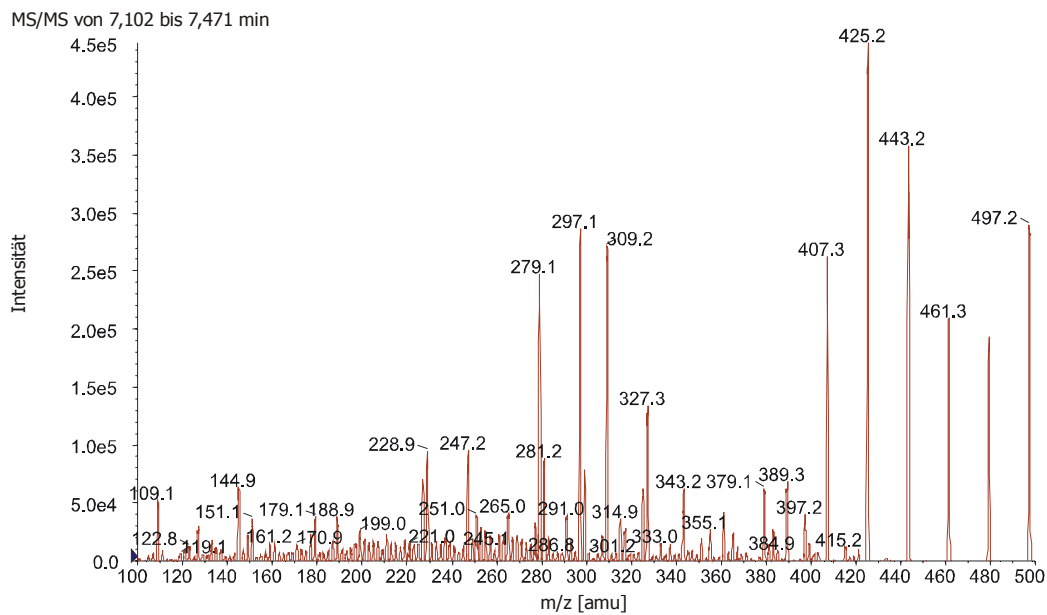
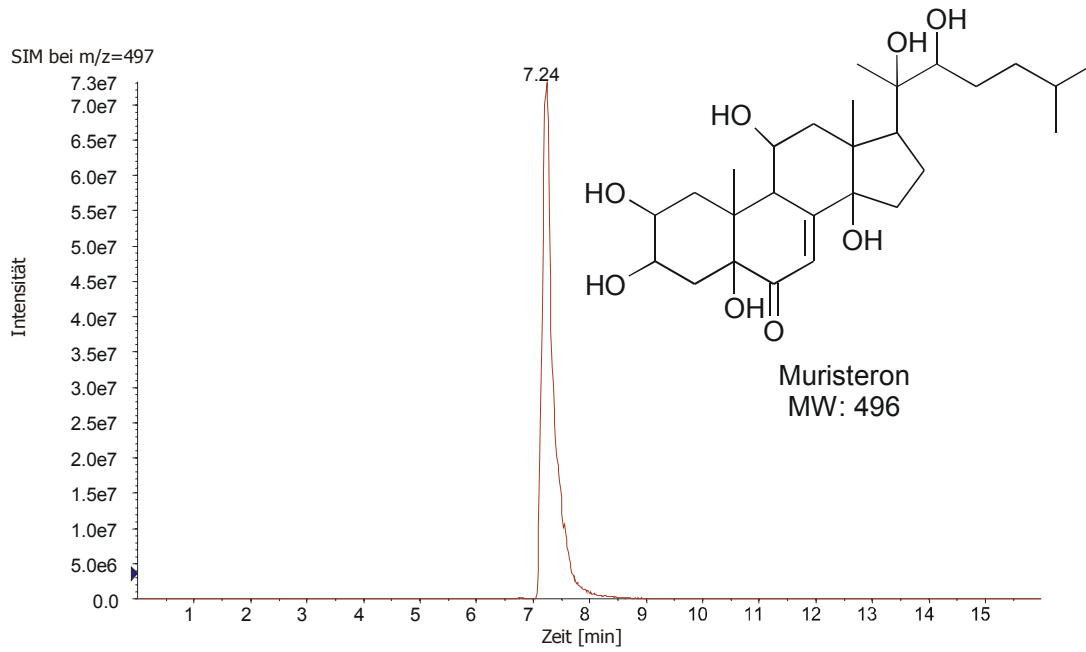


Abb. 6-8: LC/MS von Muristeron, Methode "a"

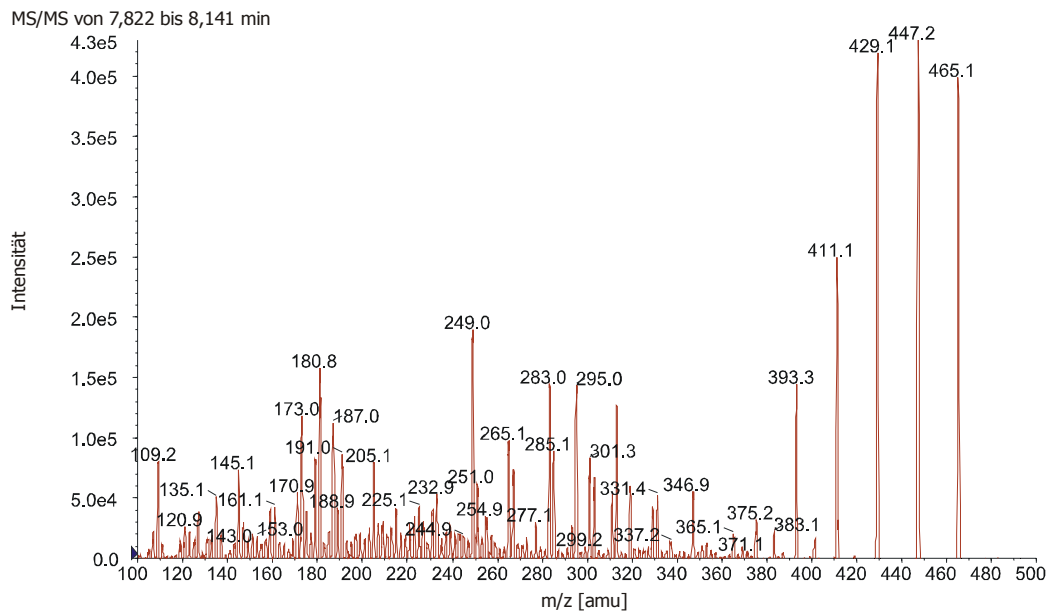
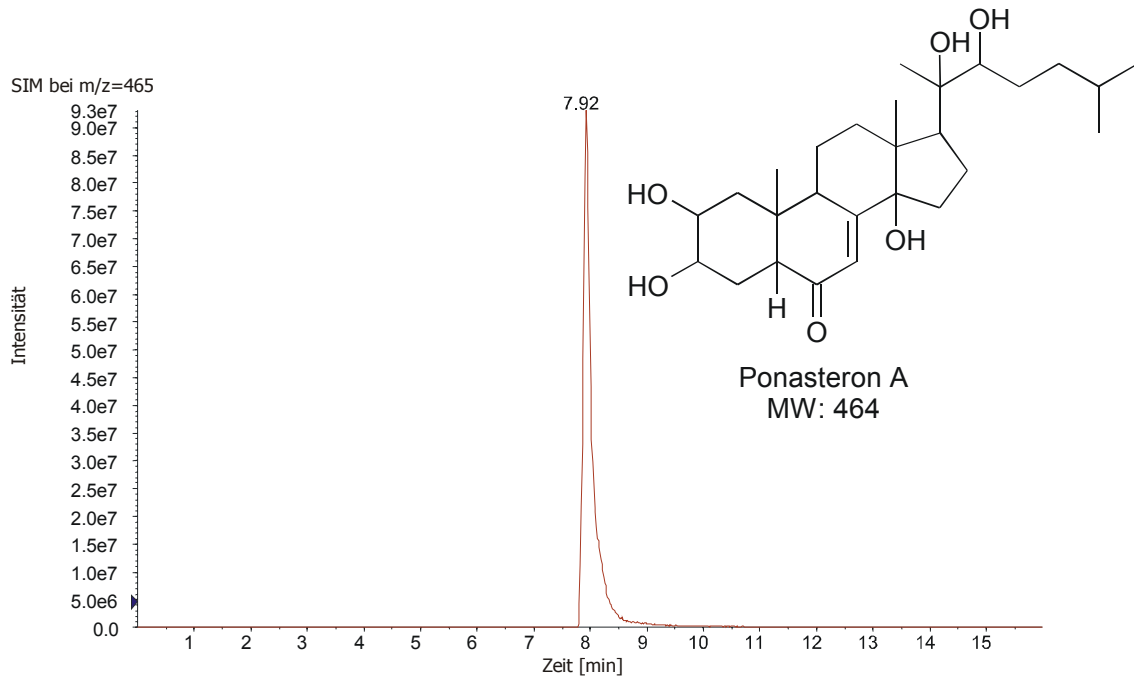
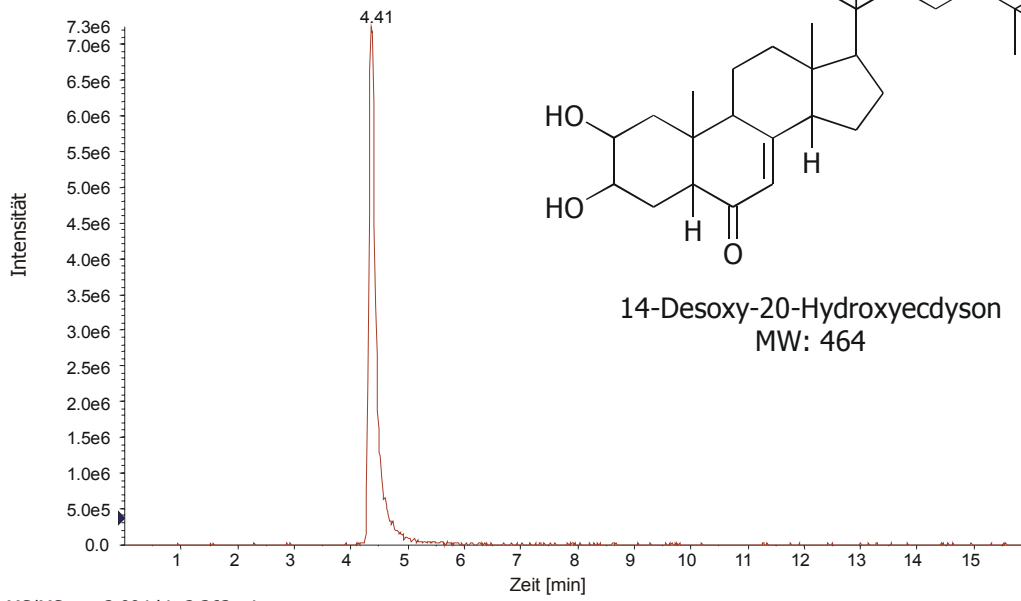


Abb. 6-9: LC/MS von Ponasteron, Methode "a"

SIM des 14d20E-Standards bei  $m/z=465$ 

MS/MS von 2,094 bis 2,363 min

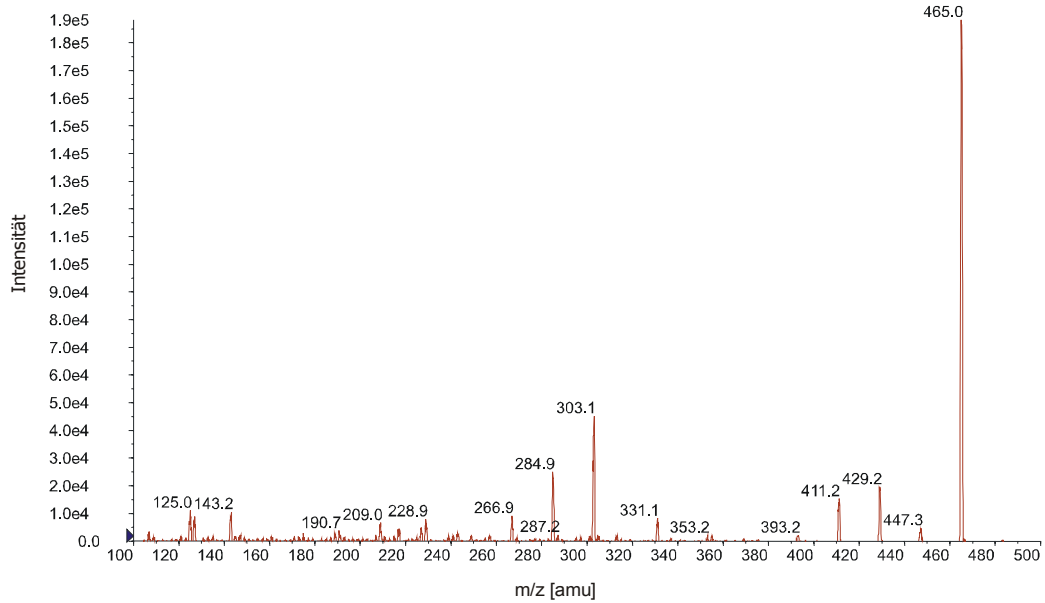
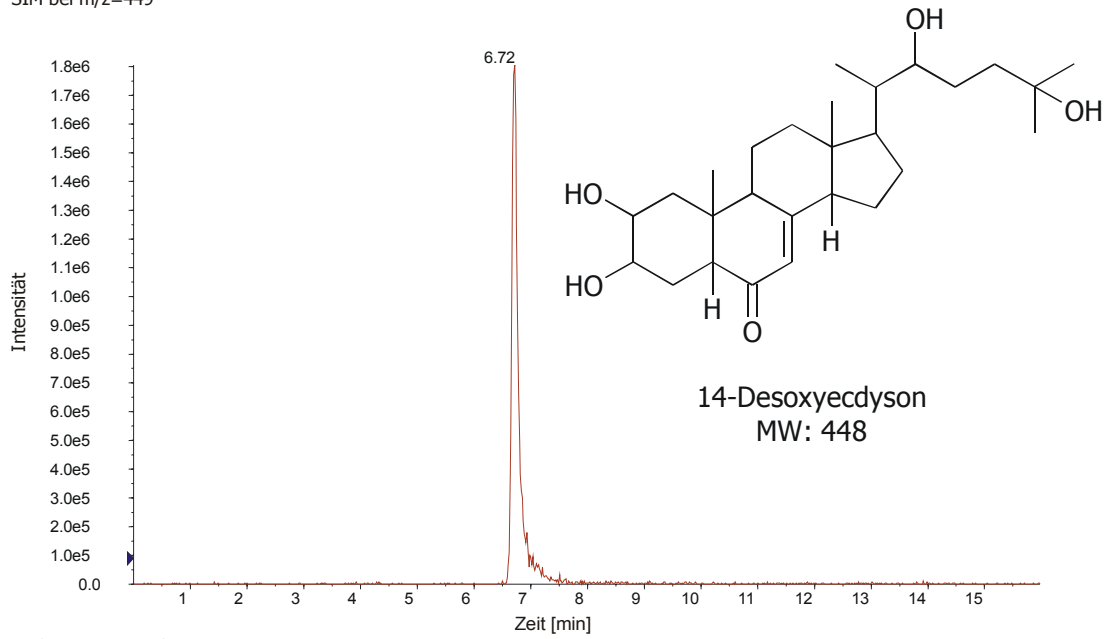


Abb. 6-10: LC/MS von 14d20E, Methode "b"

SIM bei  $m/z=449$ 

MS/MS von 6,633 bis 6,918 min

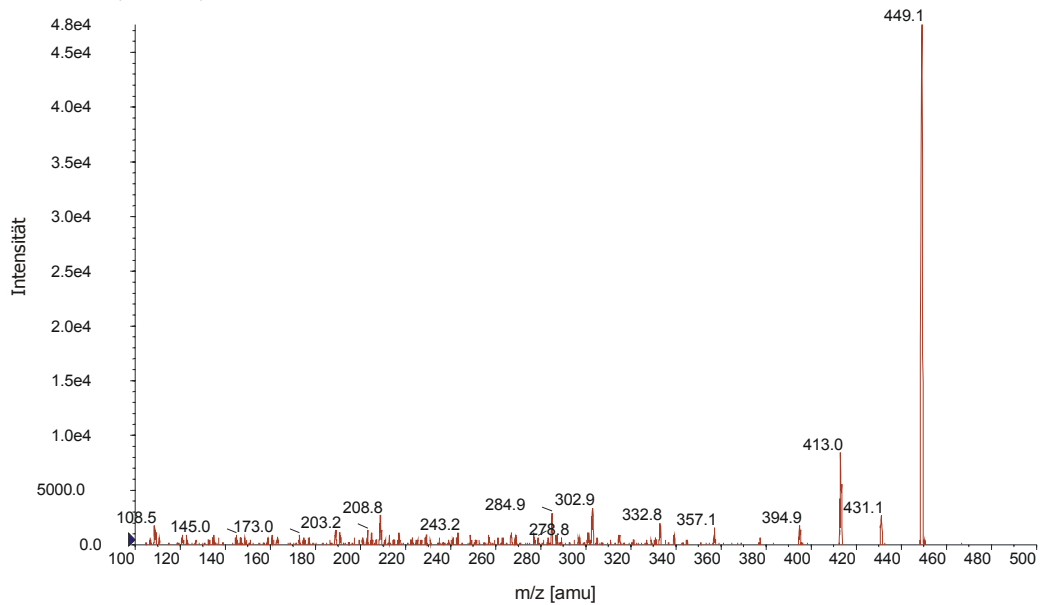


Abb. 6-11: LC/MS von 14dE, Methode "b"



<b>Steroid</b>	<b>RT nach Methode „a“ [min]</b>	<b>RT nach Methode „b“ [min]</b>
20E	5,46	2,43
Inokosteron	5,88	n. gem.
Makisteron	6,4	n. gem.
Muristeron	7,24	n. gem.
Ponasteron	7,92	n. gem.
2dE	6,75	n. gem.
14d20E	n. gem.	4,41
14dE	n. gem.	6,72

*Tab. 6-4: Retentionszeiten in der LC/MS-Analyse*

m/z	20E	Inokosteron	Makisteron	Muristeron	Ponasteron	2dE	14d20E	14dE
165	x							
179			x					
197		x						
219			x					
249		x			x			
279				x				
283					x			
285							x	
295					x			
297				x				
303							x	x
309				x				
327				x				
357			x					x
371	x		x					
393					x			
395								x
407				x				
409	x	x						
411						x	x	
413								x
425				x				
427	x	x						
429					x	x	x	
431								x
441			x					
443				x				
445	x	x						
447					x	x	x	
449								x
459			x					
461				x				
463	x	x						
465					x		x	
479				x				
497				x				

Tab. 6-5: m/z-Verhältnisse der nachgewiesenen Ionenprodukte der Ecdysteroid-Standards in der MS/MS

### 6.1.5 EIA

Für die EIAs wurde stets nach der in 5.4.4 dargelegten Vorschrift verfahren. Sowohl Ecdysteroiden als auch humane Steroide wurden untersucht. Letzteres, um mögliche Artefakte durch endogene Steroide des Probanden in späteren Analysen im Urin zu erkennen.

