

- 8) Gollnick, P. D.: Factors controlling glycogenolysis and lipolysis during exercise. In: Limiting factors of physical performance. Ed.: J. Keul. Thieme Verlag, Stuttgart 1973
- 9) Grupe, O.: Schulische Sportförderung und ihre wissenschaftliche Begleitung — Versuche am untauglichen Objekt? In: Schulsportmodelle In Theorie und Praxis, 9, Schondorf 1976
- 10) Hohorst, H. J.: L-(+)-Lactat. Bestimmung mit Lactatdehydrogenase und DPN. In: H. W. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1962
- 11) Hunter, W. M., C. C. Fonseka, R. Passmore: The role of growth hormone in the mobilisation of fuel for muscular exercise. J. Exp. Physiol. 50, 406 (1965)
- 12) Keul, J., G. Huber und W. Kindermann: Unterschiedliche Wirkung des Skilanglaufes und des Skiabfahrtslaufes auf Kreislauf und Stoffwechsel. Sportarzt und Sportmedizin, 3, 49-58 (1975)
- 13) Keul, J., N. Linnet, E. Eschenbruch: The photometric auto-titration of free fatty acids. Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 394-398 1968
- 14) Keul, J., E. Doll, D. Keppler, H. Reindell: Die Veränderungen arterieller Substratspiegel unter dem Einfluß körperlicher Arbeit. Int. Z. angew. Physiol. 22, 356 (1966)
- 15) Keul, J., G. Harzambia, T. Arnold, W. Schumann: Heart Rate and Energy-Yielding Substrates in Blood during Long-Lasting Running. Europ. J. Appl. Physiol. 32, 279 - 289 (1974)
- 16) Keul, J., W. Kindermann, G. Simon: Die aerobe und anaerobe Kapazität als Grundlage für die Leistungsdiagnostik. Leistungssport 8. Jahrgang Nr. 1/1978, S. 22-32
- 17) Keul, J.: Kohlenhydratstoffwechsel und körperliche Leistungsfähigkeit. Sonderdruck aus Supplementa 16, Dr. Dietrich Steinkopff-Verlag, Darmstadt
- 18) Kindermann, W., J. Keul, M. Lehmann: Ausdauerbelastungen beim Heranwachsenden — Metabolische und kardiozirkulatorische Veränderungen. Fortschritte der Medizin 14, 659 (1979)
- 19) Kindermann, W., J. Keul, G. Simon, H. Reindell: Anpassungserscheinungen durch Schul- und Leistungssport im Kindesalter. Sportwissenschaft 8, 222-234 (1978)
- 20) Kindermann, W., G. Huber und J. Keul: Anaerobe Kapazität bei Kindern und Jugendlichen in Beziehung zum Erwachsenen. Sportarzt und Sportmedizin, 6, 112-115 (1975)
- 21) Klimt, F., R. Pannier, D. Pautler, E. Tuch: Körperliche Belastung acht-neunjähriger Kinder durch einen 600-m-Lauf. Schweiz. Z. Sportmedizin 21, S. 57-74 (1973)
- 22) Klimt, F., R. Pannier und D. Pautler: Ausdauerbelastungen bei Vorschulkindern. Sportmed. Z. Schweiz, 7-20 (1974)
- 23) Klissouras, V.: Heritability of adaptive variation. J. Appl. Physiol. 31, 338-344 (1971)
- 24) Lavine, R. L., D. T. Loventhal, H. D. Gellman, S. Klein, D. Vloedman, L. I. Rose: Glucose, Insulin and lipid parameters in 10000 m running. Europ. J. Appl. Physiol. 38, 301-305 (1978)
- 25) Macek, M., J. Vavra, J. Novosadova: Prolonged exercise in prepubertal boys. I. Cardiovascular and metabolic adjustment. Europ. J. Appl. Physiol. 35, 291-298 (1976)
- 26) Morgan, C. R.: Human growth hormone immunoassay two antibody method using 125 I tracer. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 62 (1966)
- 27) Neumann, O.: Die sportliche Leistung im Jugendalter. Limpert Verlag, Frankfurt 1967
- 28) Nöcker, J.: Physiologie der Leibesübungen. Enke Verlag, Stuttgart 1980
- 29) Oseid, S., L. Hermansen: Hormonal and metabolic changes during and after prolonged muscular work in prepubertal boys. Acta paediat. Scand 217, 147-153 (1971)
- 30) Richterich, R.: Klin. Chemie, Theorie und

Praxis, 2. Aufl. 1968, Frankfurt a. M., Akad. Verlagsges.

