

Nachweis von exogenem Testosteron

The detection of exogenous testosterone

M. Donike, K.-R. Bärwald, K. Klostermann, W. Schänzer, J. Zimmermann

Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln

Anschrift für die Verfasser: Prof. Dr. rer. nat. M. Donike,
Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln, Carl-Diem-Weg 2, 5000 Köln 41

Zusammenfassung

Nach Testosteron-Applikation steigt die Urinkonzentration von Testosteron-glucuronid sehr stark an. Mit Hilfe eines gaschromatographischen/massenspektrometrischen Verfahrens kann nach geeigneter Probenvorbereitung im Analysengang auf gebundene Anabolika Testosteron erfaßt werden. Wichtig für die Beurteilung, ob exogenes Testosteron zugeführt wurde, ist das Verhältnis des Testosteron-Spiegels zu dem der anderen endogenen Steroide. Epitestosteron-glucuronid, ein naher Verwandter des Testosterons, erscheint auch nach Testosteron-Applikation in gleichbleibender Konzentration. Daher kann aus dem Verhältnis Testosteron zu Epitestosteron, das normalerweise sowohl bei Männern als auch bei Frauen nahe bei 1 liegt, bei hohen Quotienten auf eine exogene Testosteron-Zufuhr geschlossen werden.

Ausscheidungsversuche mit 1,2-deuteriertem Testosteron bestätigen, daß nach Testosteron-Applikation nur ein geringer Prozentsatz des applizierten Steroids in Epitestosteron umgewandelt wird.

Summary

After application of testosterone the concentration of testosterone glucuronid increases in the urine remarkable. The testosterone is determined by combined gas-chromatography mass spectrometry with the same analytical procedure as the anabolic steroids excreted in the conjugated fraction. The relation to other endogenous steroids is an important index to state that exogenous testosterone was applied.

The level of epitestosterone the 17-epimere of testosterone does not increase. The relation of testosterone to epitestosterone is normally about 1 in men as well as in women. This quotient increases only when pharmaceutical preparations of testosterone was applied.

Elimination studies with 1,2-dideutero-testosterone show that only a small fraction of the testosterone is converted to epitestosterone.

Vor den Olympischen Spielen 1980 in Moskau schien Testosteron das „ideale Dopingmittel“ zu sein. Ideal, weil sowohl bei Männern als auch bei Frauen eine Testosteron-Applikation nicht nachweisbar erschien. Der Grund hierfür ist, daß nicht nur Männer, sondern auch Frauen in geringen Mengen Testosteron produzieren. Der Nachweis eines Testosteron-Mißbrauches

wäre somit bei beiden Geschlechtern nur durch eine quantitative Bestimmung möglich, die jedoch durch 3 biologische Fakten nicht beweisbar erschien:

1. Die Testosteron-Produktionsraten und somit die Konzentrationen schwanken circadian und ultradian.

2. Die Produktionsraten differieren erheblich von Individuum zu Individuum.
3. Das applizierte Testosteron wird, ebenso wie das endogene Testosteron, zu mehr als 99 % metabolisiert.

Die für den Nachweis des Nortestosterons und anderer anaboler Steroide ausgearbeitete gaschromatographische/massenspektrometrische Analysenmethode erlaubt es, bei geeigneter Wahl der Versuchsbedingungen, auch die endogen erzeugten Androgene zu messen [1–6]. Man erhält ein sogenanntes Steroidspektrum [2–3], das von vielen Autoren als charakteristisch für ein Individuum angesehen wird (Abb. 1). Von den Testosteron-Metaboliten bilden Androsteron und Eticholanolon die Hauptkomponenten. Ihre Konzentration in der konjugierten Fraktion liegt im µg/ml-Bereich. Daneben können in dieser Steroidfraktion Testosteron und Epitestosteron erfaßt werden, obwohl beide Steroide nur im ng/ml-Bereich vorkommen.

Interessant sind nun die Auswirkungen, die eine Testosteron-Applikation auf das Steroidspektrum hat: Die Hauptmetaboliten steigen an, jedoch ist die Konzentrationserhöhung relativ gering. Ein Faktor 1,5–3 liegt im Bereich der

biologischen Schwankungsbreite. Die stärkste Zunahme finden wir beim Testosteron-(glucuronid), wohingegen das Epitestosteron-(glucuronid) konstant bleibt (Abb. 2).