Bei den untersuchten Ecdysteroiden handelt es sich um 20E, E und die Desoxy-Derivate 2d20E und 2dE. Abb. 6-12 stellt die Standardbindungskurven dieser Hormone dar.

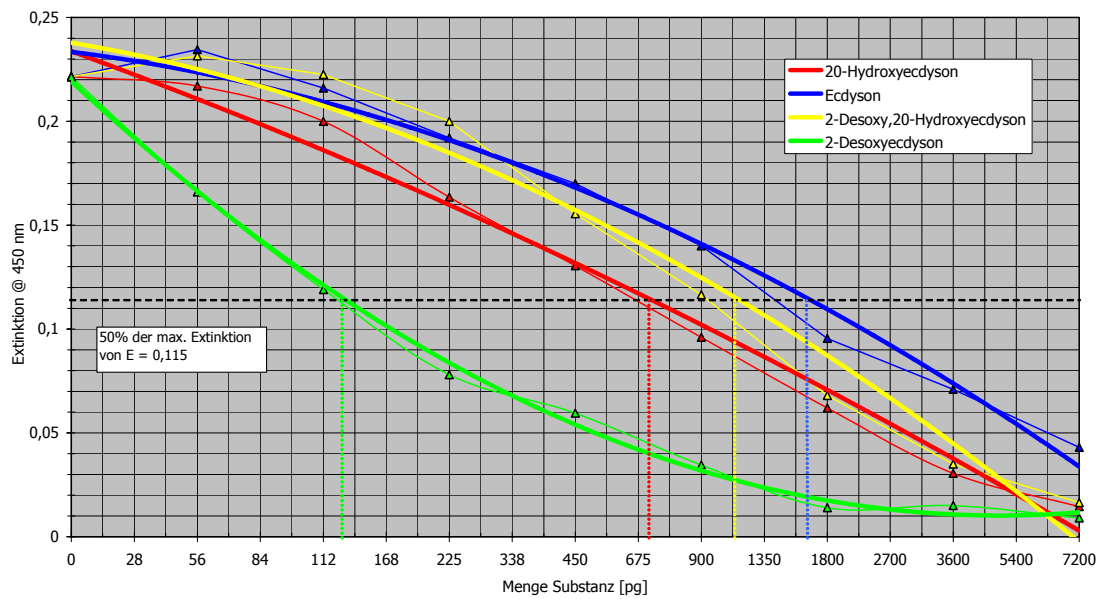


Abb. 6-12: Standardbindungskurven von E, 20E, 2dE und 2d20E im EIA

Für die Errechnung der Kreuzreaktivitätskoeffizienten (KRF) wurde die durchschnittliche Extinktion für die maximale enzymatische Aktivität bei Messung von E auf 0,23 festgesetzt. Für die Quotientenbildung wurde dann die halbmaximale Extinktion (0,115) verwendet.

- E: 2,3
- 2d20E: 1,7
- 2dE: 0,7

Anhand dieser Daten lässt sich vermuten, dass auch Ecdysteroid-Metabolite bei diskreter Veränderung noch im EIA zu detektieren sind.

Die KRF zwischen 20E und den humanen Steroiden wurden nach o.a. Methode von Frau Elke Findeisen im Rahmen ihrer Arbeit „Ecdysteroiden in Nahrungsmitteln“ bestimmt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Werte betragen:

- Aldosteron: 5.000
- Cortisol: 1.000
- Cortison: >5.000
- Estradiol: >100.000
- Progesteron: >10.000
- Testosteron: >10.000

Somit ist Cortisol das einzige Hormon, welches aufgrund seines KRFs und seiner täglichen Ausscheidungsmenge in der Lage wäre, Interferenzen zu begründen. Aufgenommen wurden ca. 42  $\mu\text{mol}$  20E. Die maximale Ausscheidung an Cortisol eines gesunden Menschen beträgt bis zu ca. 320 nmol pro Tag (Greiling und Gressner, 1995).

## **6.2 Externe Analyse der Nierenretentionswerte des Probanden**

Nach den in 5.4.5 beschriebenen Methoden ergaben sich folgende Werte:

- Serum-Kreatinin: 1,01 mg/dl (Referenzbereich: 0,6-1,2 mg/dl)
- Serum-Harnstoff: 36 mg/dl (Referenzbereich: 20-50 mg/dl)

Beide Werte liegen somit im Referenzbereich, eine schwerwiegende Niereninsuffizienz und eine daraus folgende Verfälschung der Versuchsergebnisse ist somit sehr unwahrscheinlich.

## **6.3 Analyse des Handelspräparates Ecdysten®**

Für das Experiment wurde von der Firma Thermolife das Fertigpräparat Ecdysten® zur Verfügung gestellt. Vor der Einnahme wurde dieses auf mögliche Verunreinigungen untersucht. Verunreinigungen (vor allem mit klassischen AAS) in sogenannten Nahrungsergänzungsmitteln, zu denen die Ecdysteroid-haltigen Präparate oft gerechnet werden, sind kürzlich selbst in Rundfunk und Fernsehen erörtert worden (vgl. auch Geyer et al., 2000). Die Aufnahme einer in dieser Weise verunreinigten Substanz galt es aus gesundheitlicher und analytischer Sicht zu vermeiden.

Zur Analyse wurde wie folgt vorgegangen: Das Pulver wurde der Kapsel entnommen und mit 5ml Methanol extrahiert. Das Gemisch wurde zentrifugiert, die flüssige als Stammlösung Phase gekühlt gelagert, die Festsubstanz verworfen.

### 6.3.1 Photometrie

Von dem Methanol-Extrakt wurde 1ml der photometrischen Analyse zugeführt (s. Abb. 6-13). Das Extinktionsmaximum lag wie bei 20E exakt bei 242 nm. Nach dem in 6.1.1 ermittelten Extinktionskoeffizienten ergab sich eine Menge von 9,4 mg 20E pro Kapsel Ecdysten, was sich mit der Packungsangabe von 10 mg 20E gut deckte. Hinweise auf eine Verunreinigung mit anderen anabolen Steroiden waren hierbei nicht ersichtlich.

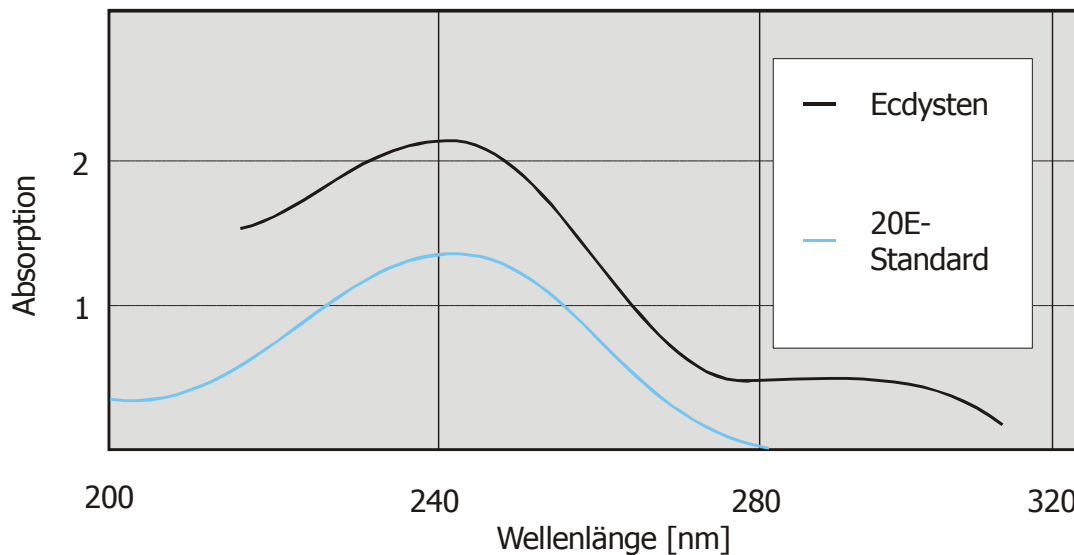


Abb. 6-13: Spektrum des Ecdysten-Extraktes im Vergleich zu einem 20E-Standard

### 6.3.2 HPLC

Für die HPLC wurden 50 µl der Stammlösung in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 5 ml Aqua bidest. gelöst. Hiervon wurden 100 µl der HPLC-Analyse zugeführt.

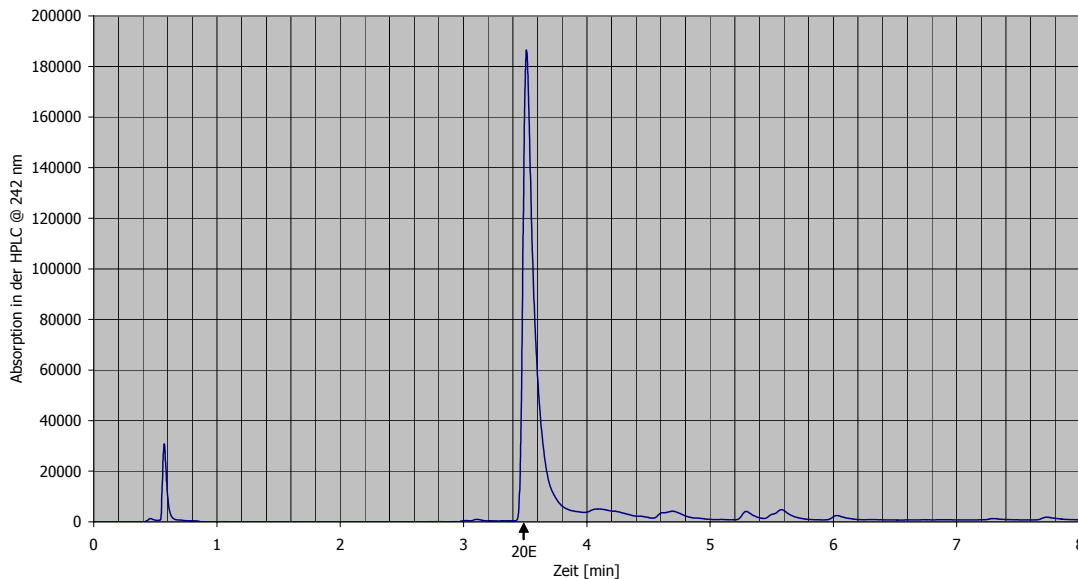


Abb. 6-14: HPLC des Ecdysten-Präparates

Der Ausschrieb (Abb. 6-14) zeigt zwei Peaks, einen kleineren mit einer RT von 0,58 min und einen größeren mit einer RT von 3,51 min. Letzterer stellt mit sehr großer Wahrscheinlichkeit 20E dar. Welche Substanz der erste Peak repräsentiert, kann mit dieser Methode letztlich nicht geklärt werden, jedoch wäre eine so kurze RT sehr untypisch für die klassischen anabolen Steroide (vgl. 6.1.3).

Sowohl eine Verunreinigung des Produktes durch klassische anabole Steroide als auch eine Vertauschung des Inhaltes bzw. der Beschriftung können somit als unwahrscheinlich gelten.

## **6.4 Erprobung verschiedener Präparationsmethoden, Anwendung auf biologische Matrices**

Unter der Vorstellung, dass die Metabolite des 20E dem Ausgangsmolekül strukturell ähnlich sind (vgl. 3.1.1 und 3.2.2), erfolgten zahlreiche analytische Vorversuche mit 20E, die zum einen dazu dienten, den quantitativen Verlust durch Probenvorbereitung abzuschätzen und zum anderen die mögliche Verbesserung der Probenreinheit durch Vorbereitung zu optimieren.

### 6.4.1 DC

Die klassische Form der DC erlaubt allenfalls semiquantitative Aussagen über das Vorliegen bestimmter Substanzen, erspart jedoch eine aufwändige Probenvorbereitung.

So ist für die Untersuchung von Steroiden in Speichel lediglich eine allgemeine Vorbereitung gemäß 5.2.2 notwendig. Liegen die Steroide in Urin vor, so sollte die Probe zumindest vorher ausgeschüttelt werden.

Getestet wurde hier das Ausschütteln zwischen folgenden Lösungsmitteln:

- 1-Butanol : Wasser
- Ethylacetat : Wasser
- Diethylether : Wasser

Es wurde wie folgt vorgegangen: 100 ml Urin wurden mit 1 mg 20E versetzt und analog 5.2.1 vorbereitet. Je 1 ml der Proben wurde gefriergetrocknet und danach in wässrige Lösung gebracht. Diese wurde jeweils mit den o.a. Lösungsmitteln geschüttelt. Am Ende des Versuches erhält man jeweils zwei Phasen; diese wurden konzentriert und auf eine DC-Platte aufgetragen. Laufmittel und Plattentyp entsprechen denen in 6.1.2 beschriebenen. Abb. 6-15 zeigt: Die organische Phase beim Ausschütteln mit Wasser und 1-Butanol weist das beste Verhältnis Ecdysteroid-Menge zu Restsubstanzen auf.

Die Verwendung von Lichrolut®-RP-18-Säulen brachte bei der DC keinen Vorteil gegenüber dem einfachen Ausschütteln mit Butanol.

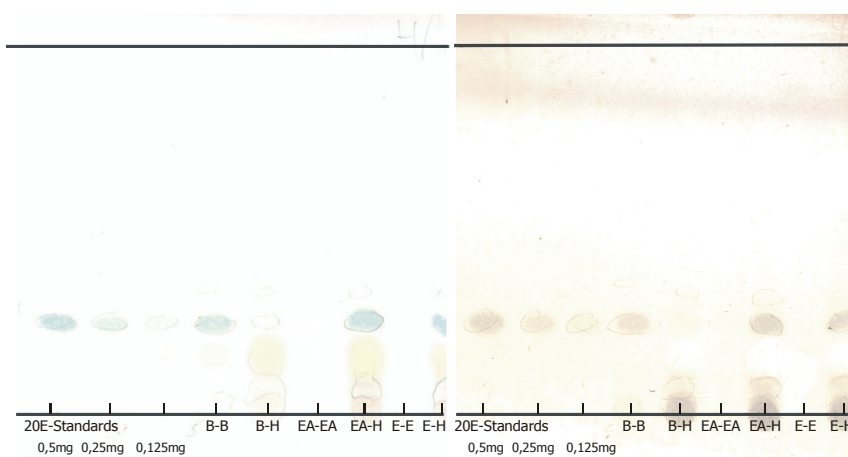


Abb. 6-15: DC unterschiedlicher Phasen nach dem Ausschütteln:

*B-B=Butanol-Phase, B-H=Wasserphase beim Ausschütteln mit Wasser und Butanol*

*EA-EA=Ethylacetat-Phase, EA-H=Wasserphase beim Ausschütteln mit Wasser und Ethylacetat*

*E-E= Diethylether-Phase, E-H=Wasserphase beim Ausschütteln mit Wasser und Diethylether*

### 6.4.2 HPLC

Speichelproben können problemlos nach der in 5.2.2 dargestellten Vorbereitung und Überführung in ein wässriges Medium in der HPLC analysiert werden. Hierzu wurde eine Speichelprobe mit 50 µg 20E versetzt, eingetrocknet und in 1 ml Aqua bidest. gelöst. 100 µl dieser Probe wurden in der HPLC analysiert (s. Abb. 6-16). Neben einem kleineren Peak mit einer RT von 0,63 min zeigte sich ein großer Peak mit einer RT von 3,77 min. Letzterer ist dem 20E zuzurechnen, eine Detektion von (Ecdy)steroiden im Speichel mittels HPLC scheint somit keine intensive Probenvorbereitung zu erfordern.

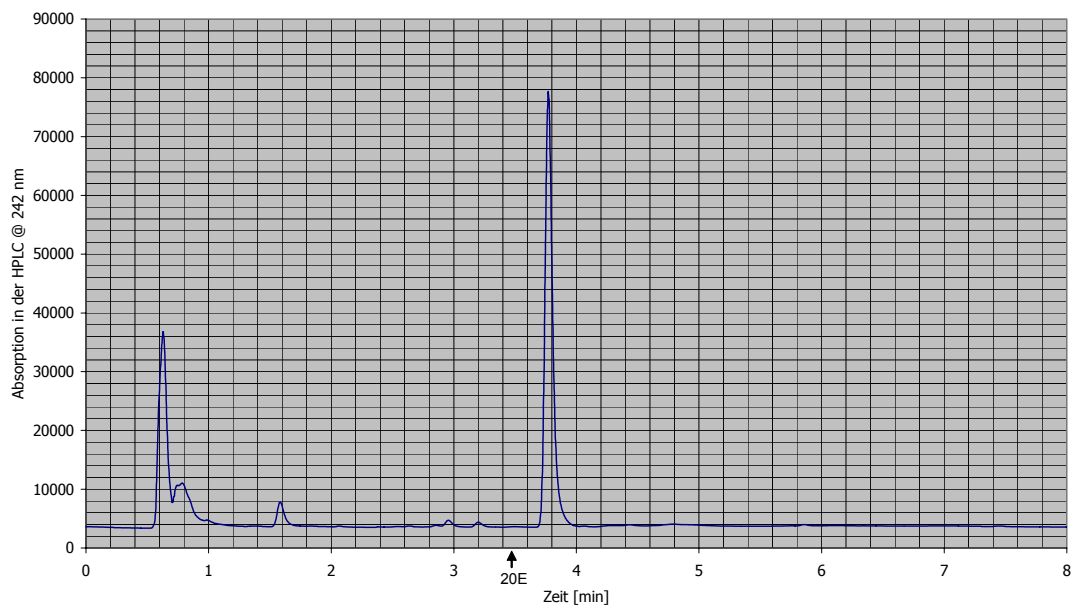


Abb. 6-16: Nachweis von 50 µg 20E in einer Speichelprobe mittels HPLC

Für die Detektion von Steroiden in Urin kommen nach der Literatur (für humane Steroide: Bowers, 1997; Hay und Mormède, 1997; Turpeinem et al., 1997; für Ecdysteroiden Girault et al, 1988; Lafont und Beydon, 1988; Morgan und Wilson, 1989) und Erfahrungen des eigenen Labors vor allem zwei Methoden zur Probenvorbereitung für die HPLC in Frage: das Ausschütteln und die Festphasenextraktion. Für die Bestimmung des Verlustes an Ecdysteroiden durch diese Methoden wurde eine vorgegebene Menge 20E in Wasser gelöst und den beiden Verfahren zugeführt; anschließend wurde die verbleibende Menge photometrisch bestimmt.

Für das Ausschütteln wurden nach dem orientierenden Ergebnis (DC, s. 6.4.1) 1-Butanol und Aqua bidest. ausgewählt. Es ließen sich photometrisch zwischen 68% und 89% der ursprünglichen Menge in der Butanol-Phase finden, zwischen 10% und 35% tauchten in der wässrigen Phase auf.



Bei der Vorbereitung mittels Lichrolut®-RP-18-Säule ließen sich bei einer Elution mittels 50% Methanol zwischen 72% und 96% der ursprünglichen Menge 20E per Photometer wiederfinden.