- 31) Schüler, K., F. Schneider, R. Kässner und K. Morgenstern: Leistungsverhalten und Verlaufs-dynamik physiologischer Kenngrößen bei erschöpfender Langzeitausdauerbelastung auf dem Fahrradergometer. Medizin und Sport 1, 1-9 (1975)
- 32) Slein, M. W.: D-Glucose. Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase. In: Bergmeyer, H. W.: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim 1962
- 33) Strauzenberg, S., und K. Feller: Beitrag zur Frage der Leistungsbeurteilung aus der Pulsfrequenzmessung bei Maximalbelastung unter Berücksichtigung einiger Stoffwechselkriterien. Medizin und Sport, 3, 101-104 (1968)
- 34) Szasz, G., W. Gruber, E. Berni: Creatine Kinase in Serum: 1. Determination of Optum Re-

action Conditions. Clin. Chem. 22/5, 650-656 (1976)

- 35) Weidemann, H., J. Keul, H. Roskamm, H. Reindell: Über die Belastbarkeit des Herz- und Kreislaufsystems von Kindern und Jugendlichen. Zeitschrift für Allgemeinmedizin, Heft 14 (1967)

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. med. J. Keul und Mitarbeiter,
Lehrstuhl und Abteilung für Sport- und Leistungsmedizin,
Medizinische Universitätsklinik Freiburg,
Hugstetter Straße 55
D-7800 Freiburg im Breisgau

Aus dem Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln (Leiter: Prof. Dr. M. Donike)

Routinebestimmung von Anabolika im Harn

Routine urine analytica of anabolica

Von DONIKE, M., J. ZIMMERMANN, K.-R. BÄRWALD, W. SCHÄNZER, V. CHRIST, K. KLOSTERMANN, G. OPFERMANN

Zusammenfassung

Die verschiedenen analytischen Möglichkeiten zum Nachweis der anabolen Steroide im Urin werden diskutiert. Die anabolen Steroide werden sehr stark metabolisiert, so daß der analytische Nachweis auf die Metaboliten ausgerichtet werden muß. Verglichen mit den anderen analytischen Verfahren, Radioimmuno assay (RIA) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), werden die Vorteile der Gaschromatographie/Massenspektrometrie in Verbindung mit einer geeigneten Probenvorbereitung zum Nachweis und zur Erforschung des Metabolismus dieser Hormone dargestellt. Ausscheidungsversuche mit Metandienon und Norlestosteron belegen die Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens, das gleichzeitig auch eine Beurteilung gestattet, ob exogenes Testosteron zugeführt wurde.

Summary

The different analytical approaches to detect anabolic steroids are discussed. The anabolic steroids are excreted to a high extent as metabolites, which should be the target of the analytical screening procedures. In comparison with the other analytical methods, Radioimmunoassay (RIA) or High-pressure liquid chromatography (HPLC), the use of GC/MS after

appropriate sample preparation is more effective. Excretion studies with the anabolic steroids metandienone and nortestosterone (nandrolone) demonstrate the possibilities of this screening procedure. Simultaneously the application of exogenous testosterone can be detected.

Résumé

Le propos de ce résumé est de discuter les différentes possibilités analytiques pour démontrer la présence des stéroïdes anaboliques dans l'urine. Les stéroïdes anaboliques sont métabolisés très fort et de ce fait, leur mise en évidence par l'analyse doit se centrer sur les métabolites. À l'aide d'une comparaison avec les autres procédures analytiques: radioimmunoassay (RIA) et chromatographie de liquide haute pression (HPLC), on présentera les avantages de la chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse combinés avec une présentation adéquate des essais tendant à la mise en évidence et à l'étude du métabolisme de ces hormones. Des essais d'excrétion avec du métandiénone et de la nortestostérone ont démontré l'efficacité de ce processus, lequel permet en même temps, de détecter la présence de testostérone exogène.

1. Einleitung

Mit der Aufnahme der Anabolika in die Dopingliste des Internationalen

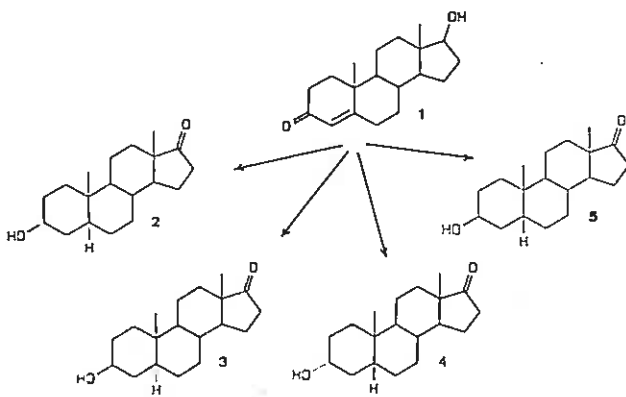


Abbildung 1: Testosteron-Stoffwechselweg: Das Testosteron (1) wird im A-Ring hydriert, wobei insgesamt 4 Isomere Formen entstehen. Zusätzlich wird die Hydroxylgruppe in 17-Stellung zur Keto-Funktion oxidiert. Cis-Androsteron (2), Epiandrosteron (3), 3- α -Etiocholanolon (4), 3- β -Etiocholanolon (5) sind die stereoisomeren Metabolite mit 17-Ketostruktur.