Obwohl laut Literaturangaben [7] ein Gleichgewicht zwischen dem Androstendion, dem Vorläufer des Testosterons und seinen Isomeren, dem Epitestosteron bestehen soll (Abb. 3), konnten wir nach Testosteron-Applikation nur eine Erhöhung des Testosteronspiegels beobachten, wobei der Epitestosteronspiegel im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant blieb.

Die Beobachtung, daß exogen zugeführtes Testosteron nicht über eine Gleichgewichtsreaktion die Epitestosteron-Konzentration erhöht, bestätigte ein Ausscheidungsversuch mit 1,2-Dideuterotestosteron (Abb. 4).

Hierbei zeigt sich, daß das 1,2-Dideuterotestosteron stark ansteigt, wie es aufgrund der bisherigen Ausscheidungsversuche mit Testosteron zu erwarten ist. Das 1,2-Dideuteroepitestosteron erscheint jedoch nur in einer geringen Konzentration, die nicht mehr als 2 % des 1,2-Dideutero-testosterons ausmacht [8].

Der Anstieg des Testosterons in der konjugierten Fraktion ist bei jeder Applikationsart zu be-

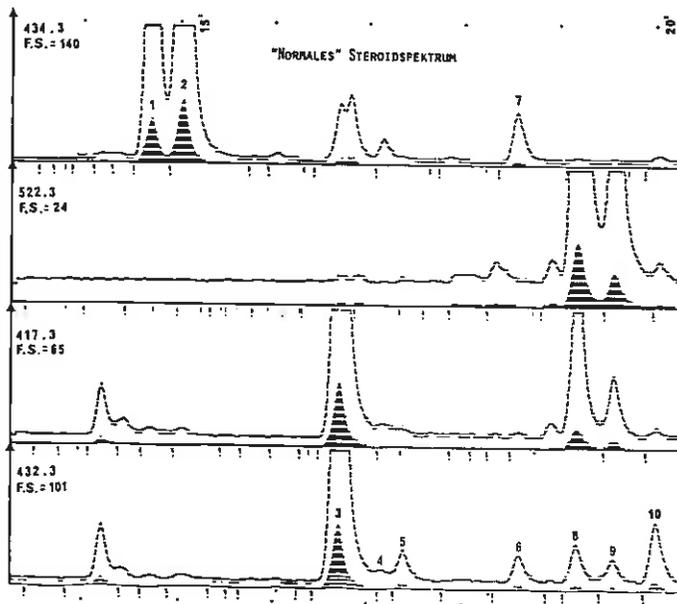


Abb. 1:
Endogenes Steroidspektrum mit den Verbindungen:
1. cis-Androsteron
2. Etiocholanolon
3. Dehydroepiandrosteron
4. Androstendion
5. Epitestosteron
6. Testosteron
7. 1,2-Dideuterotestosteron
8. 11-β-Hydroxy-androsteron
9. 11-β-Hydroxy-etiocholanolon
10. Methylnortestosteron

Abb. 2:
 Metabolitenverteilung nach rektaler Applikation von 40mg Testosteron. Während sich die Zunahme der hauptsächlichsten Metaboliten cis-Androsteron und Epitestosteron nur geringfügig bemerkbar macht, steigt der Gehalt an Testosteron (6) im Verhältnis zu Epitestosteron um einen Faktor 30 an!
 a) Nullwert
 b) 8,5 Stunden
 c) 15,5 Stunden

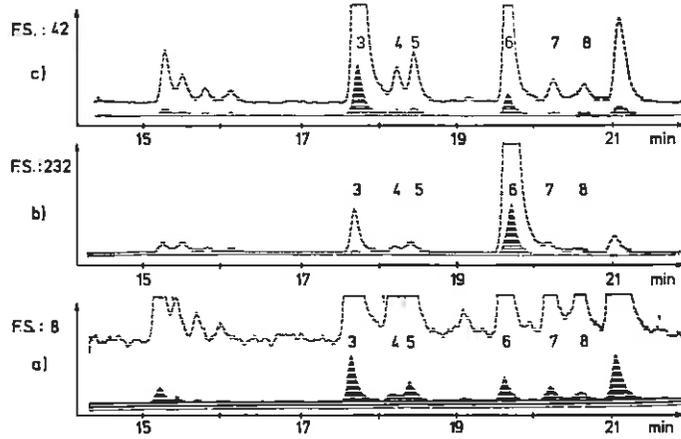


Abb. 3:
 Das „biochemische“ Gleichgewicht zwischen dem Vorläufer von Testosteron, dem Androstendion, und Epitestosteron sowie weiteren Metaboliten des Testosteron-Abbaues.