Ferner galt es zu bestimmen, inwieweit eine Kombination beider Verfahren einen Vorteil bei der Analyse via HPLC bringen kann. In einem Versuch wurde 1 mg 20E in 100 ml Urin gelöst. Der Urin wurde analog 5.2.1 vorbereitet. Es wurden zweimal je 1 ml der Stammlösung entnommen, diese wurden wie folgt behandelt:

- Probe A:
  - Gefriertrocknung der Stammlösung und Lösung in Wasser
  - Ausschütteln zwischen Butanol und Wasser
  - Erneute Gefriertrocknung der Butanol-Phase und Lösung in Wasser
  - Aufgabe auf eine Lichrolut-RP-18-Säule und Elution mit 50% Methanol
  - Erneute Gefriertrocknung und Lösung in Wasser
- Probe B:
  - Gefriertrocknung der Stammlösung und Lösung in Wasser
  - Aufgabe auf eine Lichrolut-RP-18-Säule und Elution mit 50% Methanol
  - Erneute Gefriertrocknung und Lösung in Wasser

Abb. 6-17 zeigt, dass die Kombination der beiden Verfahren wohl eine signifikante Reduktion störender Substanzen im Bereich von  $RT < 2$  min bewirkt, jedoch auch das Extinktionsmaximum für 20E deutlich kleiner ausfällt. Zu diesem Zeitpunkt kann also keine klare Aussage darüber getroffen werden, welche Möglichkeit vielversprechender ist.

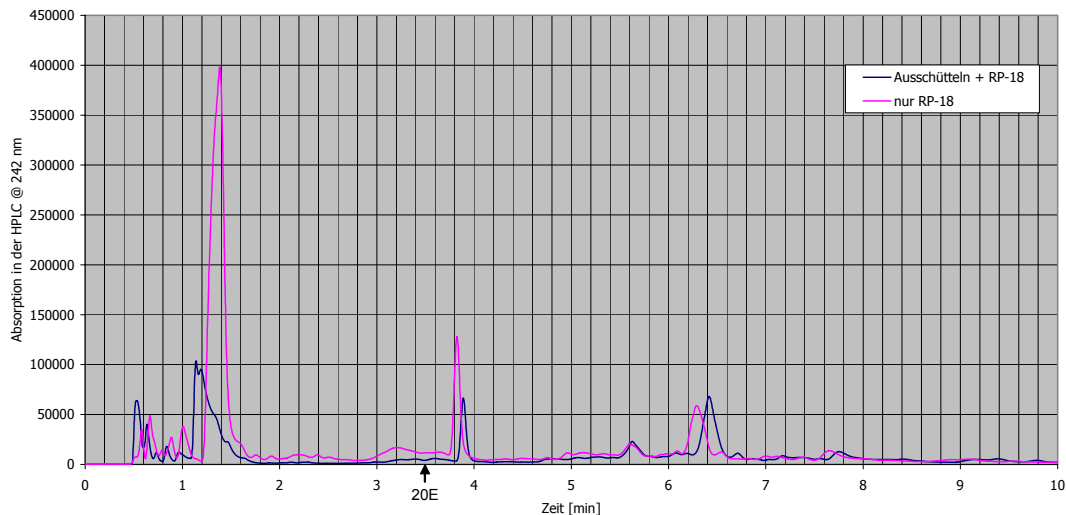


Abb. 6-17: HPLCs von Urinproben mit kombinierter Vorbereitung (Ausschütteln und Lichrolut®-RP-18) gegen alleinige Lichrolut®-RP-18-Vorbereitung

### 6.4.3 LC/MS

Für die LC/MS konnten die aus 6.4.2 gewonnenen Erkenntnisse ohne weitere Veränderung übernommen werden.

### 6.4.4 EIA

Der EIA benötigt kaum Probenvorbereitung. Probleme seitens des Wiederfindens von immunoreaktiven Steroiden scheinen somit unwahrscheinlich. Zur Sicherstellung dieser Vermutung wurden jedoch folgende Versuche durchgeführt:

In 200 ml Urin wurden 180 ng 20E gelöst. Der Urin wurde analog 5.2.1 gefriergetrocknet und mit 20 ml Methanol extrahiert. 1 ml der so erhaltenen Stammlösung wurde erneut gefriergetrocknet und in 1 ml Wasser aufgelöst.

Beim Speichel wurde wie folgt verfahren: In ca. 1 ml Speichel wurden 4,5 ng 20E gelöst, die Proben wurden analog 5.2.2 vorbereitet. Die 0,5 ml Stammlösung wurden getrocknet und in 0,5 ml Wasser gelöst.

In beiden Fällen liegen somit bei einer Fraktion für den EIA (50 µl) 450 pg 20E vor, diese Menge liegt im optimalen Meßbereich des EIAs.

Die per EIA ermittelten Werte ergaben zwischen 83% und 102% der ursprünglich zugegebenen Ecdysteroid-Menge, ohne dass tendenziell Unterschiede zwischen den beiden Matrices feststellbar waren. Immunoreaktive Steroide im Urin und Speichel sind somit ohne aufwändige Probenvorbereitungsschritte gut im EIA nachzuweisen.

## **6.5 Analyse der biologischen Proben nach der Ecdysteroid-Einnahme**

### **6.5.1 EIA**

Als erstes Verfahren zur Analyse der Proben wurde der EIA gewählt, da dieser am schnellsten einen Überblick über die Menge immunoreaktiver Ecdysteroide in sämtlichen Proben ermöglicht.

Die Analyse der Speichelproben blieb ohne verwertbares Resultat. Selbst bei einer starken Konzentrierung (Eintrocknung des gesamten Extraktes einer Speichelprobe und Lösung in 100 µl Probenpuffer) wurden keine immunoreaktiven Steroide gefunden. Es müssen in allen Speichelproben Mengen unter 112 pg vorgelegen haben. Somit kamen für das Ziel der Arbeit nur noch die Analysen der Urinproben in Frage.

Für die Analyse der Urinproben wurden kleine Mengen der Stammlösung (20 ml, auf Methanol-Basis) eingetrocknet und in Wasser gelöst unter Zuhilfenahme des Ultraschallbades (10 min). Ihre Konzentrierung wurde in Zehnerpotenzschritten so angepasst, dass die Proben jeweils in einem möglichst optimalen Meßbereich des EIAs lagen.

Somit konnte ein pharmakokinetisches Profil erstellt werden, welches einen zweigipfligen Verlauf mit Maxima bei vier bis fünf Stunden und bei 21 Stunden nach oraler Aufnahme zeigt (s. Abb. 6-18). Die Gesamtwiederfindungsrate immunoreaktiver Steroide betrug zwischen 3,6% und 9% (im Mittel: 6%). Dies gilt allerdings nur für die Hypothese, dass es sich ausschließlich um 20E handelt, ansonsten ist diese Aussage nur semiquantitativ (vgl. 6.1.5).

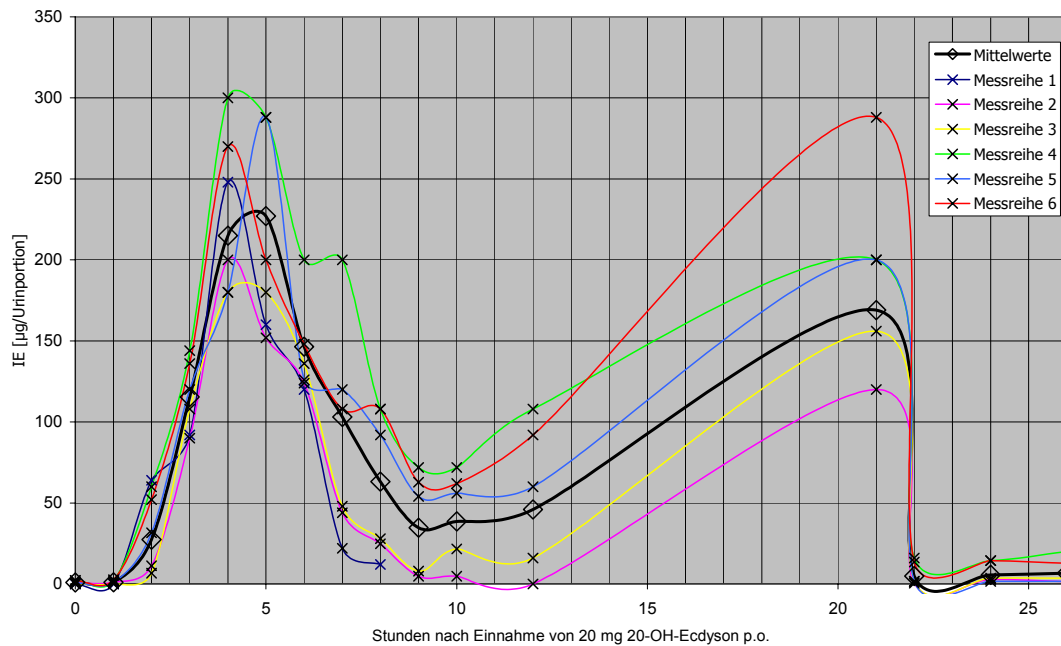


Abb. 6-18: Festgestellte Mengen IE in den Urinproben per EIA

### 6.5.2 HPLC

Nach den Erkenntnissen der EIAs konzentrierte sich die HPLC-Analyse auf die Urinproben  $t=0$  h als Referenzwert und  $t=3$  h,  $t=4$  h,  $t=5$  h,  $t=22$  h für die Suche nach 20E und dessen Metaboliten. Auf eine weitere Analyse der Speichelproben wurden aufgrund fehlender Nachweisbarkeit im EIA verzichtet.

Trotz der Erfahrungen der Vorversuche wurde die Probenvorbereitung mehrfach modifiziert, da der Metabolit von seiner Struktur dem Ausgangsmolekül weniger ähneln könnte als durch Hypothesen vermutet. Getestet wurden unter anderem:

- Variation des organischen Lösungsmittels zum Ausschütteln; getestet wurden folgende Lösungsmittel (es wurde jeweils die wässrige und die organische Phase analysiert):
  - 1-Butanol
  - Diethylether
  - Acetonitril
  - Chloroform

Neben der Lichrolut®-RP-18-Säule von Merck wurde noch ein Konkurrenz-Produkt der Firma Waters getestet (sog. Sep-Pak-Kartuschen, vgl. Girault et al., 1988). Bei beiden Produkten wurden Eluate von 10% Methanol bis 100% Methanol getestet (jeweils in Schritten à 10%). Alternativ wurde noch mit Ethanol eluiert.

Am Aussagekräftigsten schienen die Analysen letztendlich nach folgender Vorbereitung: Je 1 ml der Stammlösung wurde eingetrocknet, mittels Ultraschallbad in 1 ml Wasser gelöst und danach zwischen je 5 ml Wasser und 5 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde über eine Lichrolut® RP-18-Kartusche gegeben und mit 50% Methanol eluiert. Das Eluat wurde im Lyophilisator getrocknet und in 1 ml Wasser gelöst, so dass am Ende gleiche Konzentrationsverhältnisse wie in der Stammlösung bestanden. Für die Analyse in der HPLC wurden Probenvolumina von 100 µl verwendet. Bei jedem HPLC-Lauf wurden ferner 5 µg Testosteron in wässriger Lösung als Standard zugesetzt.

Folgende Aussagen lassen sich aus den Resultaten ableiten:

- In den Proben  $t=4$  h und  $t=5$  h und  $t=21$  h lassen sich Absorptionsmaxima nachweisen im Bereich von 20E
- In der Probe  $t=21$  h sind zwei deutliche Peaks vorhanden, die in den vorigen Proben nicht zu erkennen waren, diese sind mit „1“ und „2“ gekennzeichnet.

Abb. 6-19 fasst die Resultate der HPLC zusammen. Der Übersichtlichkeit wegen ist aus dem Zeitbereich  $t=4-5$  h nur der Ausschrieb der Probe  $t=5$ h dargestellt.

Zur besseren qualitativen Analyse der gefundenen Peaks wurden Fraktionen der HPLC-Läufe gesammelt und dem EIA zugeführt.

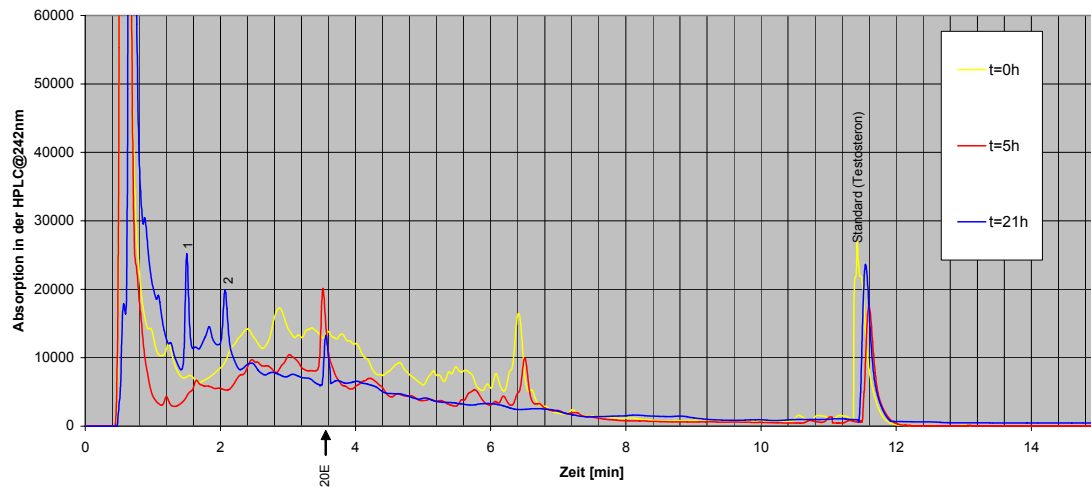


Abb. 6-19: HPLCSs der Urinproben der Zeitpunkte  $t=0$  h,  $t=5$  h,  $t=21$  h

### 6.5.3 EIA der HPLC-Fractionen

Von den Proben  $t=0$  h, 4 h, 5 h und 21 h wurden die Fraktionen der HPLC-Läufe mittels EIA analysiert. Die Fraktionen wurden mittels Lyophilisator getrocknet, in je 100  $\mu$ l Wasser gelöst, so dass Doppelbestimmungen mit je 50  $\mu$ l Probenvolumen analog der Methode in 5.4.4 durchgeführt werden konnten.

In Abb. 6-20 bis Abb. 6-23 sind die Mengen IE in den jeweiligen Fraktionen grafisch über die HPLC-Ausschriebe gelegt worden, so dass ein direkter Vergleich UV-Absorption bei 242 nm zu Immunoreaktivität möglich ist.

In der Probe  $t=0$  h zeigt sich erwartungsgemäß keine Immunoreaktivität der Fraktionen, die Proben  $t=4$  h und  $t=5$  h wiesen an den Absorptionsmaxima, die von ihrer RT 20E entsprechen, auch eine entsprechende Immunoreaktivität der Fraktionen auf.

In der Probe  $t=21$  h zeigt sich eine diffus verteilte Immunoreaktivität in den Fraktionen. Im Bereich der in 6.5.2 festgestellten UV-Absorptionsmaxima „1“ und „2“ ließ sich zwar eine schwache Immunoreaktivität feststellen, diese war jedoch nicht ausschließlich auf den Bereich der RT dieser Maxima beschränkt. Ein Maximum der Immunoreaktivität zwischen einer Retentionszeit von 3 bis 4 Minuten bei gleichzeitig geringer UV-Absorption ist jedoch auffällig.