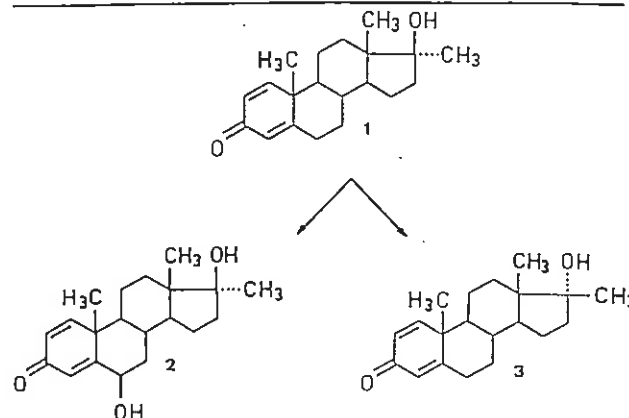


Abbildung 2: Metandienon-Stoffwechselweg: Neben der Epimerisierung am 17-Kohlenstoffatom tritt eine Hydroxylierung in 6-Stellung ein, die typisch für 17-Alkyl-Steroide zu sein scheint. Metandienon (1), 6-Hydroxy-metandienon (2), epi-Metandienon (3).

Dieser Unterschied, Auftauchen von einigen Anabolika in der Fraktion der freien Steroide, einigen anderen in der Fraktion der gebundenen oder konjugierten Steroide, läßt sich, wie später noch gezeigt wird, bei der Probenvorbereitung sinnvoll ausnutzen.

3. Möglichkeiten des Screening-Nachweises von Anabolika

3.1 Radio-Immuno-Assay (RIA) (1, 2, 3)

Schon 1975 schlug R. Brooks (1) das für wissenschaftliche Fragestellungen schon lange bekannte Radio-Immuno-Nachweisverfahren (RIA) für die Anabolika-Analytik vor. Zunächst hochgespielt in den Medien wurden die Nachteile des RIA verkannt: Der hohe Prozentsatz von falsch-positiven Ergebnissen, die einer Nachkontrolle mit Hilfe der Massenspektrometrie in Verbindung mit der Gaschromatographie bedürfen. Hierdurch wird die Analysenkapazität eines Labors oder eines Instituts unnötig belastet.

Gänzlich übersehen und daher nicht diskutiert wurde die Möglichkeit von falsch-negativen Ergebnissen. Im Rahmen von Testanalysen, beispielsweise bei Akkreditierungsverfahren für Laboratorien, ergaben sich in beträchtlichem Umfang falsch-negative Resultate. Während die Gründe für die falsch-positiven Resultate leicht einzusehen sind — Kreuzreaktionen mit anderen Steroiden oder Lipiden sowie zu geringe Konzentrationen für

eine gaschromatographisch/massenspektrometrische Bestätigungsanalyse —, wurde der offensichtliche Grund für die falsch-negativen Analysen, nämlich die Verwendung von ungeeigneten Antisera, übersehen. Beispielsweise erfolgt die Immunisierung auch heute noch mit Hilfe des applizierten Wirkstoffes, z. B. des Nortestosterons (3). Die Hauptmenge des Anabolikums erscheint jedoch als Stoffwechselprodukt, als cis-Norandrosteron, das das Antiserum nicht erkennt (4).

3.2 Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (5, 6)

Die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Heute erscheint sie reif für eine Screening-Prozedur, und zwar für diejenigen Steroide, die als „freie Steroide“ ausgeschieden werden und über eine relativ hohe Absorption im ultravioletten Bereich des Spektrums verfügen. Beispiele hierfür sind Metandienon oder das 4-Chlormetandienon, die als 6-Hydroxy-Metaboliten ausgeschieden werden und im A-Ring noch über das ursprüngliche chromophore System, die 1,4-Dien-3-on-Struktur verfügen.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der HPLC wird die Isolierung von Steroidfraktionen sein. Dieser Schritt könnte in vielen Fällen eine wirksame Vorreinigung der biologischen Extrakte darstellen und die gaschromatogra-

phisch/massenspektrometrische Identifizierung erleichtern.

3.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie als Screening-Prozedur (4, 7)

Berücksichtigt man, daß viele internationale Verbände und Gremien die Massenspektrometrie ausdrücklich als Identifizierungsverfahren für positive Dopingfälle verlangen, so bietet sich natürlich die gaschromatographisch/massenspektrometrische Analyse als Screening-Prozedur an. Diese Analysenmethode erweitert die Palette der im Rahmen der Screening-Prozedur auffindbaren anabolen Steroide. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Nachweisgrenzen von Screening- und Identifizierungsverfahren gleich hoch oder niedrig sind. Unterschiedliche Nachweisgrenzen, die beispielsweise zwischen der GC-MS-Methode und dem RIA um den Faktor $10^2 - 10^3$ differieren können, lassen sich somit vermeiden.