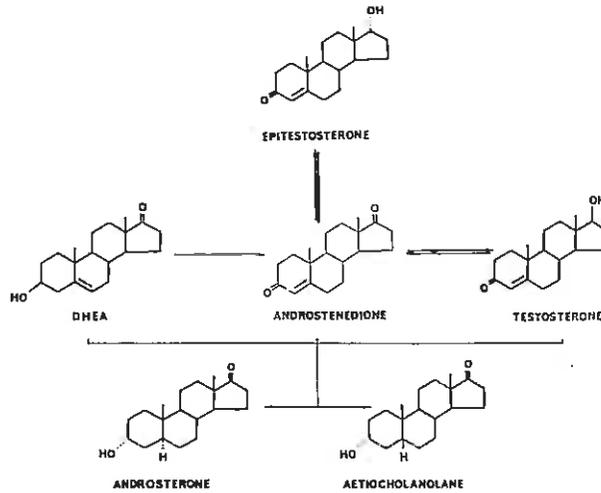
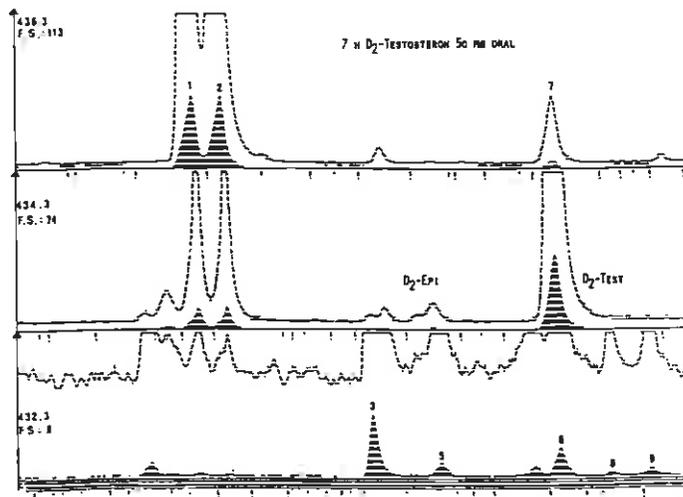


Abb. 4:
 Ausscheidungsversuch mit 1,2-Dideutero-testosteron (7), das nach dem gleichen analytischen Verfahren wie Testosteron, Epitestosteron etc. nachgewiesen wurde. Hierbei ergibt sich, daß Dideutero-epitestosteron (D₂-Epi) in einer Konzentration von nur 2 % der 1,2-Dideutero-testosteronkonzentration (7) auftritt.



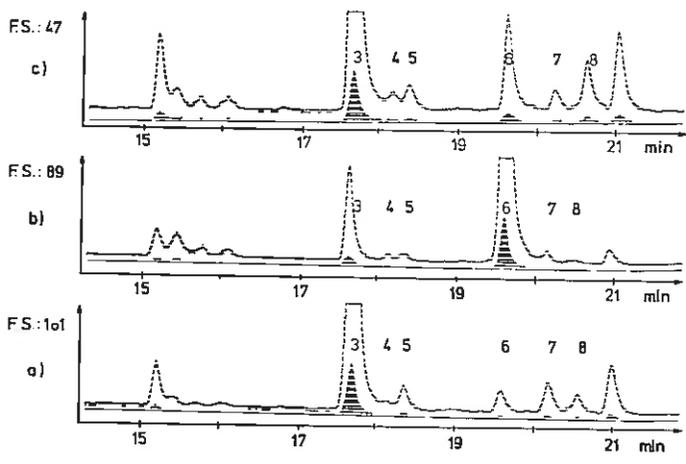


Abb. 5:
Veränderung des Steroid-
spektrums nach oraler Gabe
von Testosteronundecanoat
a) Nullwert
b) 6 Stunden
c) 13 Stunden