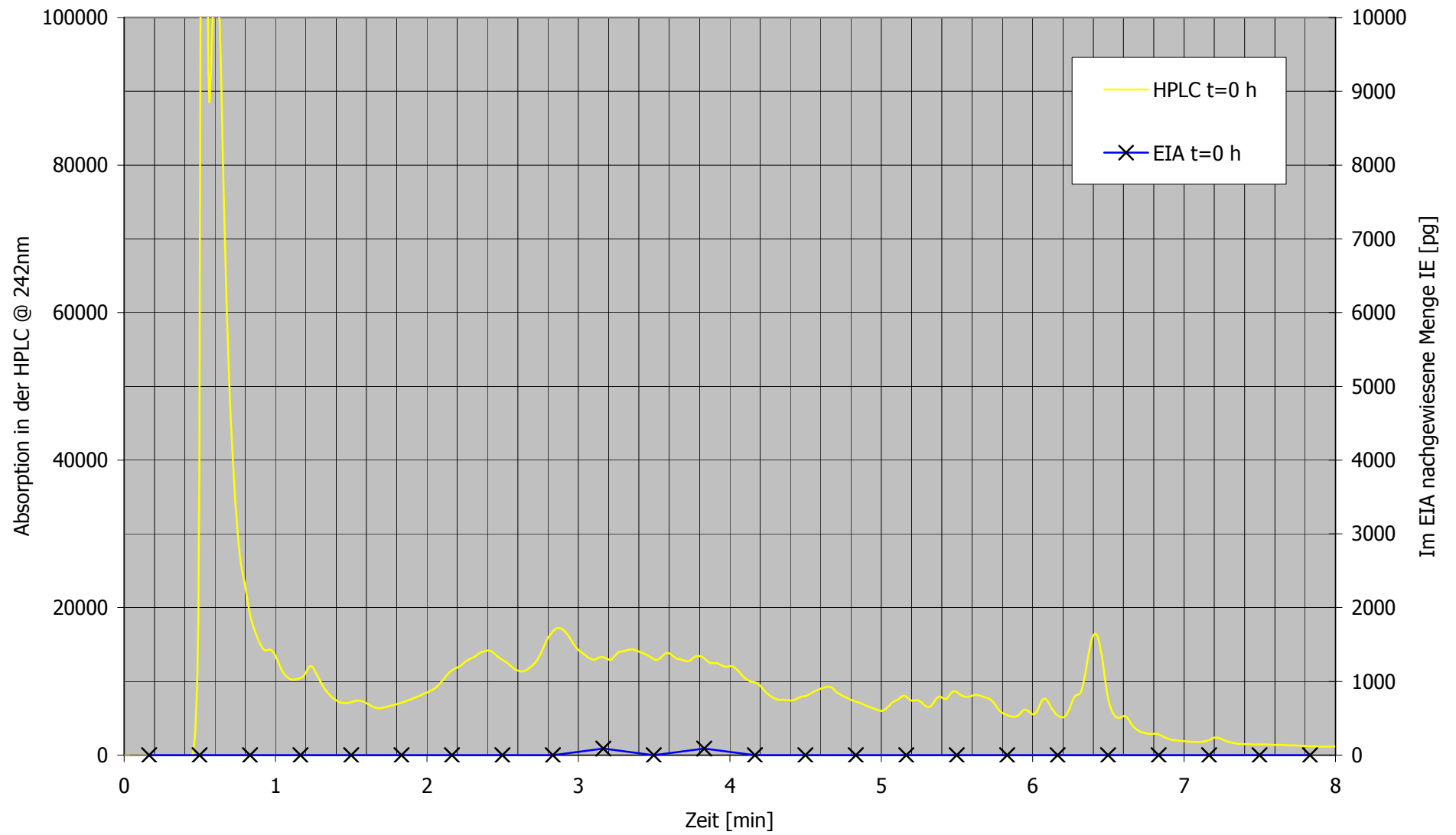


Abb. 6-20: EIA der HPLC-Fractionen bei  $t=0$  h

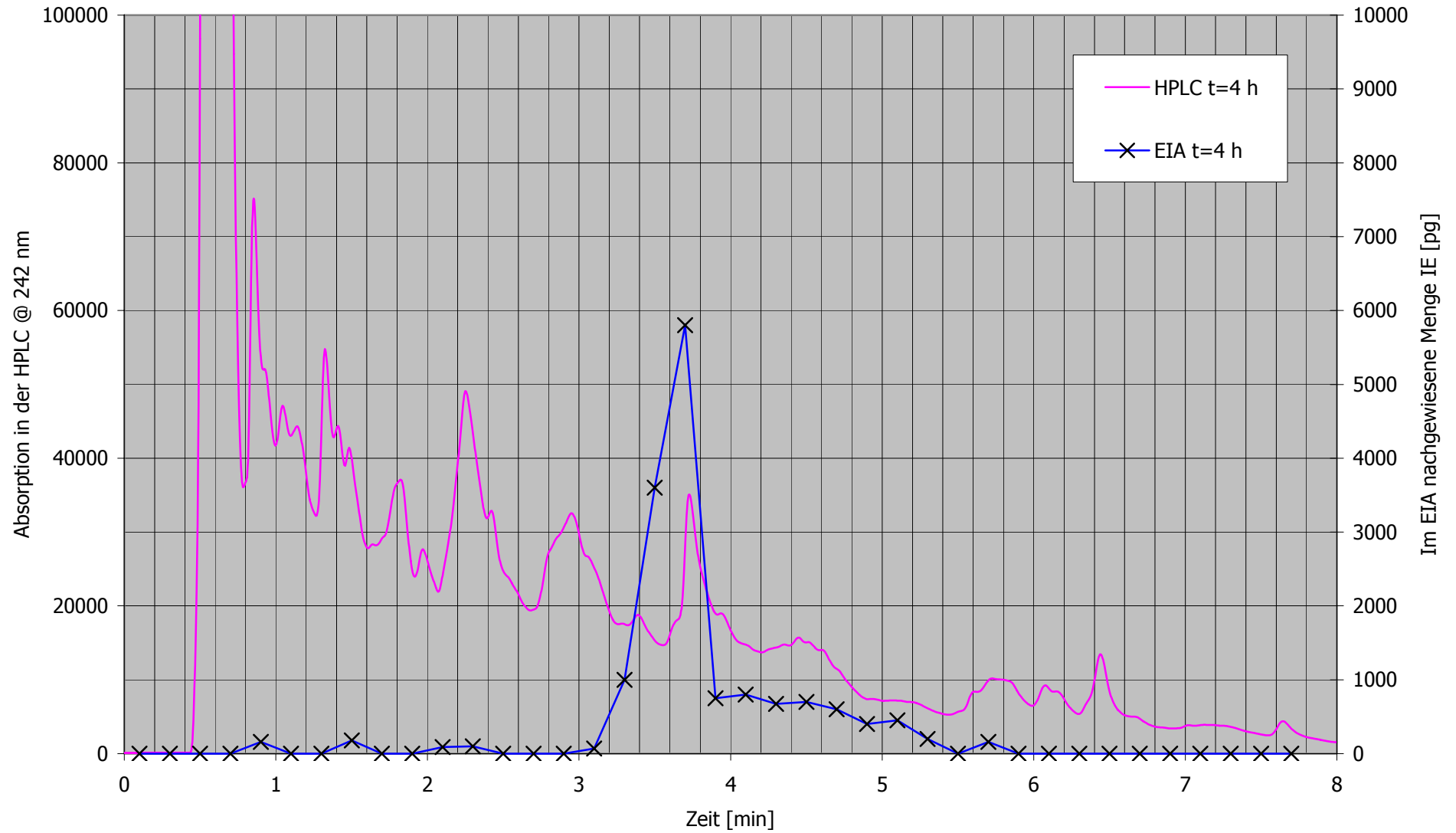


Abb. 6-21: EIA der HPLC-Fractionen bei  $t=4$  h



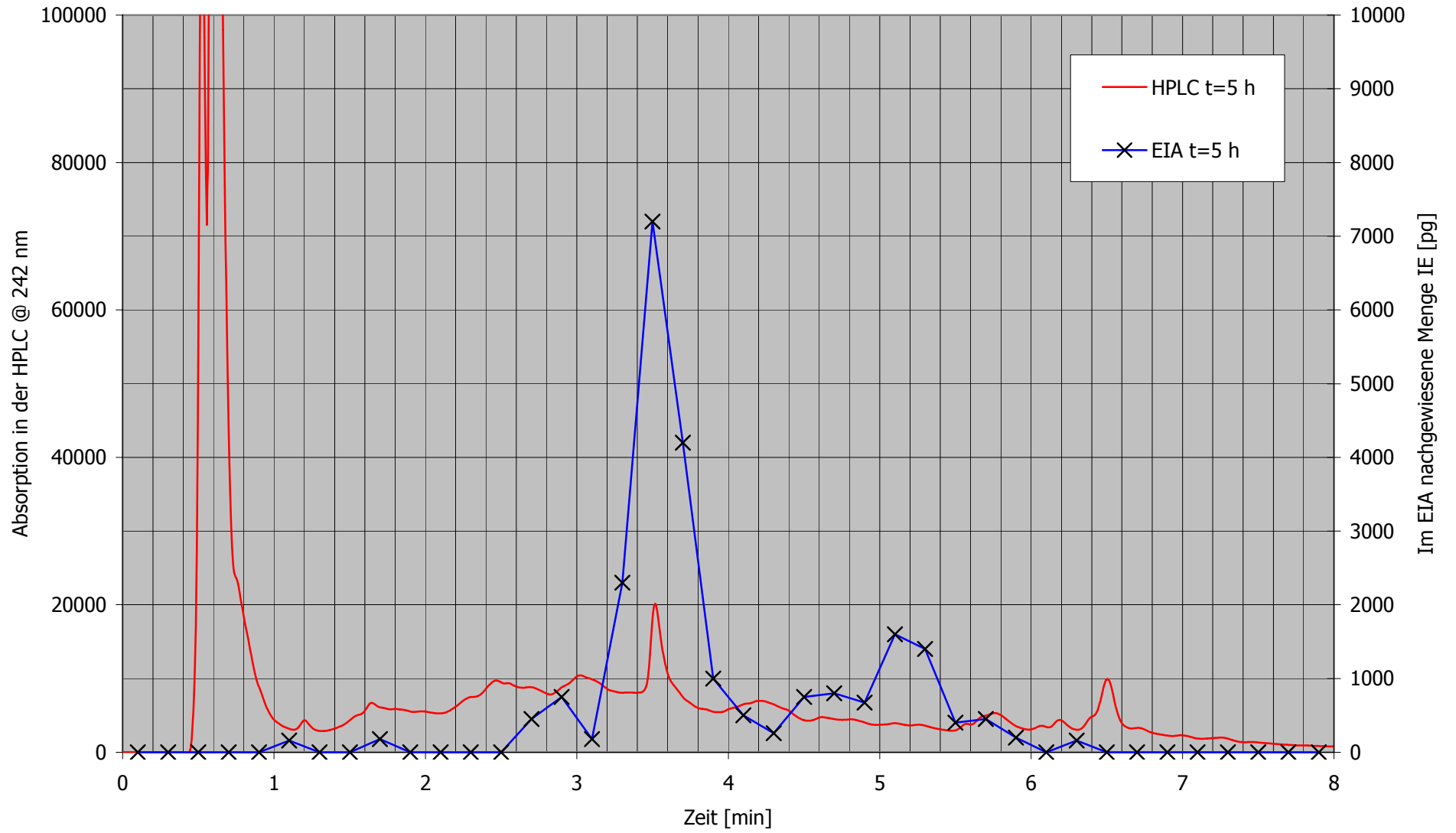


Abb. 6-22: EIA der HPLC-Fractionen bei t=5 h

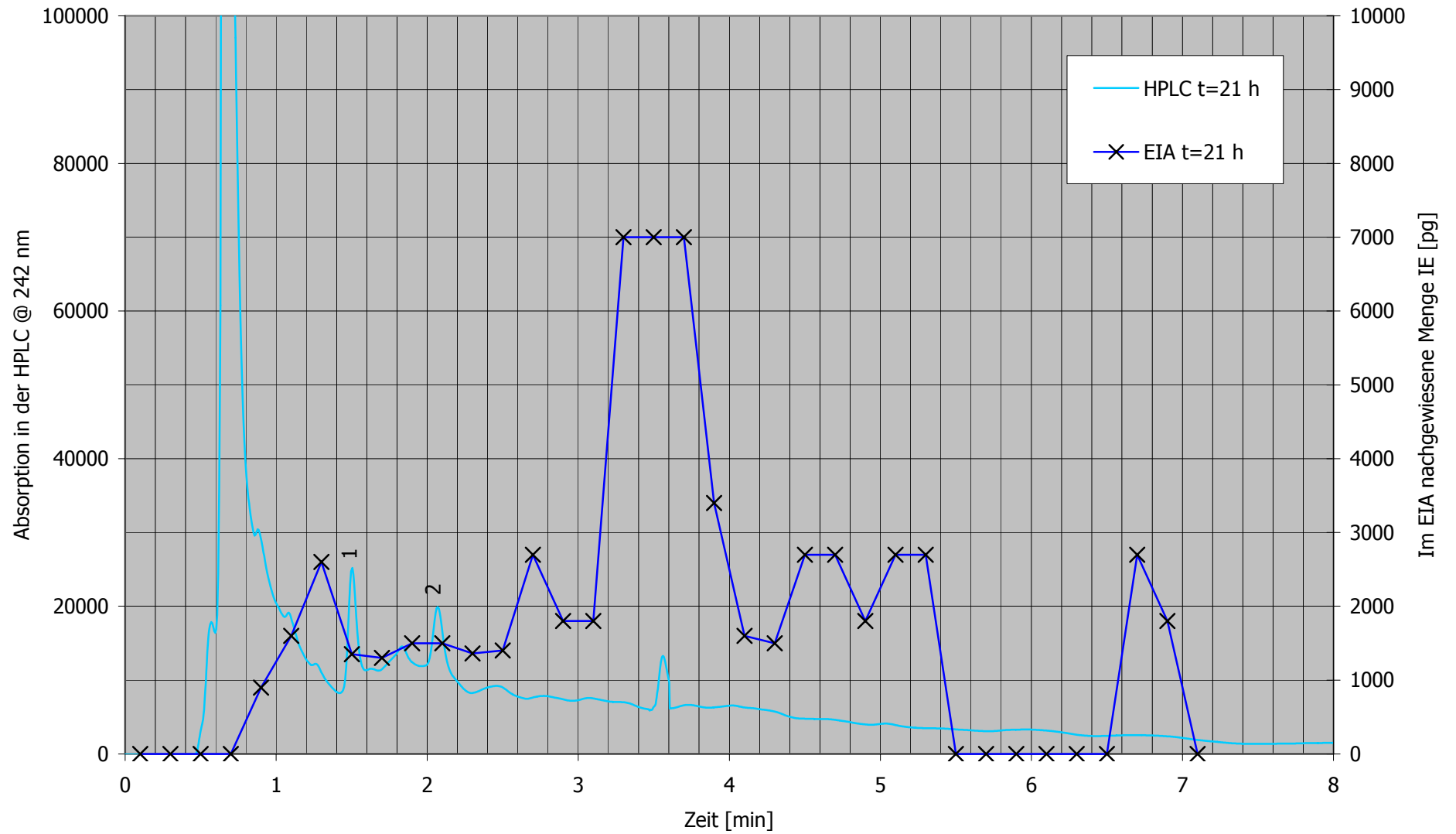


Abb. 6-23: EIA der HPLC-Fractionen bei t=21 h

#### 6.5.4 LC/MS

Die Urinproben vor Ecdysteroid-Einnahme und die Urinproben 4, 5 und 21 Stunden nach Ecdysteroid-Einnahme wurden per LC/MS untersucht.

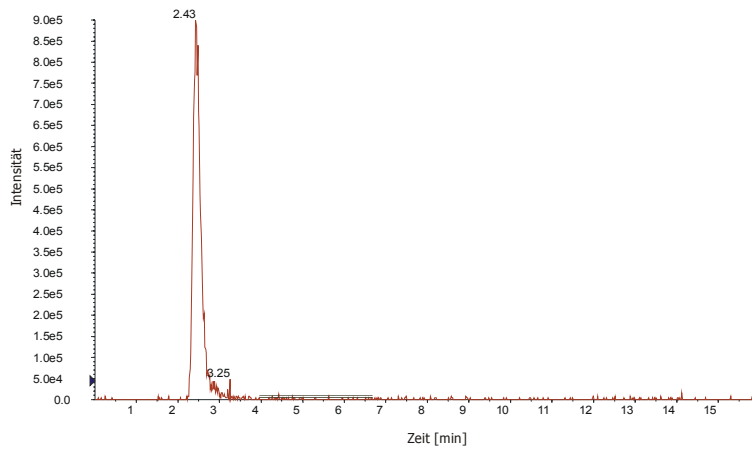
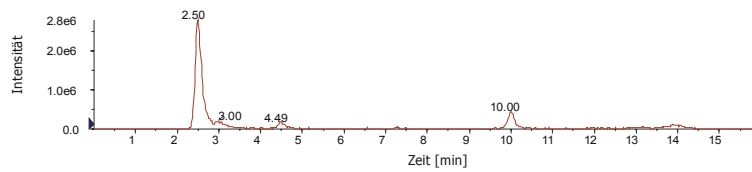
Bei der Analyse der Urinprobe **vor Ecdysteroid-Einnahme** wurden SIM-Analysen folgender m/z-Verhältnisse durchgeführt: 449, 463, 465, 467, 479, 481, 497. Von den Maxima wurden jeweils MS/MS-Analysen angefertigt. In keiner dieser Analysen war ein Massenspektrogramm, welches 20E entspricht, zu sehen. Auch die anderen in 6.1.4 getesteten Ecdysteroid-Standards waren nicht nachzuweisen. Somit kann es als unwahrscheinlich gelten, dass sich vor dem Versuch Ecdysterole in nennenswerter Konzentration im Blut befanden. Dies bestätigt die Resultate aus 6.5.2 und 6.5.3.

SIM-Analysen der Urinprobe **vier Stunden nach Einnahme** von 20E wurden bei folgenden m/z-Verhältnissen durchgeführt: 427, 429, 431, 433, 435, 445, 447, 449, 451, 463, 465, 467, 469, 479, 481, 483, 491, 493, 495, 497. Im Rahmen dieser Analysen ließ sich 20E eindeutig nachweisen (s. Abb. 6-24). Dies ist wie folgt zu begründen:

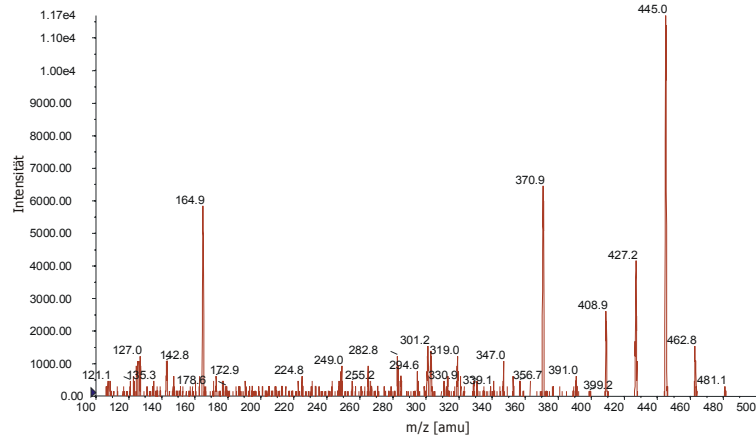
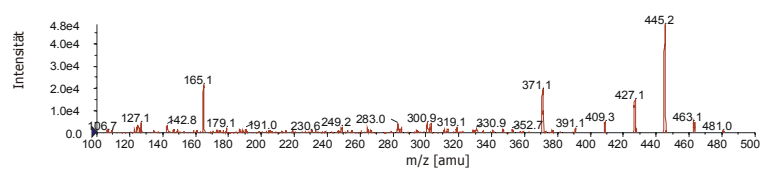
- Im SIM-Modus bei m/z 481 hat es die gleiche Retentionszeit wie 20E (vgl. 6.5.2)
- Das Zerfallsmuster im MS/MS-Modus ist identisch mit dem des 20E-Standards

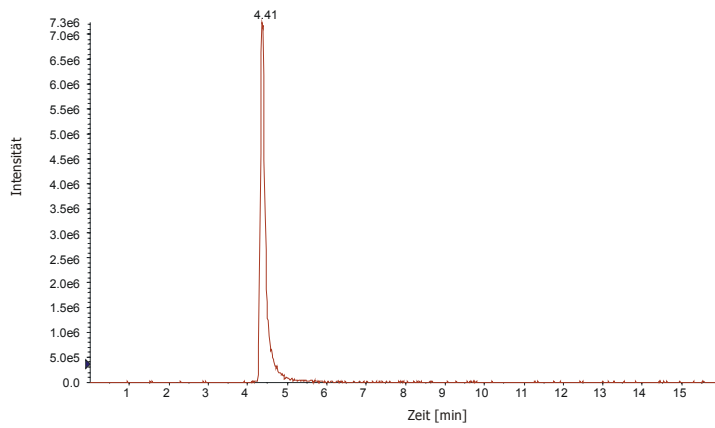
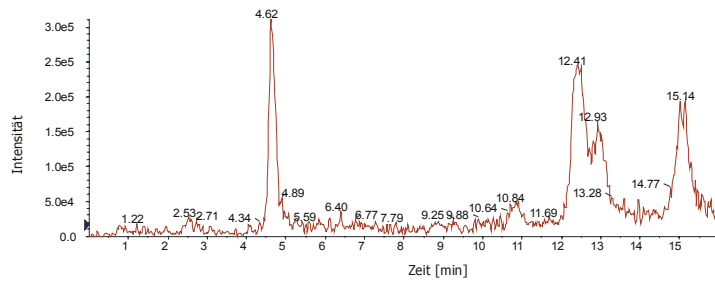
Ferner ließ sich die Substanz 14d20E nachweisen (s. Abb. 6-25), dies ist wie folgt zu begründen:

- Im SIM-Modus bei m/z 465 hat die Substanz die gleiche Retentionszeit wie 14d20E (vgl. 6.5.2)
- Das Zerfallsmuster im MS/MS-Modus ist identisch mit dem des 14d20E-Standards