4. Massenspektrometrische Bestätigung

Für die massenspektrometrische Bestätigungsanalyse stehen in der Zwischenzeit eine Reihe von höchst informativen Verfahren zur Verfügung. Für die Praxis zur Zeit am geeignetsten sind die beiden folgenden Verfahrensweisen:

1. Aufnahme eines kompletten Spektrums (EI = Elektronenstoßionisation oder/und CI = chemische Ionisation) der aufgefundenen Substanz, in der

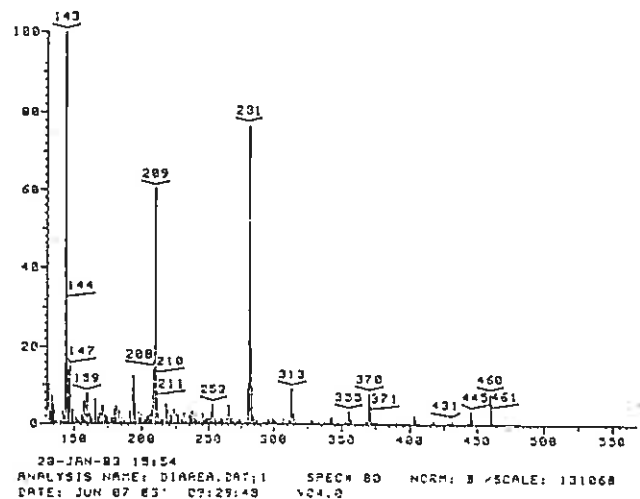
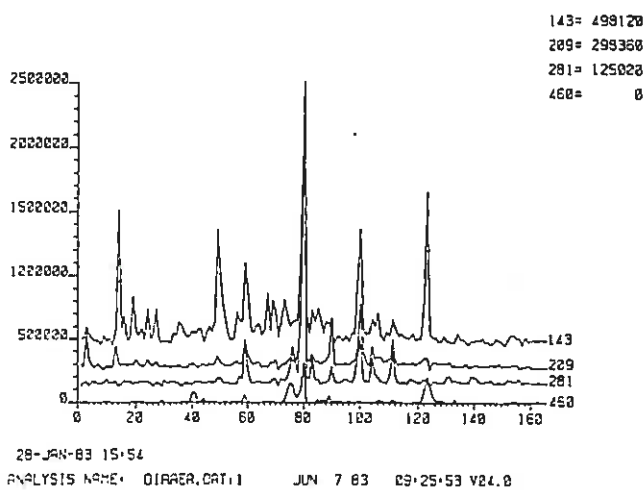


Abbildung 3: Metandienon-Ausscheidungsversuch: Nach oraler Gabe von 20 mg Metandienon ergeben sich 48 Stunden nach Applikation bei der gaschromatographischen/massenspektrometrischen Überprüfung im zyklischen Scan Hinweise auf das Vorliegen des 6-Hydroxy-Metandienon durch die vom

Computer rekonstruierten Ionenspuren 460, 281, 209 und 143 (3 a). Der Gehalt an diesem Metabolit ist in dieser Probe noch so hoch, daß im Maximum der Ionenspuren noch ein eindeutiges Massenspektrum dieses Metaboliten erhalten werden kann (3 b).

Regel im Rahmen einer gaschromatographisch/massenspektrometrischen Untersuchung. Manchmal ist es zweckmäßig, den „Untergrund“ abzugeben, wobei die Festlegung, was „biologischer Untergrund“ ist, problematisch ist und bleibt.

2. Massenspezifische Detektion (mass fragmentography): Die charakteristischen Ionen der nachzuweisenden Substanz und die Retentionszeit, evtl. unter Wechsel der Polarität der Trennsäule, werden registriert und mit einem Standard verglichen.

Zusätzliche chemische Reaktionen liefern weitere Information, z. B. Hydrazonbildung nach vorhergehender Trimethylsilylierung, ein Verfahren, das als selektive Derivatisierung bekannt ist (8).

Eine weitere chemische Modifikation, meist ungewollt beim Aufbewahren der Proben im Gemisch mit Silylierungsmitteln eintretend, ist die Enolisierung, die gezielt ausgenutzt werden kann, um zusätzliche Informationen zu erreichen (9, 10, 11, 12).

Weitere Möglichkeiten der „Bestätigung“ von positiven Resultaten bei GC-MS-Untersuchungen liegen in der Änderung der Schutzgruppe, z. B. Übergang von der Trimethylsilyl- zur tert.-Butyldimethylsilyl- oder zur Triethylsilyl-Gruppe (11).

5. Routine-Analytik von anabolen Steroiden

Die über Jahre ausgearbeitete, mehrfach veränderte Analysenvorschrift beinhaltet folgende Arbeitsschritte:

1. XAD-2-Adsorption der Lipidfraktion aus dem Urin (13, 14)
2. Desorption mit Methanol
3. Auftrennung in die Fraktionen der freien und der konjugierten Steroide durch eine Verteilung zwischen Ether und Puffer pH 5.2
4. Enzymatische Hydrolyse der gebundenen Steroide und Isolierung der nunmehr freien Steroide durch Extraktion
5. Getrennte Derivatisierung (Trimethylsilylierung) der beiden Fraktionen
6. GC-MS-Screening-Prozedur, getrennt für beide Fraktionen

Mit dieser, verglichen mit publizierten Verfahren, einfachen und zeitsparenden Arbeitsvorschrift wird für viele Anabolika ein empfindlicher und sicherer Nachweis erreicht. Neben der Optimierung der analytischen Parameter — gaschromatographische und massenspektrometrische Bedingungen — ist die geeignete Derivatisierung der einzelnen Steroide für die Empfindlichkeit und Sicherheit des Nachweises ausschlaggebend. Be-

züglich Einzelheiten der chemischen Derivatisierung sei auf andere Publikationen hingewiesen (8, 9, 10, 11, 12, 15, 16).