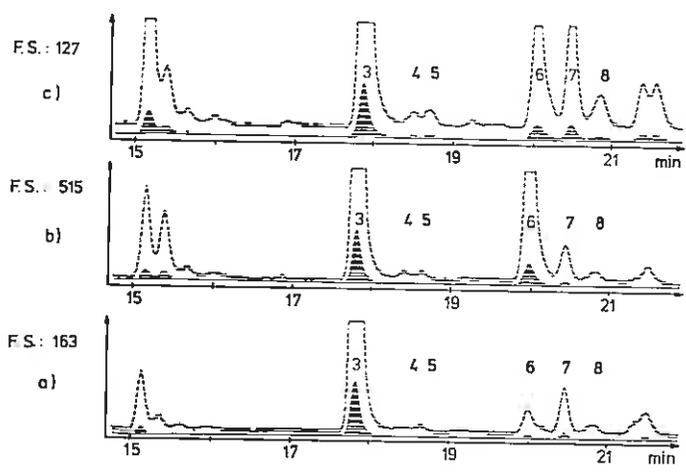


Abb. 6:
Veränderung des Steroid-
spektrums nach i. m. Appli-
kation von Testosteron-pro-
pionat
a) Nullwert
b) 8 Stunden
c) 50 Stunden

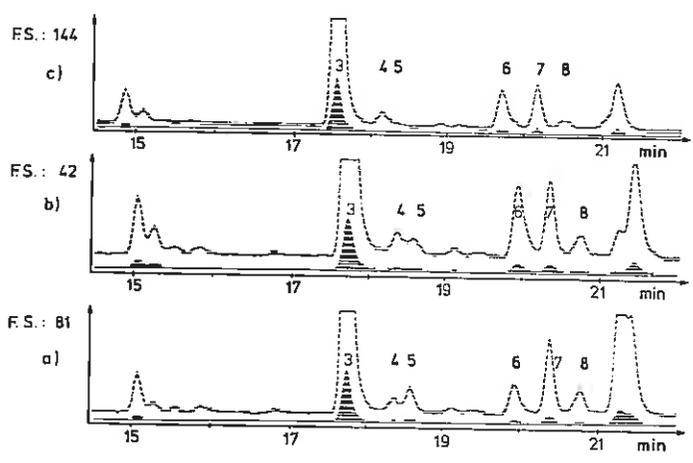


Abb. 7:
Veränderung des Steroid-
spektrums nach i. m. Appli-
kation von Testosteron-Oen-
anthat als Langzeit-Depot-
Präparat
a) Nullwert
b) 48 Stunden
c) 10 Tage

obachten. Orale, rektale oder parenterale Applikation, sowohl von Testosteron als auch seiner Ester erhöht, natürlich in Abhängigkeit von der Dosis, die Testosteron-Konzentration. (Diese Feststellung hat nichts mit der biologischen Verfügbarkeit des Testosterons zu tun. Sie beschreibt lediglich den Metabolismus.) Typische Beispiele sind in Ergänzung der Abb. 2 in den folgenden Abb. 5 bis 7 wiedergegeben.

Seit mehr als 2 Jahren benutzen wir das schon früher vorgestellte Analysenverfahren nicht nur zum Nachweis von anabolen Hormonen, sondern gleichzeitig zur Bestimmung des endogenen Steroidspektrums und damit zum Testosteron-Nachweis. Hierbei ergeben sich folgende interessante Zusammenhänge:

Der Prozentsatz der „aufgefundenen positiven Testosteron-Fälle“ ist bei den Routine-Untersuchungen relativ gering.

Die Tab. 1 zeigt die Statistik der gesamten untersuchten Proben in den Jahren 1981 und 1982. Nur 20 Proben von 759 untersuchten weisen 1981 einen Testosteron-Epitestosteron-Quotienten von mehr als 5 auf. 1982 liegt die Anzahl der hohen Testosteron-Epitestosteron-Quotienten mit 7 noch niedriger.

Wesentlich interessanter, aufgegliedert nach Sportarten, ist jedoch die folgende Tabelle (Tab. 2), die durch die Mitarbeit der nationalen und internationalen Verbände ermöglicht wurde.

Hieraus kann man ablesen, daß gewisse, professionell betriebene Sportarten anfällig für die Anwendung von Testosteron sind.

Bei internationalen Veranstaltungen, beispielsweise bei Weltmeisterschaften und Olympischen Spielen, ist die Anzahl der hohen Testo-

Tab. 1:

Statistik der nach dem Routineverfahren untersuchten Routine-Doping-Proben in den Jahren 1981 und 1982.