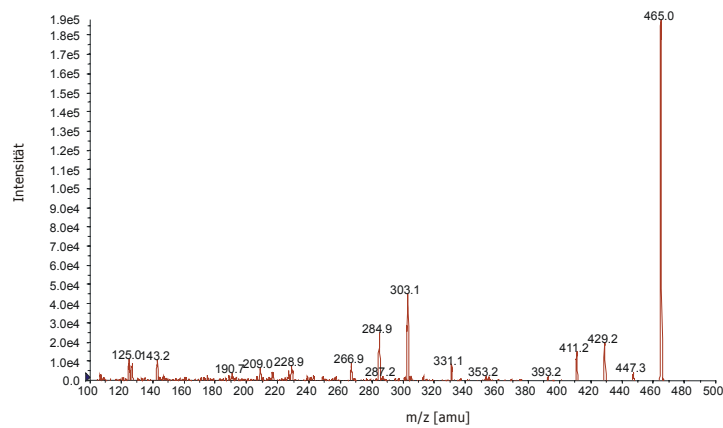
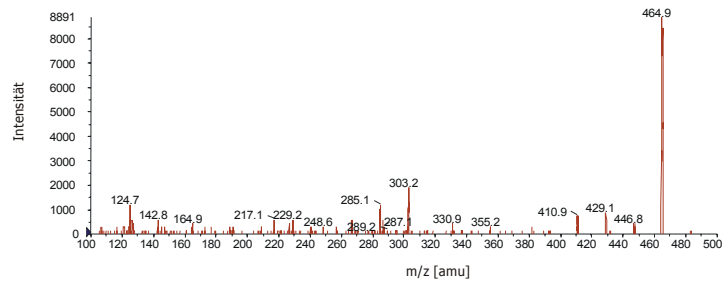
SIM des 20E-Standards bei  $m/z=481$ SIM der Urinprobe  $t=4$  h bei  $m/z=481$ 

MS/MS des 20E-Standards von 2,295 bis 2,714 min

MS/MS der Urinprobe  $t=4$  h von 2,362 bis 2,680 minAbb. 6-24: LC/MS von 20E und der Urinprobe  $t=4$  h bei  $m/z=481$ , Methode „b“

SIM des 14d20E-Standards bei  $m/z=465$ SIM der Urinprobe  $t=4$  h bei  $m/z=465$ 

MS/MS des 14d20E-Standards von 4,236 4,559 min

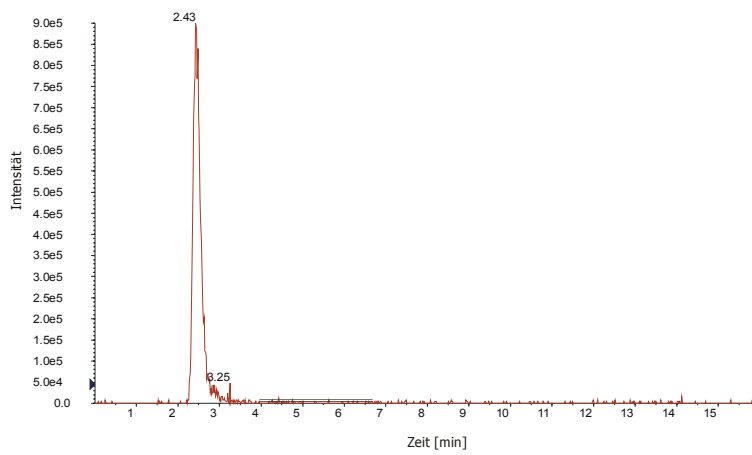
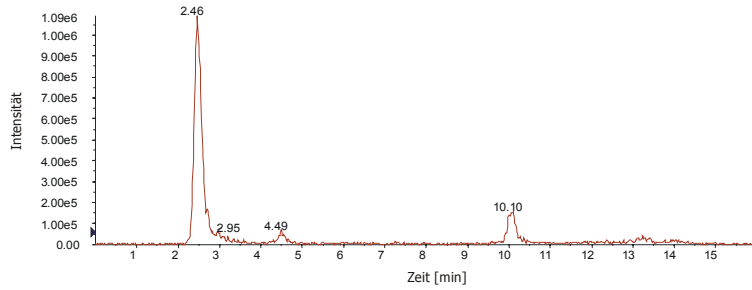
MS/MS der Urinprobe  $t=4$  h von 4,422 bis 4,858 minAbb. 6-25: LC/MS von 14d20E und der Urinprobe  $t=4$  h bei  $m/z=465$ , Methode „b“

Die SIM-Analyse der Probe **fünf Stunden nach Einnahme** von 20E wurde bei folgenden m/z-Verhältnissen durchgeführt: 427, 429, 431, 433, 445, 447, 449, 451, 463, 465, 467, 479, 481, 483, 491, 493, 495, 497. Im Rahmen dieser Analysen ließ sich 20E eindeutig nachweisen. Dies ist wie folgt zu begründen (s. Abb. 6-26):

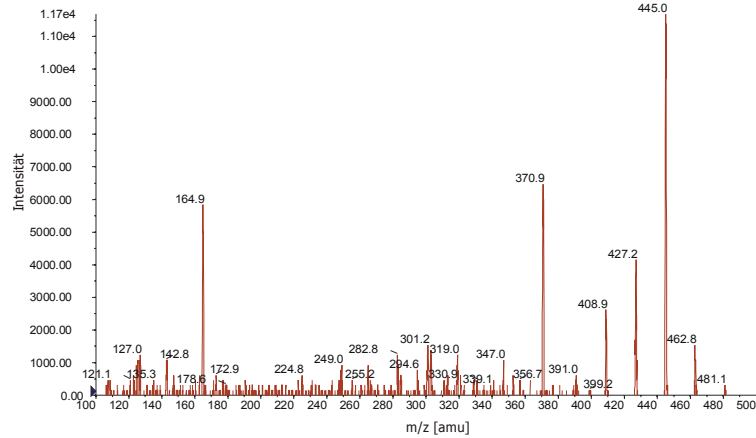
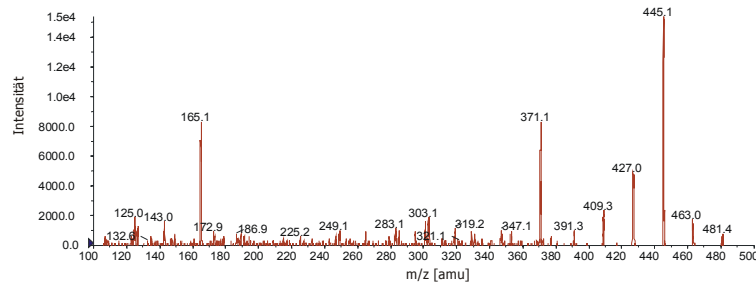
- Im SIM-Modus bei m/z 481 hat das fragliche Produkt die gleiche Retentionszeit wie 20E (vgl. 6.5.2)
- Das Zerfallsmuster im MS/MS-Modus ist identisch mit dem des 20E-Standards

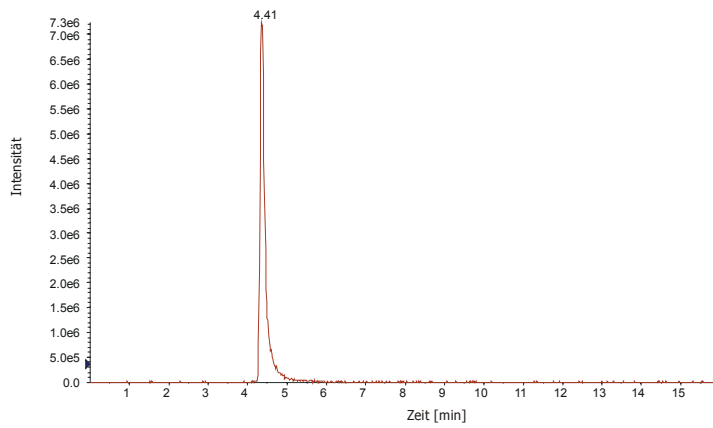
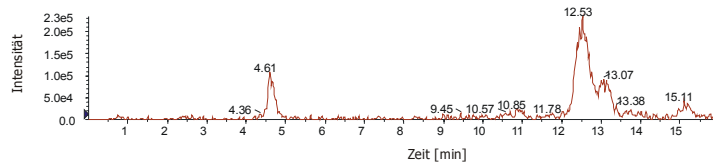
Ferner ließ sich die Substanz 14d20E nachweisen (s. Abb. 6-27), dies ist wie folgt zu begründen:

- Im SIM-Modus bei m/z 465 hat die Substanz die gleiche Retentionszeit wie 14d20E (vgl. 6.5.2)
- Das Zerfallsmuster im MS/MS-Modus ist identisch mit dem des 14d20E-Standards

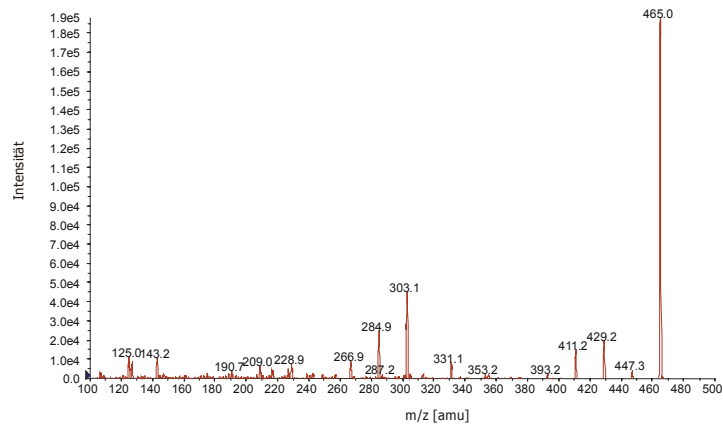
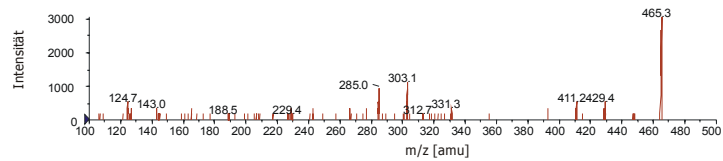
SIM des 20E-Standards bei  $m/z=481$ SIM der Urinprobe  $t=5$  h bei  $m/z=481$ 

MS/MS des 20E-Standards von 2,295 bis 2,714 min

MS/MS der Urinprobe  $t=5$  h von 2,312 bis 2,747 minAbb. 6-26: LC/MS von 20E und der Urinprobe  $t=5$  h bei  $m/z=481$ , Methode „b“

SIM des 14d20E-Standards bei  $m/z=465$ SIM der Urinprobe  $t=5$  h bei  $m/z=465$ 

MS/MS des 14d20E-Standards von 4,236 bis 4,559 min

MS/MS der Urinprobe  $t=5$  h von 4,4489 bis 4,824 minAbb. 6-27: LC/MS von 14d20E und der Urinprobe  $t=5$  h bei  $m/z=465$ , Methode „b“



Die SIM-Analyse der Probe **21 Stunden nach Einnahme** von 20E wurde bei folgenden m/z-Verhältnissen durchgeführt: 429, 431, 433, 435, 445, 447, 449, 451, 463, 465, 467, 479, 481, 483, 497. Im Rahmen dieser Analysen ließ sich ebenfalls 20E eindeutig nachweisen. Dies ist wie folgt zu begründen:

- Im SIM-Modus bei m/z 481 hat das fragliche Produkt die gleiche Retentionszeit wie 20E (vgl. 6.5.2)
- Das Zerfallsmuster im MS/MS-Modus ist identisch mit dem des 20E-Standards

Abb. 6-28 zeigt den direkten Vergleich zwischen dem 20E-Standard und der Urinprobe nach vier Stunden.

Ein Nachweis von 14d20E wie vier und fünf Stunden nach 20E-Einnahme konnte nicht erbracht werden

Jedoch fiel ein Produkt bei m/z=497 auf, das im MS/MS unter anderem ein Fragment mit m/z=165 enthielt. Dieses Fragment könnte durchaus einer Seitenkette von 20E entsprechen, denn es ist auch beim 20E-Standard zu sehen. Außerdem liegt bei Makisteron ein Fragment mit m/z=179 vor, was zur zusätzlichen Methylgruppe an der Seitenkette passt. Bei diesem Produkt wäre also die Seitenkette gegenüber 20E wahrscheinlich unverändert. Die Ausschriebe sind in Abb. 6-29 dargestellt.

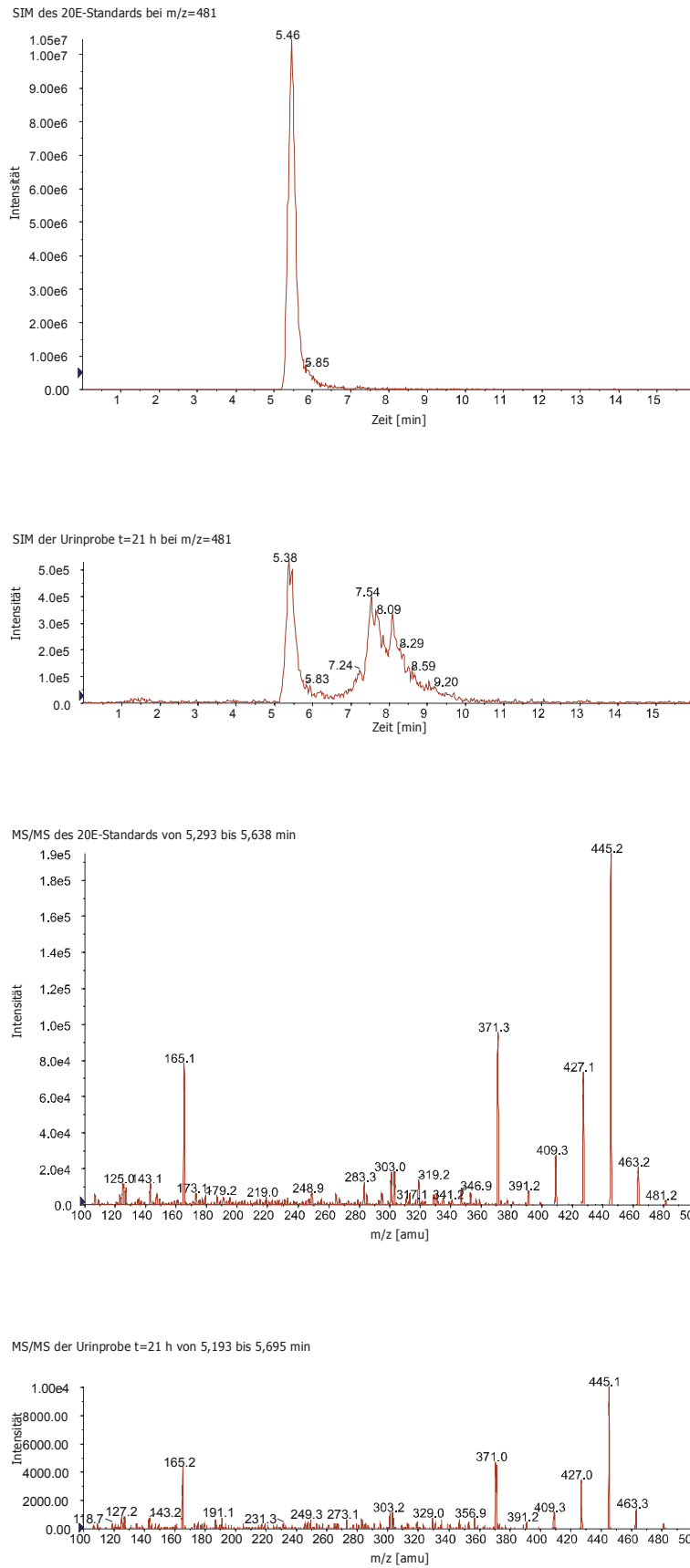


Abb. 6-28: LC/MS von 20E und der Urinprobe  $t=21$  h bei  $m/z=481$ , Methode „a“

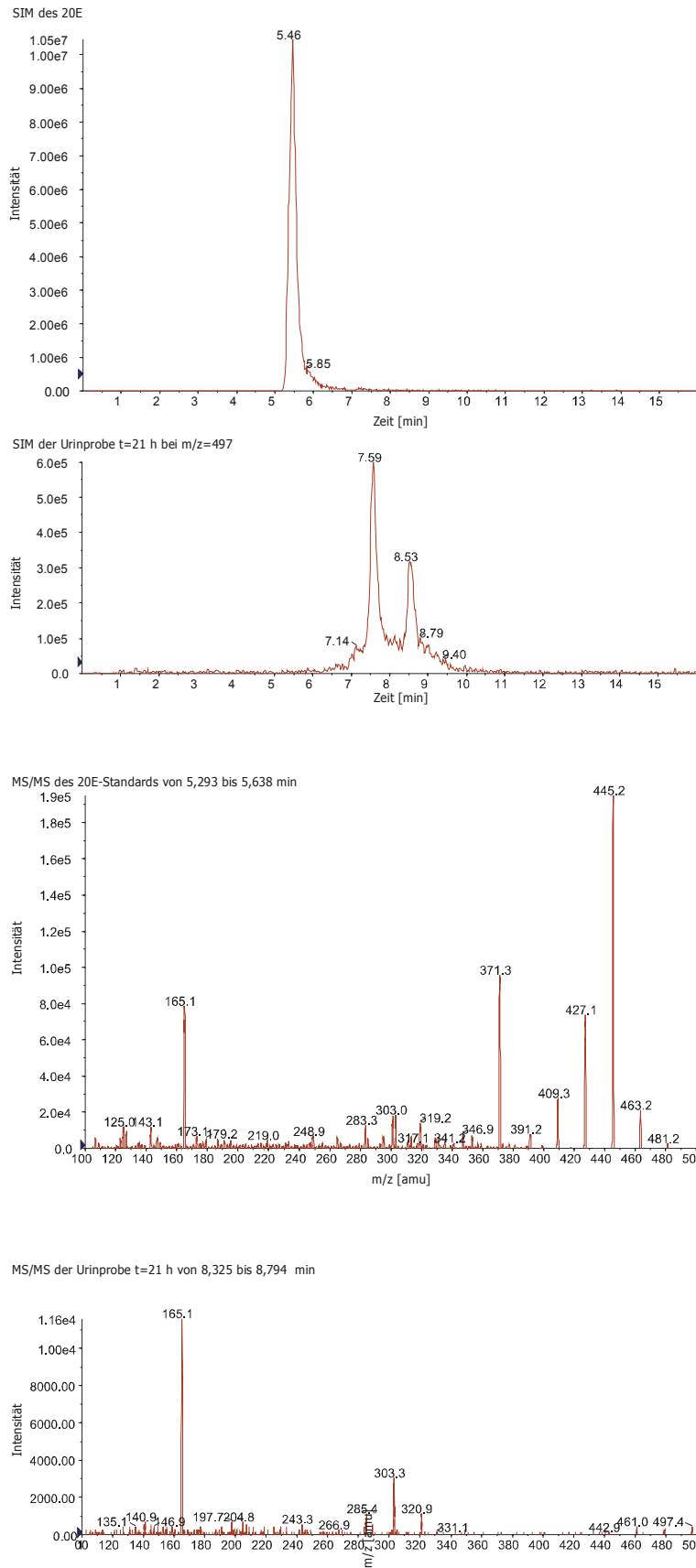


Abb. 6-29: LC/MS von 20E und der Urinprobe t=21 h bei m/z=497, Methode „a“

### 6.5.5 DC

Als Versuch, weitere Charakteristika der Ecdysteroide in den Proben zu erhalten, wurden Dünnschichtchromatographien einiger Proben angefertigt (vgl. Koolman und Spindler, 1977).