In den folgenden Abbildungen sind Beispiele für die Empfindlichkeit der Screening-Prozedur für anabole Steroide dargestellt. Die Abb. 3 zeigt einen Ausscheidungsversuch mit Metandienon (Dianabol[®]). Hier sind bei den für Metandienon charakteristischen Ionenspuren $m/e = 460, 281, 209$ und 143 die Signale für den Metaboliten 6-Hydroxy-dianabol zu erkennen (17).

Eine noch längere Nachweismöglichkeit besteht für ölige Lösungen von Depotpräparaten (z. B. Decadurabolin[®]). Hier ist offensichtlich die Resorption doch nicht so rasch und vollständig, wie die Beipackprospekte der Hersteller erwarten lassen. Die folgende Abbildung (Abb. 4) zeigt das Ausscheidungsverhalten, dargestellt an der charakteristischen Ionenspur 405, über etwa 3 Wochen hin. Hieraus läßt sich der Schluß ziehen, daß Depotpräparate mehrere Monate nach der Applikation noch nachweisbar sind.

Dieser Befund steht im Einklang mit den Erfahrungen der Praxis im Doping-Kontrolllabor. Nach den Angaben der Athleten, deren Urinproben noch geringe Mengen der Metaboli-

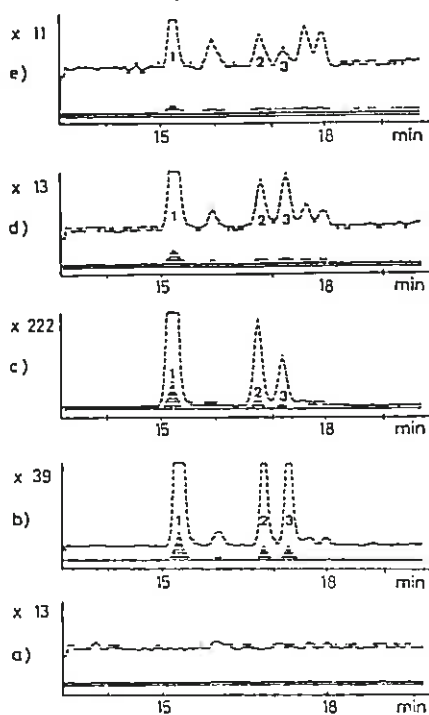


Abbildung 4: Nortestosteron-Ausscheidungsversuch: Die Signale 1, 2 und 3 entsprechen den Metaboliten des Nortestosterons, die als Cis-Norandrosteron, Noretiocholanolon und Norepiandrosteron zu bezeichnen sind. Registriert wurde die Ionenspur $m/e = 405$, die charakteristisch ist für die Nortestosteron-Metabolite.

a) = 0-Wert, b) = 23 h, c) = 5. Tag, d) = 14. Tag, e) = 29. Tag nach i. m. Applikation von 50 mg Decadurabolin[®].

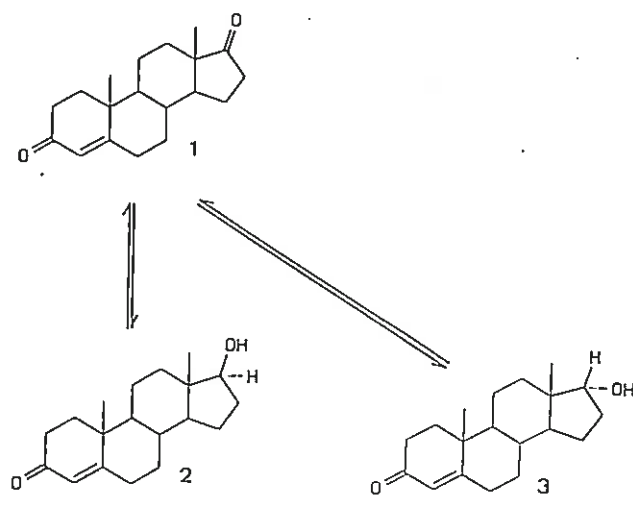
ten des Nortestosterons enthielten, lagen die Anwendungen bis zu 3 Monaten zurück!

6. Der Nachweis von exogenem Testosteron

Es steht außer Zweifel, daß die Gabe von Anabolika aufgrund der zunehmend besser werdenden Möglichkeiten des Nachweises durch eine Testosteron-Zufuhr ersetzt wird. Viele Einwände, die gegen die Applikation von Anabolika sprechen, können auch gegen die unkritische und hemmungslose Testosteron-Therapie vorgebracht werden, insbesondere bei Frauen und bei Jugendlichen. Es kann nicht Ziel der Dopingkontrollen auf Anabolika sein, daß auf dem Umweg über Testosteron diese unterlaufen werden. Hier tritt bei einer Kontrolle jedoch ein Problem auf, das Problem der Differenzierung von körpereigenem und exogenem Testosteron. Es ist naheliegend, nach Testosteron-Applikation einen höheren Blutspiegel zu postulieren. Die

Abbildung 5: Wechselbeziehungen zwischen Androstendion (1) und Testosteron (2) einerseits und epi-Testosteron (3) andererseits.