Routine Dopingkontrollen – Test/Epi < 5					
	N	T/E	min.	max.	Test/Epi > 5
1981	739	1,5 ± 0,9	0,03	4,9	20
1982/1	123	1,5 ± 1,0	0,1	4,6	3
1982/2	♂ 383	1,2 ± 0,8	0,1	4,6	4
	♀ 46	1,1 ± 0,6	0,07	4,6	0
Zum Vergleich: Studenten					
	♂ 50	1,13 ± 0,57	0,12	4,44	0
	♀ 47	1,29 ± 0,89	0,26	2,90	0

Tab. 2a:

Zusammenstellung der im Radsport untersuchten Dopingproben.

Statistische Gruppe Radsport	N	Test : Epi	min.	max.
DM Str. Damen	11	0,94 ± 0,39	0,37	1,72
Jugend Str.	11	1,21 ± 0,83	0,09	3,02
TdA, Profi	35	3,40 ± 8,23	0,16	37,2
DM Jgd. Bahn 81	28	1,69 ± 0,84	0,21	3,68
DM Jgd. Bahn 82	35	1,61 ± 0,79	0,24	3,44
DM Amat. Bahn 82	41	1,17 ± 0,82	0,12	4,6
Rheinl. Plalz 82	50	1,15 ± 1,13	0,14	6,86

Tab. 2b:

Zusammenstellung von anderen Sportarten, Wettkampf und Training.

Statistische Gruppe Diverse Sportarten	N	Test : Epi	min.	max.
Fußballer	16	1,35 ± 0,70	0,46	2,82
Training X 82	44	10,2 ± 21,3	0,14	75,5
Eisschnell.	7	2,83 ± 1,88	0,5	5,99
DLV-DM	12	1,47 ± 1,07	0,37	4,31
Fechter	12	0,93 ± 0,24	0,15	1,58
Handballer	65	1,47 ± 1,2	0,11	6,15

steronwerte wesentlich größer, wie Untersuchungen zeigen, die im Jahre 1980 bei den Olympischen Spielen in Moskau durchgeführt wurden.

Der Beschluß der Medizinischen Kommission des IOC, Testosteron auf die Liste der Dopingmittel zu setzen und einen Grenzwert festzusetzen, basierend auf einer Konzentrationsbestimmung und mit Bezug auf eine ebenfalls endogene Substanz, hat viel Kritik hervorgerufen. Diese Maßnahme wird jedoch dazu führen, daß die unververtretbaren Praktiken, hohe Testo-

steron-Dosen selbst im Frauensport einzusetzen, wenn schon nicht verhindert, so doch eingeschränkt werden.

Zur Zeit untersuchen wir die Frage, welche anderen endogenen Stoffe als Bezugssubstanzen in Frage kommen. Aus der Reihe der Steroide sind die 11-Hydroxy-ketosteroide 11-Hydroxyandrosteron und 11-Hydroxyetiocholanolon geeignet. Weniger Beachtung verdienen spezifische Dichte, Leitfähigkeit und Kreatiningehalt, obwohl diese Parameter in Einzelfällen von Nutzen sein können.

Literatur

1. W. J. J. Leunissen „Quantitative Aspects of the Determination of Steroid Profiles from Urine by Capillary Gas Chromatography“ Thesis, Eindhoven 1979
2. P. Pfeifer and G. Spittler „Steroid Profiles of Healthy Individuals“ *Journal of Chromatography*, 223 (1981) 21–32
3. C. D. Pfaffenberger „Glass Capillary Gas Chromatography in Clinical Medicine“ in: *Chromatographic Science*, Vol. 15, (1981) New York Editor: W. G. Jennings
4. Y. Shynohara, S. Baba and Y. Kasuya „Adsorption, Metabolism and Excretion of Oral Testosterone in Humans by Mass Fragmentography“ *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 6 (1980) 1459–1462
5. S. Baba, Y. Shinohara and Y. Kasuya „Differentiation between Endogenous and Exogenous Testosterone in Human Plasma and Urine after Oral Administration of Deuterium-labeled Testosterone by Mass Fragmentography“ *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 5 (1980) 889–894
6. C. H. L. Shackleton „The Analysis of Steroids“ (unpublizierte Monographie)
7. L. Träger „Steroidhormone, Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung“ Springer, New York, 1977
8. Donike et al (unpublizierte Versuche)