Trotz der Erfahrungen aus den Vorversuchen wurden als Laufmittel noch folgende Gemische getestet:

- Chloroform/Methanol 50:50, 80:20, 100:0
- Chloroform/Ethanol 50:50, 80:20, 100:0

Als optimal stellte sich wie in den Vorversuchen (vgl. 6.1.2) der Lauf mit Chloroform/Ethanol im Verhältnis 80:20 heraus. Als DC-Platten fanden Si-60 HPTLC-Platten des Typs Lichrospher® mit Fluoreszenzindikator (254 nm) Verwendung.

Untersucht wurden die Proben  $t=0$  h,  $t=3$  h,  $t=4$  h,  $t=5$  h. Hierzu wurde eine kleine Menge der Stammlösung analog 6.4.1 mit 1-Butanol ausgeschüttelt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese vierfach konzentriert im Vergleich zur Stammlösung in Wasser gelöst. Eine höhere Konzentration war nicht möglich, da ansonsten die Einzelsubstanzen am Startpunkt verharren, ohne von der mobilen Phase mitgenommen zu werden. Jeweils 10  $\mu$ l Probenvolumen wurden aufgetragen. Abb. 6-30 zeigt die Ergebnisse bei Färbung mittels  $H_2SO_4$ -Vanillin-Reagenz bzw. unter UV-Betrachtung bei 254 nm.

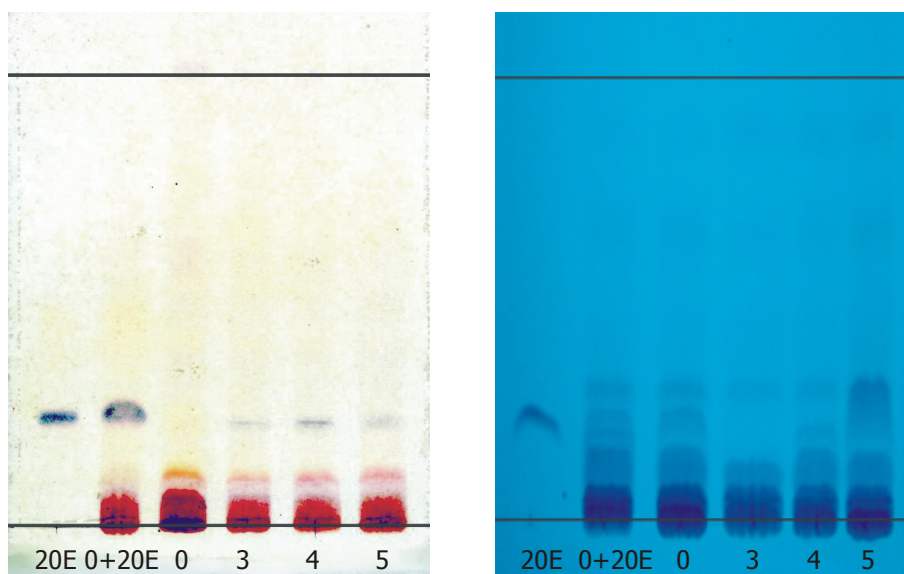


Abb. 6-30: DCs ausgewählter Proben bei Färbung mit  $H_2SO_4$  und Vanillin (links) und bei Betrachtung unter 254 nm (rechts)

In der  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Vanillin-Färbung ist 20E gut identifizierbar über die relativ spezifische Blaufärbung in Kombination mit der Retentionszeit. Die Darstellung unter UV-Beleuchtung zeigt leider kein verwertbares Ergebnis, diese Methode ist in diesem Fall nicht spezifisch genug, zu viele andere Substanzen scheinen in diesem Wellenlängenbereich um 254 nm zu absorbieren.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde außerdem die Probe  $t=21$  h analog untersucht. In der o.a. Konzentration wurde kein verwertbares Ergebnis erreicht, da die mobile Phase in dieser Probenkonzentration nicht vermochte, die Einzelsubstanzen zu transportieren. Wurde die Substanz niedriger konzentriert, zeigte sich lediglich ein Chromatogramm, das dem der Probe  $t=0$  h entsprach.

Somit konnte die DC lediglich den Verdacht des Vorliegens von 20E in den Proben  $t=3$  h,  $t=4$  h und  $t=5$  h erhärten, jedoch keine neuen Erkenntnisse hervorbringen.

## **7 Diskussion**

### **7.1 Zielsetzung**

Ziel der Arbeit war es, grundlegende pharmakologische Eigenschaften von 20-Hydroxy-Ecdyson im menschlichen Organismus aufzuklären, insbesondere die Pharmakokinetik und den Metabolismus. Hierfür galt es zudem, geeignete Nachweismethoden zu vergleichen und ggf. zu optimieren.

### **7.2 Bewertung der Befunde in Hinblick auf bisherige Erkenntnisse**

#### 7.2.1 Analyse von Ecdysteroiden und AAS in der Literatur

##### **Probenvorbereitung**

Die in der Literatur beschriebenen Schemata möglicher Extraktion und Probenvorbereitung für die Ecdysteroid-Analyse weichen zum Teil erheblich voneinander ab. Häufig empfohlen für die Extraktion von Ecdysteroiden aus biologischen Proben werden kurzkettige Alkohole (Girault et al., 1988; Lafont und Beydon, 1988; Morgan und Wilson, 1989; Sláma et al., 1993). Dieses Extraktionsverfahren wird auch für Aufbereitung von menschlichem Urin für den Nachweis von AAS angewandt (Gonzalo-Lumbreras und Izquierdo-Hornillos, 2000). Zur weiteren Aufbereitung von Ecdysteroidproben für empfindlichere Methoden wie HPLC bzw. LC/MS werden ganz überwiegend Festphasenextraktionssysteme wie z.B. Sep-Pak®-Kartuschen empfohlen (Girault et al., 1988; Lafont und Beydon, 1988; Morgan und Wilson, 1989).

##### **Geeignete Methoden zur Ecdysteroidanalyse - Chromatographie**

Bei den chromatographischen Verfahren sind GC, HPLC und DC die am weitesten verbreiteten Methoden.

Für die Analyse mittels HPLC wird ganz überwiegend die RP-HPLC mit RP-18-Kartuschen empfohlen. Bezüglich des Lösungsmittels besteht in der Literatur Konsens, dass Acetonitril für eine Gradientenelution geeignet ist. Für die Detektion per UV wird

meist die Wellenlänge 242 nm empfohlen (Lafont und Beydon, 1988; Morgan und Wilson, 1989).

Die Bedeutung der DC im analytischen Sinne ist mittlerweile gering, da sie in puncto Sensitivität und Objektivität den anderen Methoden weit unterlegen ist (Lafont und Beydon, 1988; Morgan und Wilson, 1989).

Für Screenings im Rahmen des Missbrauchs von AAS werden weitgehend GC und HPLC verwendet (Bowers, 1997; Gonzalo-Lumbreras und Izquierdo-Hornillos, 2000). Aber auch hier gelten HPLC-Systeme mit RP-18-Säulen als geeignet (Merck Applications, 2001).

### **Geeignete Methoden zur Ecdysteroidanalyse – Assays**

Für den Ecdysteroid-Nachweis existieren sowohl RIAs als auch EIAs. Die aktuellere Literatur sieht den EIA gegenüber dem RIA im Vorteil, da er bezüglich der Sensitivität gleichauf ist, bei jedoch einfacherer, schnellerer und sichererer Handhabung (Pascual et al., 1995).

### **Geeignete Chromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie-Systeme**

Ecdysteroiden und deren Derivate wurden in der Vergangenheit sowohl mit Gaschromatographie-gekoppelten Massenspektrometern (Morgan und Wilson, 1989; Tsitsimpikou et al., 2001) als auch mit HPLC-gekoppelten Massenspektrometern (Louden et al., 2002) durchgeführt. Aktuell wird jedoch die LC/MS deutlich bevorzugt, da die GCMS aufgrund der zahlreichen Alkoholgruppen der Ecdysteroiden eine Unmenge an Ionenprodukten hervorbringt, was die Interpretation insbesondere bei biologischen Gemischen erschwert (Le Bizec et al., 2002).

AAS werden ebenso mittels beider Methoden analysiert, wobei die GCMS bereits seit 1972 als Doping-Test Verwendung findet (Schänzer, 2001). Auch heute wird die GCMS in breiten Feldern der Doping-Analytik verwendet, jedoch geht auch hier der Trend zur LC/MS. Zum einen gilt der geringere Zeitaufwand als Vorteil. Zum anderen wird angeführt, dass die bei der GCMS stattfindenden Derivatisierungsprozesse sowohl falsch positive als auch falsch negative Resultate produzieren können (Maurer, 1998; Leinonen et al., 2002).

## 7.2.2 Analyse von Ecdysteroiden im Labor

### **Probenvorbereitung**

Generell war es im Rahmen der durchgeführten Versuche nachvollziehbar, dass die Festphasenextraktion für die Ecdysteroidanalyse gut geeignet ist. Hinzuzufügen ist jedoch, dass ein zusätzliches Ausschütteln mit 1-Butanol und Aqua bidest. bei nahezu gleicher Wiederfindungsrate eine deutliche Reduktion von Störfaktoren in der HPLC bewirken kann (vgl. 6.4). Ferner schien die relativ neue Festphasenextraktion Lichrolut® von Merck den Sep-Pak®-Röhrchen der Firma Waters (Sep-Pak®) überlegen zu sein im Sinne von reproduzierbareren Ergebnissen.

### **Geeignete Methoden zur Ecdysteroidanalyse - Chromatographie**

Für diesen Versuch kamen die DC und die HPLC in Frage. Die Gaschromatographie schied hier aus, da sie generell für die Metabolitensuche als wenig geeignet gilt und darüber hinaus auch nicht zur Verfügung stand.

Die DC war der HPLC - wie auch schon in der Literatur häufig angemerkt - unterlegen. Ihre Sensitivität war deutlich schlechter, die qualitativen Nachweismethoden ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -Reaktion und Erwärmen bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Vanillin-Reagenz) schlecht reproduzierbar.

Die HPLC gestaltete sich zusammen mit den oben angeführten Probenvorbereitungsschritten als sehr unproblematisch. Durch die Verwendung einer neuen Generation von HPLC-Säulen waren im Vergleich zu den klassischen RP-18-Säulen erhöhte Flussgeschwindigkeiten möglich. In den Vorversuchen zeigte sich sogar ein leicht verbessertes Trennverhalten. Der Nachweis über UV-Extinktion bei 242 nm wurde nach photometrischer Analyse einiger Ecdysteroiden und humaner Steroide (vgl. 6.1.1) übernommen. Das Gradientenprogramm mit Acetonitril wurde aus der Literatur übernommen, da es als sehr etabliert gilt und keine Hinweise vorliegen, dass eine Änderung von Vorteil sein könnte. Für die Analyse von humanen Steroiden wurde das Programm nur insofern angepasst, Aufzeichnungen auch im Bereich höherer Acetonitril-Konzentrationen (70% statt sonst 40%) durchzuführen, bzw. den Wellenlängenbereich im Falle von Estradiol auf 272 nm festzulegen.

Überlappungen mit humanen Steroiden sind zwar im Rahmen der UV-Extinktion möglich, jedoch unterscheiden sich die humanen Steroide in ihren Retentionszeiten von den Ecdysteroiden. Andererseits gilt es zu beachten, dass dies auf ein möglicherweise unbekanntes Ecdysteroid nicht zutreffen muss.



### **Geeignete Methoden zur Ecdysteroidanalyse - Immunoassays**

Einige Gründe sprachen für den Einsatz eines EIAs statt eines RIAs: Im Labor stand ein bereits etablierter EIA zur Verfügung. Ferner war ein Versuch am Menschen mit radioaktiv markiertem 20E (z.B. Tritium-markiert) nicht denkbar. Außerdem sieht die neuere Literatur den EIA gegenüber dem RIA im Vorteil.

Problematisch in diesem Zusammenhang waren die über 20 Jahre alten Anti-Ecdysteroid-Antikörper, die je nach Charge eine schlechte Affinität für Ecdysteroide aufwiesen und somit mitunter eine geringe Trennschärfe bezüglich der nachgewiesenen Ecdysteroid-Mengen. Dieses Problem konnte jedoch nach umfangreicher Ermittlung gut geeigneter Chargen mittels quantitativer Ecdysteroidstandards weitgehend behoben werden.

Als problematisch ist sicherlich ebenso zu sehen, dass sowohl die Anti-Ecdysteroid-Antikörper als auch der Tracer nicht beliebig verfügbar sind, so dass der EIA momentan für sehr umfangreiche Untersuchungen bzw. Screening-Untersuchungen nicht die Methode erster Wahl darstellen kann.

### **Chromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie-Systeme**

Bei der Metabolitenanalyse die LC/MS einer GCMS-Analyse vorzuziehen (s.o.). Weitere Überlegungen bzgl. der verwendeten Geräte ergaben sich nicht, da es nur ein LC/MS-System in Marburg gibt, das für diese Untersuchung kurzfristig zur Verfügung stand. Vorversuche zeigten, dass das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit einer APCI-Ionenquelle für die Analyse von Ecdysteroiden in biologischen Proben gut geeignet ist. Die Methodenoptimierung erfolgte durch Herrn Dr. Schweer, der sich insbesondere mit der Massenspektrometrie an der Kinderklinik der Philipps-Universität Marburg befasst.

#### **7.2.3 Pharmakokinetik von Ecdysteroiden im Säugetierorganismus in der Literatur**

Die Resorption von Ecdysteroiden bei oraler Gabe erfolgt unvollständig und innerhalb von acht Stunden, dies wurde in 3.2.2 schon dargelegt. Sowohl für diagnostische Zwecke, wie sie beispielsweise als Doping-Test denkbar wären, als auch für die weitere Untersuchung möglicher Metabolite ist die Kenntnis der Pharmkokinetik bzw. des Ausscheidungsprofils von Ecdysteroiden nötig.

Mittels RIA wurden bereits kinetische Profile von 20E in Serum und Urin beim Menschen nach oraler Aufnahme untersucht. Hierbei zeigte sich jeweils ein eingipfliger Verlauf mit Maxima zwei Stunden (Serum) bzw. drei Stunden (Urin) nach oraler Aufnahme. Die Gesamtwiederfindungsrate im Urin betrug unter 1% (Simon und Koolman, 1989). In der an der Maus durchgeführten Studie wurden 11% des oral verabreichten Tritium-markierten 20E wiedergefunden. Eine Aussage bzgl. des kinetischen Verlaufs der renalen Ausscheidung wurde nicht getroffen (Hikino et al., 1972).

#### 7.2.4 Pharmakokinetik von 20E im Menschen im Rahmen dieses Versuchs

Die in diesem Versuch erhaltenen Resultate sind großteils mit denen der Literatur in Einklang zu bringen. Das Maximum der Ausscheidung von IE war nach fünf Stunden zu beobachten, somit ist wahrscheinlich, dass der Großteil der Resorption binnen dieser Zeit erfolgt ist.

Nicht konform gehen die Ergebnisse in puncto des Ausscheidungsprofils mit den Resultaten von Simon und Koolman aus 1989. Dort wurde bis 24 Stunden nach Aufnahme der Ecdysteroidgehalt im Urin gemessen und nur ein Maximum bei drei Stunden festgestellt. Hier konnte jedoch ein zweigipfliges Ausscheidungsprofil festgestellt werden mit einem zweiten Ausscheidungsgipfel 21 Stunden nach Aufnahme. Zu beachten ist zum einen, dass hier mit einem EIA gearbeitet wurde, in der zitierten Arbeit mit einem RIA. Ferner gilt es zu beachten, dass sowohl Resorption als auch Metabolismus jeweils großen Schwankungen unterliegen können und ein Einzelexperiment hier keine letzte Gewissheit geben kann.

Bezüglich der Gesamtwiederfindungsrate von 2,6-9% der aufgenommenen Menge 20E als IE im Urin liegt wiederum eine Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen der Literatur vor. Dies stärkt die Annahme, dass 20E überwiegend biliär ausgeschieden wird.

Bei allen Untersuchungen zur Pharmakokinetik ist zu beachten, dass die Nachweise per EIA, RIA und Autoradiographie erfolgten. Dies bedeutet, dass die nachgewiesene Substanz auch schon metabolisch verändert sein könnte. Denkbar wären Veränderungen in folgenden Organen / Kompartimenten:

- Gastro-Intestinal-Trakt: Umwandlung durch Mikroorganismen der Darmflora
- Leber: Umwandlung durch hepatozelluläre Enzyme
- Serum: Umwandlung durch Serumenzyme

### 7.2.5 Metabolismus von Ecdysteroiden im Säugetierorganismus in der Literatur

Der Metabolismus von Ecdysteroiden wurde in einigen Arbeitsgruppen bereits untersucht. Bei Versuchen mit Tritium-markiertem E wurden drei Metabolite im Verlauf von sechs Tagen nach E-Gabe in Urin und Fäzes identifiziert:

**14-Desoxyecdyson, 2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,22(R),25-pentahydroxy-5 $\beta$ cholestan** und **2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,22(R),25-pentahydroxy-5 $\beta$ cholestan**; Hypothesen über den Weg der Metabolisierung wurden ebenfalls erstellt (s. Abb. 7-1). Der Nachweis erfolgte mittels HPLC (über UV-Absorption und Radioaktivitätsmessung) und mittels NMR-Spektroskopie. Anzumerken ist, dass diese Art der Metabolisierung für Steroidhormone beim Menschen unüblich ist, vgl. 3.1.1.

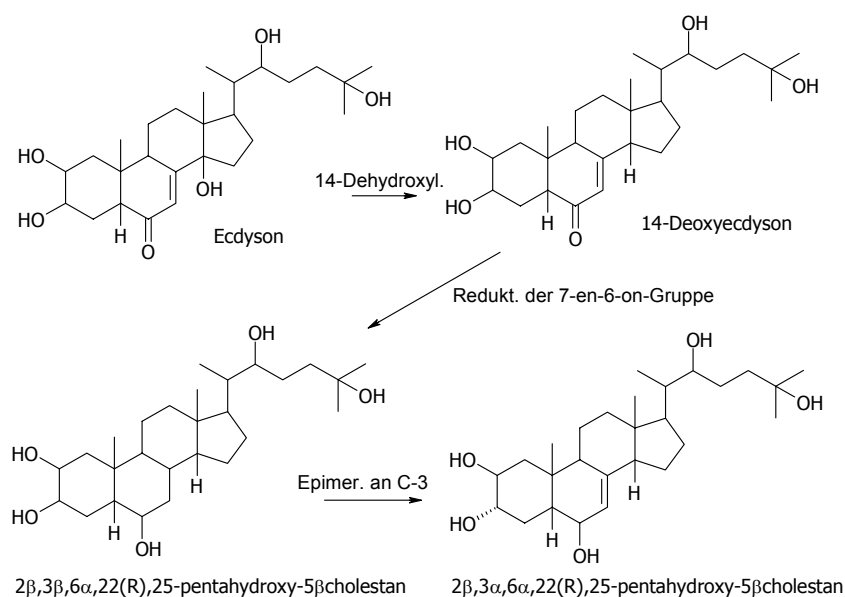


Abb. 7-1: Metabolisierungsweg von E im Urin von Mäusen nach Girault et al., 1988

In den neunziger Jahren wurde eine Studie publiziert, bei der Urin von Ratten, denen 20E appliziert wurde, analysiert wurde. Hierbei sind neben 20E folgende Substanzen gefunden worden: **2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,14 $\alpha$ ,20,25-pentahydroxy-5 $\beta$ cholest-7-en**, **2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,14 $\alpha$ ,20,25-pentahydroxy-5 $\beta$ cholest-7,22-dien** und **2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,14 $\alpha$ ,20,25-pentahydroxy-5 $\beta$ cholestan** (s. Abb. 7-2). Der Nachweis erfolgt per HPLC und Infrarot- sowie Massenspektrometrie. Hypothesen über mögliche Wege der Metabolisierung wurden nicht dargelegt (Ramazanov et al., 1996).