Die beiden Testosteron-Isomeren unterscheiden sich durch die Stellung der Hydroxylgruppe in der 17-Stellung.



Frage bleibt zu klären, welche Veränderungen des normalen Steroidprofils im Urin zu beobachten sind.

Die oben erwähnte Screening-Prozedur für anabole Steroide, insbesondere für die Konjugate, gestattet es, eine Reihe der endogenen Androgene quantitativ zu bestimmen. So können beispielsweise die Metaboliten des Testosterons cis-Androsteron, Etiocholanolon etc. ebenso leicht quantitativ bestimmt werden wie der Vorläufer Androstendion oder das physiologisch inaktive Epitestosteron.

Laut Literaturangabe soll ein Gleichgewicht zwischen Androstendion, dem Vorläufer des Testosterons und seinem Isomeren, dem Epitestosteron bestehen (Abb. 5). Wir konnten nach Testosteron-Applikation jedoch nur eine Erhöhung der Testosteron-Konjugate beobachten, wohingegen der Epitestosteron-Konjugat Spiegel im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant blieb (vergl. Abb. 6). Das heißt, daß keine echten Gleichgewichte, wie in Abb. 5 dargestellt, bestehen. Spekulativ ist nach wie vor die Rolle des Epitestosterons, dem z. T. keine biologische Bedeutung zugesprochen wird.

Eine Differenzierung von endogen und exogenem Testosteron ist über das Verhältnis Testosteron zu Epitestosteron, den Testosteron-Epitestosteron-Quotienten, möglich.

7. Analysenprozedur für anabole Steroide

1. Auf eine XAD-2-Säule (Pasteurpipette ca. 5 mm Ø, Glaskugel 1-2

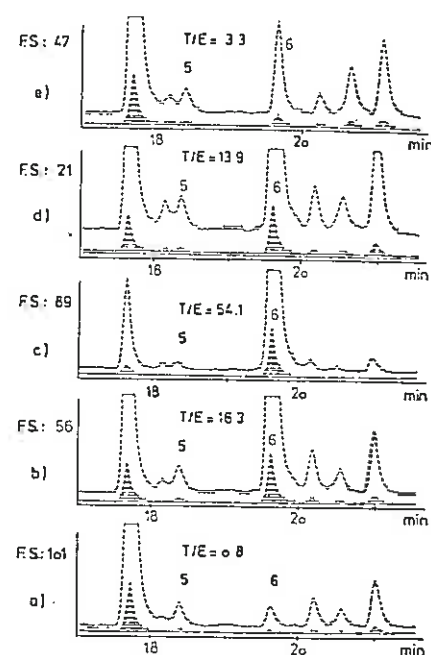


Abbildung 6: Testosteron-Ausscheidungsversuch: Nach oraler Applikation von 40 mg Testosteron-undecanoat erhöht sich der Testosteron-Spiegel im Urin (6), während die Epitestosteron-Konzentration (5) gleich bleibt. Registriert wurde die Ionenspur 432, die dem Moleküllon der bis-trimethylsilyl-substituierten Verbindung entspricht.

a) = 0-Wert, b) = 3 h, c) = 6 h, d) = 9 h, e) = 13 h nach Applikation.

mm Ø, XAD-Bethöhe 22-25 mm) werden 5-10 ml Urin aufgetragen und anschließend mit der doppelten Menge H_2O (glasdestilliert) nachgewaschen. Der Urin muß frei von Sedimenten sein, evtl. zentrifugieren.

2. Die adsorbierten Steroide werden mit Methanol in 5 Portionen à 0.5 ml eluiert.

3. Die methanolische Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeengt. Zu dem Rückstand wird 1 ml Natriumacetat-Puffer mit einem pH von 5,2 und einer Molarität von 0,2 gegeben (Natriumacetat-Puffer, Stammlösung 3 molar, 1:15 mit H₂O destilliert verdünnen). Der Puffer ist jeweils aus der Stammlösung herzustellen.

Die freien Steroide werden mit 5 ml Ether (peroxidfrei) extrahiert. Hierzu schüttelt man 15 min mechanisch, dann wird der Überstand mit einer Pasteurpipette oder Fortunapipette abgenommen und am Rotationsverdampfer vorsichtig eingeengt. Der Rückstand wird vor der späteren Trimethylsilylierung noch mindestens ½ Stunde im Vakuum über P₂O₅/KOH getrocknet. Das Glas und der Puffer werden mit 2 ml Ether (ohne zu schütteln) gewaschen. Der Ether wird mit Hilfe einer Kapillare abgezogen und verworfen.

4. Die wäßrige Natriumacetat-Lösung wird von dem restlichen Ether befreit, indem die Probengläser am Rotationsverdampfer vorsichtig evakuiert werden.

5. Die Proben werden mit 0,05 ml β-Glucuronidase/Arylsulfatase (Serva 22867) versetzt und entweder 3 Stunden bei 50°C oder über Nacht bei 37°C inkubiert.

6. Die in Freiheit gesetzten Steroide werden durch Extraktion mit 5 ml Ether wie folgt isoliert:

Zur Probe gibt man ca. 50 mg K₂CO₃ und 5 ml Diethylether (peroxidfrei). Dann fügt man unter Schütteln auf dem Vibro-Mischer ca 1 g Na₂SO₄ zu (Zeitdauer ca. 1 min). Danach wird zentrifugiert und die etherische Phase in ein weiteres Zentrifugenschliffglas abdekantiert. Die Probengläser werden mit 1 ml Ether nachgespült und die etherischen Fraktionen gemeinsam am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Die Rückstände werden noch mindestens ½ Stunde im Vakuumexsikkator über P₂O₅/KOH nachgetrocknet.

7. Trimethylsilylierung

7.1 Freie Steroide (17-Alkyl-substituierte Steroide)

Die Trimethylsilylierung erfolgt mit 50 µl eines Reaktionsgemisches von MSTFA : TMSCl : TMS-Imidazol (100 : 5 : 2; v : v : v)

Die Mindestmenge an Silylierungsmittel beträgt 25 µl, die Maximalmenge 100 µl. 5minütiges Erhitzen auf 60°C ist ausreichend, die gewünschte Derivatisierung zu vollenden.

7.2 Konjugierte Steroide

Konjugiert ausgeschiedene Steroide werden mit einem Gemisch aus MSTFA/TMSI (100 : 2; v : v) silyliert (20 min bei 60°C ergibt die gewünschte Derivatisierung: R-O-TMS für Hydroxylgruppen, Enol-O-TMS für 3- und 17-Ketogruppen).

8. Gaschromatographisch/massenspektrometrische Analyse

Gerät: Hewlett Packard 5995 A
Säule: Hewlett Packard FS-Kapillare OV 1 quervernetzt, Länge 25 m, i. D. 0,2 mm

Temperaturen:

Einspritzblock: 320°C

Ofen: 180°C, 5°C/min, 280°C (10 min)

Ionenquelle: 200°C

Gase: Helium: 1,1 ml/min bei 180°C

Splitverhältnis: 1:10

Dosierung: 1 µl mit einer 10 µl-Spritze
MS-Bedingungen: EI, 70 eV, 300 µA

Literatur

1. Brooks, R. V., R. G. Firth und N. A. Sumner: Detection of anabolic steroids by Radioimmunoassay. *British Journal of Sports Medicine*, 9, 39-92 (1975)
2. Dugal, R., C. Dupus und M. J. Bertrand: Radioimmunoassay of anabolic steroids: An evaluation of three antisera for the detection of anabolic steroids in biological fluids. *British Journal of Sports Medicine* 11, No. 4, 162-169 (1977)
3. Jondorf, W. R.: 19-Nortestosterone a model for the use of anabolic steroid conjugates in raising antibodies for Radioimmunoassay. *Xenobiotica* 7, Nr. 11, 671-681 (1977)
4. Ward, R. C., C. H. L. Shackleton und A. M. Lawson: Gas-chromatography/mass spectrometry methods for the detection and identification of anabolic steroid drugs. *British Journal of Sports Medicine* 9, 93-97 (1975)
5. Hunter, I. R., M. K. Walden und E. Helfmann: High-pressure liquid chromatography of androgens. *J. Chromatogr.* 176, 485-487 (1979)
6. Lin, J. und E. Helfmann: Comparison of adsorption and reversed-phase partition high-performance liquid chromatography for the separation of androgens. *J. Chromatogr.* 237, 215-224 (1982)

7. Donike, M.: Zum Problem des Nachweises der anabolen Steroide: Gas-chromatographische und massenspektrometrische Möglichkeiten. Sportarzt und Sportmedizin 1, 1 (1975)
8. Donike, M.: The detection of dope agents in blood. British Journal of Sports Medicine 3, 147 (1976).
9. Chambaz, E. M., G. Maume, B. Maume und E. C. Horning: Silylation of steroids. Formation of enol trimethylsilyl ethers and oxysilylation products. Analytical Letters 1, 749-761 (1968)
10. Chambaz, E. M., G. Defaye und Ch. Madani: Trimethylsilyl ether/Enol-trimethylsilyl-ether a new type of derivat for the gas phase study of hormonal steroids. Analytical Chemistry 45, Nr. 6 (1973)
11. Donike, M. und J. Zimmermann: Zur Darstellung von Trimethylsilyl-, Triethylsilyl- und tert.-Butyldimethylsilyl-enoletthern von Ketosteroiden für gas-chromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen. J. Chromatogr. 202, 483 (1980)
12. Zimmermann, J.: Untersuchungen über die Testosteron- und Nortestosteronelimination nach oraler, rektaler und percutaner Gabe. Diplomarbeit DSHS, Köln (1980)
13. Bradlow, H. L.: Extraction of Steroid Conjugates with a Neutral Resin. Steroids 11, 265-272 (1968)
14. Bradlow, H. L.: Modified technique for the elution of polar steroid conjugates from Amberlite-XAD-2. Steroids 30, Nr. 4 (1977)
15. Chambaz, E. M. und E. C. Horning: Steroid trimethylsilyl ethers. Analytical Letters 1 (3) 201-211 (1967)
16. Chambaz, E. M. und E. C. Horning: Conversion of steroids to trimethylsilyl derivatives for gas phase analytical studies: reactions of silylating reagents. Analytical Biochemistry 30, 7-24 (1969)
17. Dürbeck, H. und I. Bücken: Studies on anabolic steroids. The mass-spectra of 17 α -Methyl-17 β -hydroxy-1, 4-androstadien-3-one (Dianabol) and its metabolites. Biomedical Mass Spectrometry 7, Nr. 10 (1980)
18. Donike, M., K. R. Bärwald, K. Klostermann, W. Schänzer und J. Zimmermann: Nachweis von exogenem Testosteron. Sportärztekonferenz Köln. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln (1983)