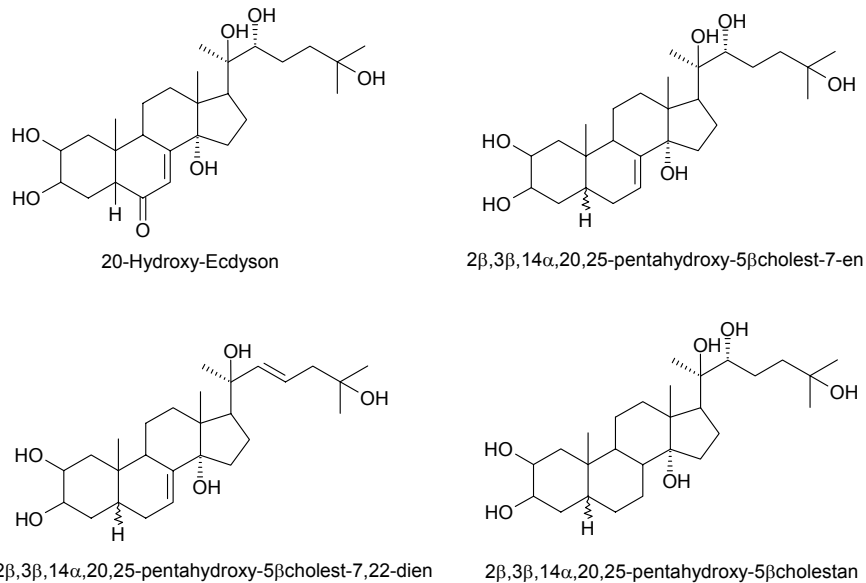


Abb. 7-2: 20E und dessen Metabolite im Urin von Ratten nach Ramazanov et al., 1996

Eine aktuellere Publikation schildert die Analyse von Urinproben eines Probanden, dem 20 mg 20E oral appliziert wurden. Als Methoden wurden Gaschromatographie und Massenspektrometrie verwendet. Die Arbeitsgruppe fand neben der Ausgangssubstanz zwei Metabolite des 20E, nämlich **2-Desoxy-20E** und **Desoxy-E**. Die Position der Dehydroxylierung konnte bei E zum Zeitpunkt dieses Artikels nicht definitiv ermittelt werden, in Frage kommen Dehydroxylierung an C-2, C-3 und C-14 (Tsitsimpikou, 2001; s. Abb. 7-3). Auch hier ist zu beachten, dass Dehydroxilierungen beim Menschen nicht zu den typischen Metabolisierungswegen der Steroidhormone gehören.

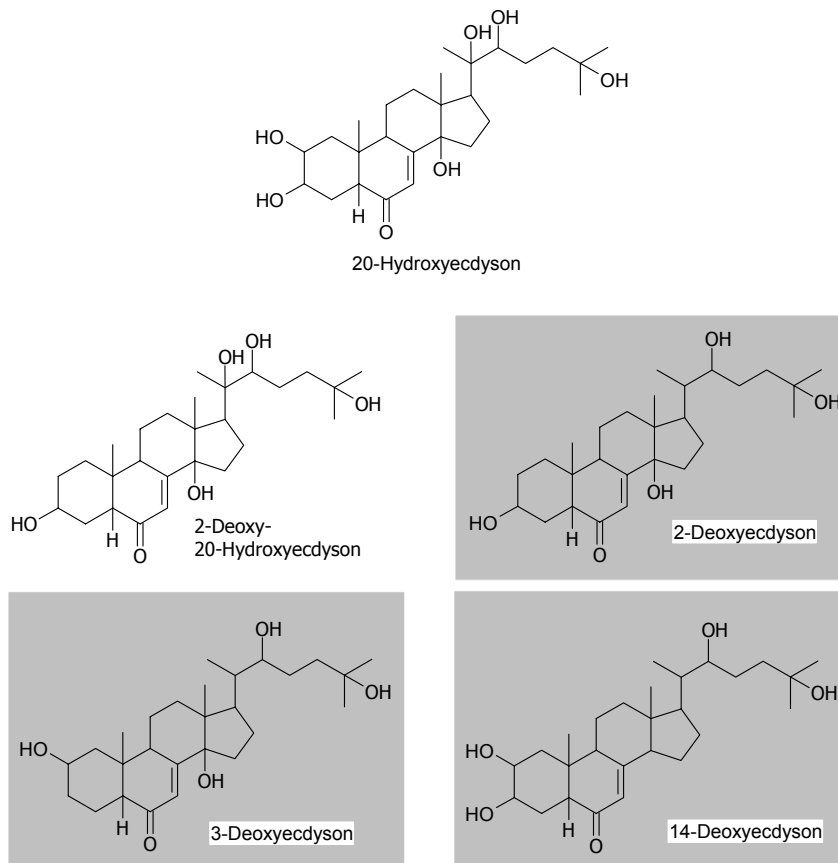


Abb. 7-3: 20E und dessen Metabolite im menschlichen Urin nach Tsitsimpikou et al., 2001; die grau hinterlegten Strukturen sind jeweils als mögliche Desoxy-E-Varianten zu betrachten

Im Labor der AG Koolman wurde ebenfalls bereits in der Vergangenheit Urin eines Probanden untersucht, der 20E oral appliziert bekommen hatte. Verwendung fanden hierbei HPLC und EIA. Als Resultat fand man lediglich die Ausgangssubstanz wieder. Ferner zeigten sich im EIA erhöhte Spiegel immunreaktiver Ecdysteroiden nach Inkubation mit  $K_2CO_3$ , was den Verdacht weckte, dass es zur Konjugatbildung von Ecdysteroiden gekommen sein könnte. Dies konnte jedoch nicht stichhaltig bewiesen werden (Simon, 1988; Simon und Koolman, 1989).

Generell ist zu sagen, dass die vermuteten Wege des Abbaus von 20E nicht den klassischen Abbauwegen der humanen Steroide entsprechen. Abgesehen von dem Schritt der 14-Dehydroxilierung, den sowohl Girault et al. 1988 und Tsitsimpikou bei 2001 feststellten, ist auch kein Konsens bezüglich des 20E-Metabolismus zu sehen.

### 7.2.6 Metabolismus von 20E im Menschen im Rahmen dieses Versuchs

Im Rahmen dieser Studie gelang es, 14d20E als Metabolit von 20E nachzuweisen. Dies erfolgte über LC/MS-Analyse der Proben vier bzw. fünf Stunden nach Einnahme.

Dieser Fund ist durchaus im Einklang mit der Literatur, da die 14-Dehydroxilierung auch schon in anderen Säugetieren beobachtet wurde. Unklar ist jedoch, wo diese Umwandlung im Menschen stattfindet, zumal die Dehydroxilierung keine gängige Reaktion des Steroidkatabolismus ist. Was die Ausscheidung angeht, ist sie sogar als kontraproduktiv zu bewerten, da das Produkt apolarer als die Ausgangssubstanz ist. Quantitativ gesehen ist anzumerken, dass halb so viel 14d20E wie 20E nach vier bzw. fünf Stunden nachgewiesen werden konnte.

20E konnte im Urin ebenfalls nachgewiesen werden (per HPLC, EIA-Analyse der HPLC-Fractionen und LC/MS). Dies steht ebenfalls im Einklang zur vorliegenden Literatur.

Nicht so evident erscheint der Nebenbefund, dass wahrscheinlich ein 20E-Abkömmling mit einer Massenzunahme von 16 bei unveränderter Seitenkette in der Urinprobe nach 21 Stunden mittels LC/MS gefunden wurde (vgl. Abb. 6-29). Angesichts der Massenzunahme von 16 käme eine Hydroxilierung in Frage. Dies wäre vor dem Hintergrund der bisherigen Literatur ungewöhnlich, jedoch sind Hydroxilierungen beim Menschen typische Reaktionen des Steroidkatabolismus, sie bedingen eine höhere Polarität der Substanz und somit eine erleichterte Ausscheidung aus dem Organismus. Quantitativ betrachtet machte der fragliche Metabolit die Hälfte des in der Probe nach 21 Stunden gefundenen 20E aus. Der fragliche Metabolit eluierte deutlich später als 20E in der LC/MS. Mittels UV-Detektion war er in der konventionellen HPLC nicht nachweisbar. Jedoch zeigte sich im entsprechenden RT-Bereich noch ein Anstieg der Immunoreaktivität der Fraktionen. Somit könnte neben der Hydroxilierung eine Veränderung im Bereich der chromophoren Gruppe stattgefunden haben.

Für Unklarheit sorgt ferner folgender Befund: Die HPLC der Urinprobe nach 21 Stunden zeigte eine sehr hohe Immunoreaktivität im Bereich der RT von 20E (s. Abb. 6-23) bei jedoch sehr geringer UV-Absorption. Dies könnte ebenfalls als ein Hinweis auf Veränderungen im Bereich der chromophoren Gruppe gewertet werden. Dieser Verdacht wurde auch schon durch Publikationen von Girault et al. 1988 und Ramazanov et al. 1996 geweckt. Leider konnte die LC/MS-Analyse diesen Sachverhalt nicht klären.

Ungeklärt bleiben ebenfalls die beiden in der Urinprobe nach 21 Stunden beobachteten neuen Absorptionsmaxima in der konventionellen HPLC (Abb. 6-19), die eine kürzere Retentionszeit als 20E aufwiesen und auch mit einer gewissen gesteigerten Immunoreaktivität einhergehen. Die Massenspektrometrie konnte für diesen Befund auch keine Erklärung geben; im Bereich der Retentionszeiten vor 20E war bei den getesteten m/z-Größen keine passende Substanz nachzuweisen. Es wäre denkbar, dass der mögliche Metabolit eine nicht getestete Masse besitzt. Gegen die Annahme eines weiteren Metaboliten spricht jedoch die mangelnde Spezifität der HPLC bei UV-Detektion. Außerdem war die Immunoreaktivität der entsprechenden Fraktionen eher gering. Eine Kreuzreaktion mit Cortisolmetaboliten wäre möglich; Cortisol selbst würde später eluieren (vgl. 6.1.3 und 6.1.5).

### **7.3 Ausblick**

#### **Vorgehen bei der Erforschung von Metaboliten von 20E**

Generell hat sich gezeigt, dass bei der Suche nach Metaboliten von Ecdysteroiden das Vorliegen einer Massenspektrometrie erforderlich macht. Andere Methoden stehen ihr, wenn sie überhaupt zum Erfolg führen, mit einem wesentlich höheren Zeitaufwand gegenüber.

Das Procedere in dieser Arbeit, bei dem zuerst das Ausscheidungsprofil immunoreaktiver Ecdysteroiden mittels EIA ermittelt wurde, erscheint günstig und effizient. Hiernach haben HPLC (mit EIA der Fraktionen) und Massenspektrometrie ihren Platz.

#### **Doping-Analytik**

Im Rahmen dieser Arbeit erscheint es zweckmäßig, auch über Analytik im Rahmen möglicher Doping-Tests zu diskutieren, selbst wenn nach aktuellem Stand Ecdysteroiden noch nicht von der Liste des IOC erfasst sind.

Screening-Tests per HPLC wären für Anti-Doping-Zwecke prinzipiell gut denkbar aus den folgenden Gründen:

- HPLC ist eine in der Doping-Analytik bewährte Methode, sie steht in den akkreditierten Labors zur Verfügung
- Die benötigten Chemikalien sind generell zugänglich (im Gegensatz zum EIA)

- Mittels Autosampler und PC-Auswertung können große Reihenuntersuchungen mit vertretbarem personellen Aufwand betrieben werden

Die Massenspektrometrie wäre als Bestätigungstest geeignet, auch sie steht in den vom IOC akkreditierten Labors zur Verfügung und kann in der Doping-Analytik als etabliert gelten (Schänzer, 2001).

### **Bedeutung der Ecdysteroide für den Menschen**

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist schwer abzusehen, welche Bedeutung Ecdysteroide in Zukunft für den Menschen erlangen werden. Hinweise auf gesundheitlich positive Wirkungen sind zahlreich und auch aktuell immer wieder diskutiert (Le Bizec et al., 2002). Diese Diskussion findet jedoch in der Regel nicht vor der breiten Menge der Biologen und Mediziner statt, da die entsprechenden Artikel tendenziell in auflagenschwächeren Zeitschriften zu finden sind, zudem oft in russischer Sprache.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass Ecdysteroide zum einen als Nahrungskomponente für jeden Menschen von Interesse sind und darüber hinaus im Bereich Leistungssteigerung im Sport derzeit präsent sind.

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, pharmakologische Daten von 20E im Menschen aufzuzeigen und zudem ein einfach zu handhabendes Verfahren für spätere Doping-Tests darzustellen.



## 8 Literaturverzeichnis

**Bandara, B., Jayasinghe, L. Karunaratne, V., Wannigama, G., Bokel, M., Kraus, W., Sotheswaran, W.** (1989): Ecdysterone from stem of *Diploclisia glauscences*.

*Phytochemistry* 28: 1073-1075

**Bhasin S., Woodhouse L., Storer T.** (2001): Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 170: 27-38

**Bowers, L.** (1997): Analytical advances in detection of performance enhancing compounds. *Clin. Chem.* 43: 1299–1304

**Burdette, W.** (1962): Effect of invertebrate hormones on vertebrate tissues. *Science* 138: 987

**Burdette, W.** (1964): The significance of invertebrate hormones in relation to differentiation. *Cancer Res.* 24: 526-536

**Chabannyi V., Levitskii E., Gubskii I., Kholodova I., Vistunova I., Busmaska M.** (1994): Genoprotective effect of drugs based on ecdysteroids in poisoning of rats with tetrachloromethane and chlorophos. *Ukr. Biokhim. Zh.* 66: 67-77

**Chaudhary, K., Lupien, P., Hinse, C.** (1969): Effect of ecdysone on glutamic decarboxylase in rat brain. *Experientia* 25: 250-251

**Chermnykh N., Shimanovsky, N., Shutko, G., Syrov, V.** (1988): The action of methandrostenolone and ecdysterone on the physical endurance of animals and protein metabolism in the skeletal muscles. *Farmakol. Toksikol.* 51: 57-60

**Dawson, R., Elliott, D., Elliott, W., Jones, K.** (1972): Data for biochemical research, second edition. *Oxford University Press, Clarendon*

**Dinan, L.** (2001): Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 57: 325-339

**Dubey, R., Rosselli, M., Imthurn, B., Keller, P., Jacksin, E.** (2000): Vascular effects of environmental oestrogens: implications for reproductive and vascular health. *Hum. Reprod. Update* 6: 351-363

**Dzukharova, M., Sakhibov, A., Kasymov, B., Syrov, V., Takanaev, A., Saatov, Z.** (1987): Pharmacokinetic experiments with ecdysterone. *Chim.-Farm. Zh.* 21: 1163-1167

**El-Mofty, M., Sakre, S., Rizk, A., Moussa, E.** (1994): Induction of breast and lung neoplastic lesions in mice by alpha-ecdysone. *Oncol. Rep.* 1: 435-438

**Fahey, T.** (1998): Anabolic-androgenic steroids: Mechanisms of action and effects on performance. <http://sportsoci.org/encyc/anabster/anabster.html>

**Falkenstein, E., Tillmann, H., Christ, M., Feuring, M., Wehling, M.** (2000): Multiple Actions of Steroid Hormones - A Focus on Rapid, Nongenomic Effects. *Pharmacol. Rev.* 52: 513-555

**Gadzhieva, R., Portugalov, S., Paniushkin, V., Konrat'eva, I.** (1995): A comparative study of the anabolic action of ecdysten, leveton and Prime Plus, preparations of plant origin. *Eksp. Klin. Farmakol.* 58: 46-48

**Geyer, H., Mareck-Engelke, U., Reinhart, U., Thevis, M., Schänzer, W.** (2000): Positive Dopingfälle mit Norandrosteron durch verunreinigte Nahrungsergänzungsmittel. *Dtsch. Z. Sportmed.* 51: 378-382

**Gharib, B., Nugon-Baudon, L., Lafont, R., De Reggi, M.** (1993): Ecdysteroids, a new pathological marker in man. *Biologie Prospective: Comptes Rendus du 8-e colloque de Pont-à-Mousson:* 203-206

**Girault, J., Lafont R., Kerb, U.** (1988): Ecdysone catabolism in the white mouse. *Drug Metab. Dispos.* 16: 716-720

**Gonzalo-Lumbreras R., Izquierdo-Hornillos R.** (2000): High-performance liquid chromatographic optimization study for the separation of natural and synthetic anabolic steroids. Application to urine and pharmaceutical samples. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 742: 1-11

**Gower, D.** (1975): Catabolism and excretion of steroids. In: *Makin, H. (Hrsg.): Biochemistry of steroid hormones; Blackwell Scientific Publications Oxford: 149-184*

**Grebenok, R., Galbraith, D., Benveniste, I., Feyrereisen, R.** (1996): Ecdysone-20-monooxygenase, a cytochrome P450 enzyme from spinach. *Phytochemistry* 42: 927-936

**Greiling, H., Gressner, A.** (1995): Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. Dritte, neubearbeitete Aufl. *Schattauer Stuttgart, New York*

**Hay, M., Mormède, P.** (1997): Improved determination of urinary cortisone, or corticosterone and 11-dehydrocorticosterone by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 702: 33-39

**Hikino, H., Takemoto, T.** (1974): Ecdysones of plant origin. In: *Burdette, W.J. (Hrsg.): Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophylly; Springer Verlag New York: 185-203*

**Hikino, S., Nabetani, S., Nomoto, K., Arai, T., Takemoto, T., Otaka, T., Uchiyama, M.** (1969): Effect of long-term administration of insect metamorphosing substances in higher animals. *Yakugaku Zasshi* 89: 235-240

**Hikino, H., Ohizumi, Y., Takemoto, T.** (1972): Absorption, distribution, metabolism and excretion of insect-metamorphosing hormone ecdysterone in mice. *Chem. Pharm. Bull.* 20: 2454-2458

**Hoffmeister, H., Lang, N.** (1963): Zum Einfluss des Ecdysons auf das Wachstum von Wirbeltiergewebe. *Naturwissenschaften* 51: 112

- Koolman, J., Spindler K.-D.** (1977): Enzymatic and Chemical Synthesis of 3-Dehydroecdysterone, a Metabolite of the Moulting Hormone of Insects. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 358: 1339-1344
- Kotsiuruba A., Akhmed I, Tarakanov S., Kholodova I.** (1993): Mechanism of action of ecdysterone in chicken with D-hypovitaminosis. Early phase of effect. *Ukr. Biokhim. Zh.* 65: 83-90
- Kurmukov, A., Ermishina, O.** (1991): Effect of ecdysterone on experimental arrhythmias, changes in hemodynamics and contractility of the myocardium produced by a coronary artery occlusion. *Farmakol. Toksikol.* 54: 27-29
- Kurmukov, A., Syrov, V.** (1988): Anti-inflammatory properties of ecdysterone. *Med. Zh. Uzb.* 10: 68-70
- Kuzmenko A., Morozova R., Nikolenko I., Korniets G., Kholodova Y.** (1997): Effects of vitamin D3 and ecdysterone on free-radical lipid peroxidation. *Biochemistry (Mosc.)* 62: 609-612
- Kuz'mitskii B., Golubeva, M., Konoplia, N., Kovganko, N., Akhrem, A.** (1990): New possibilities in searching for immunomodulators among compounds with steroidal structure. *Farmakol. Toksikol.* 53: 20-22
- Lafont, R.** (2000): The Endocrinology of Invertebrates. *Ecotoxicology* 9: 41-57
- Lafont, R., Beydon, P.** (1988): Methods for ecdysteroid analysis. *Nicht publiziertes Skript*
- Lafont, R., Dinan, L.** (2003): Practical uses for ecdysteroids in mammals and humans: an update. *Journal of Insect Science* 3:7 (<http://www.insectscience.org/3.7>)
- Lafont, R., Horn, D.** (1989): Phytoecdysteroids: Structures and Occurrence. In: *Koolman, J. (Hrsg.): Ecdysone - From Chemistry to Mode of Action; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York: 39-64*

**Lafont, R., Wilson, I.** (1996): The Ecdysone Handbook (second edition). *Erhältlich über The Chromatographic Society, Suite 4, Calrendon Chambers, 32 Clarendon Street, Nottingham NG1 5JD, UK*

**Le Bizec, B., Antignac, J.-P., Monteau, F., Andre F.** (2002): Ecdysteroids: one potential new anabolic family in breeding animals. *Anal. Chim. Acta* 473: 89-97

**Leinonen, A., Kuuranne, T., Kostianen, R.** (2002): Liquid chromatography/mass spectrometry in anabolic steroid analysis - optimization and comparison of three ionization techniques: electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric ionization. *J. Mass Spectrom.* 37: 693-698

**Lin, N., Lin. W.** (1989): Beta-ecdysone containing skin-protecting cosmetics. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (C.A. 111: 239323)*

**Louden, D., Handley, A., Lafont, R., Taylor, S., Sinclair, I., Lenz, E., Orton, T., Wilson, I.** (2002): HPLC Analysis of Ecdysteroids in Plant Extracts Using Deuterium Oxide with Multiple On-Line Spectroscopic Analysis (UV, IR, <sup>1</sup>H NMR and MS). *Anal. Chem.* 74: 288-294

**Lupien, P., Hinse, C., Chaudhary, K.** (1969): Ecdysone as a hypocholesteremic agent. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 77: 206-212

**Matsuda, H., Kawaba, T., Yamamoto, Y.** (1970): Pharmacological studies of insect metamorphosing steroids from *Achyranthis radix*. *Folia Pharmac. Jap.* 66: 551-563

**Maurer, H.** (1998): Liquid chromatography - mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 713: 3-25

**Merck Applications** (2001): Chromolith Columns: steroids.  
[http://www.merck.de/english/services/chromatographie/hplc/chromolith/pdf/appl\\_16.pdf](http://www.merck.de/english/services/chromatographie/hplc/chromolith/pdf/appl_16.pdf)

**Meybeck, A., Bonte F., Redziniak, G.** (1994): Use of a cosmetic in dermatological composition of keratinocyte culture medium. *PCT Int. Appl. (C.A. 120: 253087)*

- Mironova V., Kholodova I., Skachkova T., Bondar' O., Datsenko Z.** (1982): Hypocholesterolemic effect of phytoecdysones during experimental hypercholesterolemia in rats. *Vopr. Med. Khim.* 28: 101-105
- Mirzaev, Y., Syrov, V.** (1992): Effect of phytoecdysteroids on the sexual activity of male rats. *Dokl. Acad. Nauk. Resp. Uzb.* 3: 47-49
- Mirzaev, Y., Syrov, V., Khrushev, S., Iskanderova, S.** (2000): Effect of ecdystene on parameters of the sexual function under experimental and clinical conditions. *Eksp. Klin. Farmakol.* 63: 35-37
- Morgan, E., Wilson, I.** (1989): Methods for Separation and Physico-Chemical Quantification of Ecdysteroids. In: *Koolman, J. (Hrsg.): Ecdysone - From Chemistry to Mode of Action; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York: 114-130*
- Najmutdivona, D., Saatov, Z.** (1999): Lung local defense in experimental diabetes mellitus and the effect of 11-20-Dihydroxyecdysone in combination with Maninil. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 41: 144-147
- Nes, W., McKean, M.** (1977): Biochemistry of Steroids and Other Isoprenoids. *University Park Press Baltimore*
- O'Neil, M. (Hrsg.), Smith, A. (Hrsg.), Heckelman, P. (Hrsg.)** (2001): The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13. Ed. *Merck&Company Rahway, NJ*
- Ogawa, S., Nishimoto, N., Matsuda, H.** (1974): Pharmacology of ecdysones in Vertebrates. In: *Burdette, W.J. (Hrsg.): Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophyly; Springer Verlag, New York: 341-344*
- Otaka, T., Okui, S., Uchiyama, M.** (1969): Stimulation of protein synthesis in mouse liver by ecdysterone. *Chem. Pharm. Bull.* 17: 75-81
- Pascual, N., Bellés, A., Delbeque, J.-P., Hua, Y.-J., Koolman, J.** (1995): Quantification of Ecdysteroids by Immunoassay: Comparision of Enzyme Immunoassay and Radioimmunoassay. *Z. Naturforsch.* 50: 862-867

**Pingoud, A., Urbanke, C.** (1997): Arbeitsmethoden der Biochemie, 12. Aufl. *De Gruyter, Berlin*

**Prabhu, V., Nayar, K.** (1974): Crustecdysone is without estrogenic or antiestrogenic activity in the rat. *Experientia* 30: 821

**Ramazanov N., Saatov Z., Syrov VN.** (1996): Study of ecdysterone metabolites isolated from rat urine. *Khim. Prir. Soedin.* 4: 558-564

**Schänzer, W.** (2001): Doping im Sport. <http://www.dshs-koeln.de/biochemie/frameset.html>

**Sergeev, P., Semeykin, A., Dukhanin, A., Solovieva, E.** (1991): Influence of anabolic steroid drugs on proliferatory activity of thymocytes. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 112: 393-395

**Simon, P.** (1988): Ecdysterioide im Säugerorganismus und ihr Nachweis als Möglichkeit der Diagnose helminthischer Infektionen. *Dissertation, Philipps-Universität Marburg*

**Simon, P., Koolman, J.** (1989): Ecdysteroids in Vertebrates: Pharmacological aspects. In: *Koolman, J. (Hrsg.): Ecdysone - From Chemistry to Mode of Action; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York: 254-259*

**Sláma, K., Abubakirov, N., Gorovits, M., Baltaev, U., Saatov, Z.** (1993): Hormonal activity of ecdysteroids from certain asiatic plants. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23: 181-185

**Sláma, K., Lafont, R.** (1995): Insect hormones - ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *Eur. J. Entomol.* 92: 355-377

**Supelco Bulletin** (1998): Bulletin 910: Guide to solid phase extraction. <http://info.sial.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>

**Syrov, V.** (1984): Mechanisms of the anabolic action of phytoecdysteroids in mammals. *Nauchn. Dokl. Vyssh. Shk. Biol. Nauki* 11: 16-20

- Syrov, V., Kurmukov, A.** (1976): Anabolic activity of phytoecdysone-ecdysterone isolated from *Rhaponticum carthamoides*. *Farmakol. Toksikol.* 39: 690-693
- Syrov, V., Kurmukov, A., Sakhibov, A.** (1978): Effect of turkesterone and nerobol on the activity of the protein synthesizing system in mice liver. *Vopr. Med. Khim.* 24: 456-460
- Takahashi, H., Nishimoto, K.** (1992): Antidiabetic agents containing ecdysterone or inokosterone. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho (C.A. 117:184874)*
- Takei, M., Endo, K., Nishimoto, N., Shiobara, Y., Inoue, S., Matsuo, S.** (1991): Effect of ecdysterone on histamine release from rat peritoneal mast cells. *J. Pharm. Sci.* 80: 309-310
- Tsitsimpikou, C., Tsamis, G., Siskos, P., Spyridaki, M.-H., Georgakopoulos, C.** (2001): Study of excretion of ecdysterone in human urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15: 1796-1801
- Turpeinen U., Markkanen H., Valimäki M., Stenman U.** (1997): Determination of urinary free cortisol by HPLC. *Clin. Chem.* 43: 1386-1391
- Yoshida, T., Otaka, T., Uchiyama, M., Ogawa, S.** (1971): Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals. *Biochem. Pharmacol.* 20: 3263-3268



## 9 Anhang

### 9.1 *Abbildungs- und Tabellenverzeichnis*

#### 9.1.1 Abbildungen

<i>Abb. 3-1: Gonan-Gerüst und Cholesterol</i>	4
<i>Abb. 3-2: Strukturen der wichtigsten Vertreter der humanen Steroide</i>	5
<i>Abb. 3-3: Struktur des 20-Hydroxyecdyson</i>	7
<i>Abb. 3-4: Struktur des Juvenilhormon III</i>	8
<i>Abb. 3-5: Kontrolle der Metamorphose durch 20-Hydroxy-Ecdyson und Juvenilhormon</i>	8
<i>Abb. 3-6: Struktur des Turkesteron</i>	14
<i>Abb. 3-7: Struktur des Metandienon</i>	14
<i>Abb. 3-8: Beispiel für die Internet-Vermarktung von Ecdysteroid-haltigen Produkten</i>	22
<i>Abb. 5-1: Kieselgelröhrchen zur Festphasenextraktion</i>	38
<i>Abb. 5-2: Chromophore des 20E</i>	39
<i>Abb. 5-3: Allgemeiner Aufbau der HPLC</i>	42
<i>Abb. 5-4: Prinzip des Ecdysteroid-EIAs</i>	44
<i>Abb. 5-5: Standardkurve für 20E im EIA</i>	48
<i>Abb. 5-6: Prinzip der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)</i>	50
<i>Abb. 6-1: UV-Spektren einiger Steroide</i>	54
<i>Abb. 6-2: DC einiger Steroide</i>	56
<i>Abb. 6-3: HPLC eines Steroidgemisches</i>	57
<i>Abb. 6-4: LC/MS von 20E, Methode „a“</i>	59
<i>Abb. 6-5: LC/MS von 20E, Methode "b"</i>	60
<i>Abb. 6-6: LC/MS von 2dE, Methode "a"</i>	61
<i>Abb. 6-7: LC/MS von Makisteron, Methode "a"</i>	62
<i>Abb. 6-8: LC/MS von Muristeron, Methode "a"</i>	63
<i>Abb. 6-9: LC/MS von Ponasteron, Methode "a"</i>	64
<i>Abb. 6-10: LC/MS von 14d20E, Methode "b"</i>	65
<i>Abb. 6-11: LC/MS von 14dE, Methode "b"</i>	66
<i>Abb. 6-12: Standardbindungskurven von E, 20E, 2dE und 2d20E im EIA</i>	69
<i>Abb. 6-13: Spektrum des Ecdysten-Extraktes im Vergleich zu einem 20E-Standard</i>	71
<i>Abb. 6-14: HPLC des Ecdysten-Präparates</i>	72
<i>Abb. 6-15: DC unterschiedlicher Phasen nach dem Ausschütteln</i>	73
<i>Abb. 6-16: Nachweis von 50 µg 20E in einer Speichelprobe mittels HPLC</i>	74
<i>Abb. 6-17: HPLCs von Urinproben mit kombinierter Vorbereitung (Ausschütteln und Lichrolut®-RP-18) gegen alleinige Lichrolut®-RP-18-Vorbereitung</i>	76
<i>Abb. 6-18: Festgestellte Mengen IE in den Urinproben per EIA</i>	78

<i>Abb. 6-19: HPLCSs der Urinproben der Zeitpunkte t=0 h, t=5 h, t=21 h</i>	80
<i>Abb. 6-20: EIA der HPLC-Fraktionen bei t=0 h</i>	81
<i>Abb. 6-21: EIA der HPLC-Fraktionen bei t=4 h</i>	82
<i>Abb. 6-22: EIA der HPLC-Fraktionen bei t=5 h</i>	83
<i>Abb. 6-23: EIA der HPLC-Fraktionen bei t=21 h</i>	84
<i>Abb. 6-24: LC/MS von 20E und der Urinprobe t=4 h bei m/z=481, Methode „b“</i>	86
<i>Abb. 6-25: LC/MS von 14d20E und der Urinprobe t=4 h bei m/z=465, Methode „b“</i>	87
<i>Abb. 6-26: LC/MS von 20E und der Urinprobe t=5 h bei m/z=481, Methode „b“</i>	89
<i>Abb. 6-27: LC/MS von 14d20E und der Urinprobe t=5 h bei m/z=465, Methode „b“</i>	90
<i>Abb. 6-28: LC/MS von 20E und der Urinprobe t=21 h bei m/z=481, Methode „a“</i>	92
<i>Abb. 6-29: LC/MS von 20E und der Urinprobe t=21 h bei m/z=497, Methode „a“</i>	93
<i>Abb. 6-30: DCs ausgewählter Proben</i>	94
<i>Abb. 7-1: Metabolisierungsweg von E im Urin von Mäusen nach Girault et al., 1988</i>	101
<i>Abb. 7-2: 20E und dessen Metabolite im Urin von Ratten nach Ramazanov et al., 1996</i>	102
<i>Abb. 7-3: 20E und dessen Metabolite im menschlichen Urin nach Tsitsimpikou et al., 2001</i>	103

### 9.1.2 Tabellen

<i>Tab. 3-1: Die wichtigsten Wirkungen des Cortisols</i>	6
<i>Tab. 3-2: Übersicht der einzelnen Gruppen der bei sportlichen Wettkämpfen verbotenen Wirkstoffe und Methoden</i>	17
<i>Tab. 3-3: Androgene und anabole Wirkungen der AAS nach Schänzer, 2001</i>	18
<i>Tab. 3-4: Unerwünschte Nebenwirkungen der AAS</i>	19
<i>Tab. 3-5: Auswahl von Bezugsmöglichkeiten kommerzieller Ecdysteroidprodukte im Internet</i>	22
<i>Tab. 3-6: Die wichtigsten Nebenwirkung der AAS im direkten Vergleich mit Ecdysteroiden</i>	23
<i>Tab. 5-1: Zeitlicher Ablauf des Selbstversuches</i>	36
<i>Tab. 5-2: Pipettierschema der EIAs</i>	48
<i>Tab. 6-1: Extinktionsmaxima und Extinktionskoeffizienten ausgewählter Steroide</i>	55
<i>Tab. 6-2: Rf-Werte einiger Steroide</i>	56
<i>Tab. 6-3: Retentionszeiten einiger Steroide in der konventionellen HPLC</i>	57
<i>Tab. 6-4: Retentionszeiten in der LC/MS-Analyse</i>	67
<i>Tab. 6-5: m/z-Verhältnisse der nachgewiesenen Ionenprodukte der Ecdysteroid-Standards in der MS/MS</i>	68

## 9.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Felix Wolfgang Brandt

geboren am 11.06.1976 in Thuine / Kr. Lingen

Adresse: Zur Schmiede 38, 33098 Paderborn

E-Mail: [felixbrandt@web.de](mailto:felixbrandt@web.de)

### Schulbildung

---

Mai 1995            Abitur - Windthorst Gymnasium Meppen

### Zivildienst

---

Januar 1996 -      Herzchirurgische Abteilung des Klinikums der Philipps-Universität

Januar 1997      Marburg

### Studium

---

April 1997 -      Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg

September 2002

- März 1999            Ärztliche Vorprüfung
- März 2000            Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Juni 2000 -            Doktorarbeit am Institut der physiologischen  
Juni 2002            Chemie der Philipps-Universität Marburg
- März 2002            Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

#### *Famulaturen:*

- *Innere Medizin (Ludmillenstift, Meppen)*
- *Anästhesie (St. Bonifatius-Hospital, Lingen)*
- *Nephrologie (Praxis Dr. Schütterle / Dialysezentrum Marburg)*
- *Chirurgie (Mayo General Hospital, Castlebar, Irland)*

Oktober 2002 -    Praktisches Jahr am St.Vincenz-Krankenhaus in Paderborn

September 2003 (akademisches Lehrkrankenhaus der Westfälischen Wilhelms-Universität  
Münster); Wahlfach: Anästhesie

### **9.3     *Akademische Lehrer***

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Cetin, Christiansen,  
Czubayko, Daut, Doss, Eilers, Feuser, Geus,  
Gotzen, Griss, Happel, Hellinger, Hesse, Hofmann,  
Jungclas, Kern, Klenk, Krieg, Lammel, Lang, Lennartz,  
Lippert, Löffler, Moll, Mueller, Oertel,  
Remschmidt, Schäfer, Schmidt, Schneyer, Werner

## **9.4 Danksagung**

Mein Dank gilt,

Prof. Dr. Jan Koolman für die Bereitstellung des Themas und für die engagierte und freundliche Betreuung meiner Arbeit,

Prof. Dr. René Lafont für die großzügige Überlassung diverser Ecdysteroide und für die ständige Bereitschaft, rasch fachliche Fragen zu klären,

Dr. Horst Schweer für die zeitaufwändige Analyse der Proben mittels LC/MS-System in der Kinderklinik der Philipps-Universität,

Dr. Manfred Ossendorf für die unbürokratische Abwicklung der Kreatinin- und Harnstoff-Analyse im Zentrallabor des Klinikums der Philipps-Universität,

Herrn Peter Möbus für stets engagierte und tatkräftige Hilfe in allen technischen Belangen,

Herrn Mikail Schwarte für seine fleißige Hilfe bei diversen vorbereitenden Tätigkeiten im Labor,

den Vertretern der Firma Merck für das Bereitstellen einer modernen RP-HPLC-Säule,

den Vertretern der Firma Thermolife für die Überlassung einer Probe ihres kommerziellen Ecdyson-Präparates,

Frau Julia Wallasch für Ihre menschliche Unterstützung insbesondere während schwieriger Phasen der Arbeit,

meinen Eltern; ihre Unterstützung hätte in keiner Weise besser sein können.

## **9.5 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Pharmakokinetik und Metabolismus  
des 20-Hydroxyecdysons  
im Menschen**

**in der Abteilung für physiologische Chemie  
unter Leitung von Prof. Dr. Jan Koolman**

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher in keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 21. November 2003