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. Manfred Donike und Mitarbeiter,
Institut für Biochemie der Deutschen
Sporthochschule Köln,
Carl-Diem-Weg 2
D-5000 Köln 41 (Müngersdorf)

Aus dem Zentrum Kinderheilkunde und dem Zentrum Innere Medizin der Medizinischen Hochschule Hannover

Renale Adaptationsmechanismen bei körperlicher Belastung

Renal adaptation mechanisms during physical exertion

Von KRULL, F., H. G. FOELLMER, H. LIEBAU, J. H. H. EHRICH

Zusammenfassung

Bei 30 gesunden männlichen Freiwilligen wurden vor, während und nach einem 15- bzw. 25-km-Marsch verschiedene Nieren-, Herz-Kreislauf- und endokrine Funktionen untersucht. Die Ausdauerbelastung führte zu einem Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz. Die Adrenalinausscheidung im Urin stieg an, nicht aber die Exkretion von Noradrenalin. Die Plasmapreninaktivität war erhöht. Proteinurie und Erythrozyturie traten nicht auf. Die Kreatininclearance blieb normal. Natrium, Kalium und Chlorid im Serum blieben unverändert, die Serumglukose fiel ab. Die Urinmenge

und die Ausscheidung von Natrium und Chlorid nahmen mäßig während und nach der Belastung ab.

Die dargestellten Daten zeigen im Gegensatz zu einigen bisherigen Veröffentlichungen keine wesentliche Beeinträchtigung der Nierenfunktion durch Ausdauerbelastungen und die daraus resultierenden kardiovaskulären und hormonellen Reaktionen.

Summary

Various kidney heart, circulatory and endocrine functions of 30 male volunteers were examined before, during and after a 15, respectively 25, km hike. The heavy,

long-term physical exertion led to an increase in blood pressure and heart rate. While the elimination of adrenaline in the urine clearly rose, there was no increased elimination of noradrenaline. The plasma inactivity was elevated. Proteinuria and erythrocyturia did not occur. The creatine clearance did not decline. Serum glucose declined. Sodium, potassium and chloride in the serum remained unchanged. Serum glucose declined. The quantity of urine and elimination of sodium and chloride decreased moderately during and after the exertion.

In contrast to some earlier publications, the data recorded here represent no appreciable influence of longterm physical exertion and the resulting cardiovascular and hormonal reactions on kidney function.

Résumé

Il a été procédé à un examen des différentes fonctions rénales, cardiaques, circulatoires et endocrines auprès de 30 personnes volontaires en bonne santé de sexe masculin, ceci avant, pendant et après des marches de 15 et de 25 km. Les gros efforts corporels d'endurance ont provoqué une augmentation de la pression sanguine et de la fréquence cardiaque. Bien que le taux d'adrénaline ait fortement augmenté dans les urines, on n'a pas constaté d'élimination accrue de noradrénaline. L'activité plasmatique était plus importante. L'urée protéinique et l'urée érythrocytique n'ont pas été constatées. La clearance créatinine n'a pas diminué. Les taux de sodium, de potassium et de chlorure sont demeurés constants dans le sérum tandis que le gluco-sérum diminuait. Les quantités d'urine et l'élimination de sodium et de chlorure ont diminué dans de moyennes proportions pendant et après l'effort.

Les données présentées n'indiquent pas d'atteintes déterminantes de la fonction rénale due aux efforts d'endurance et aux réactions cardiovasculaires et hormonales qui en résultent, ceci contrairement à ce qu'indiquaient quelques publications faites jusqu'à présent.

Einleitung

Schwere körperliche Belastungen können die Proteinurie des Nierengesunden verstärken (3, 4, 5, 8, 19, 21, 24, 25). Die Ursachen der Belastungsproteinurie sind nicht vollständig geklärt: Einerseits werden ischämisch bedingte, isolierte glomeruläre Störungen mit Erhöhung der Permeabilität für Proteine postuliert (20),