

Institut für Physiologie  
FML Weihenstephan  
Technische Universität München

**Rückstandsanalytische Untersuchungen für eine aktualisierte  
Bewertung des Einsatzes hormonal wirksamer Leistungsförderer in  
der Tiermast**

Iris Gudrun Lange

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. F. X. Roth

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. H. H. D. Meyer
2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Die Dissertation wurde am 10.05.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.07.2001 angenommen.

Allen, die mich auf meinem Weg unterstützt, motiviert und gefördert haben

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	IV
TABELLENVERZEICHNIS .....	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
1. Einführung - Hormonal wirksame Leistungsförderer.....	1
1.1 Handelskonflikt.....	1
1.2 Anwendung und Wirkungsweise .....	3
1.3 Missbrauchsszenarien .....	6
1.4 Transplazentaler Übergang exogener Hormone in den Fötus .....	8
2. Aufgabenstellung.....	10
3. Material und Methoden.....	12
3.1 Tierversuch, Probennahme und -präparation .....	12
3.1.1 Studie 1: Fehlapplikation von Implantationspräparaten am falschen Ort... 12	
3.1.2 Studie 2: Mehrfachdosierung bei Färsen.....	14
3.1.3 Studie 3: Behandlung von Ebern und Kälbern.....	15
3.1.4 Studie 4: Behandlung trächtiger Kaninchen .....	16
3.2 Extraktion.....	17
3.2.1 Implantate.....	17
3.2.2 Muskel und Bindegewebe .....	17
3.2.3 Leber, Niere und Plazenta.....	18
3.2.4 Nierenbeckenfett .....	18
3.3 HPLC-DAD (Implantationsstellen).....	18
3.4 HPLC-ELISA (periphere Gewebe) .....	19
3.4.1 HPLC.....	19
3.4.2 ELISA .....	21
3.5 Standardisierung der Messungen .....	22
3.6 Validierung der Methoden.....	23
3.6.1 HPLC-DAD – Implantate .....	23
3.6.2 HPLC-DAD - Gewebe .....	25

---

3.6.3 HPLC/ELISA (bovines Gewebe).....	27
3.6.4 HPLC/ELISA (Kaninchengewebe).....	28
3.7 Qualitätssicherung .....	30
3.8 GC-MS-Bestätigungsanalysen von peripherem bovinem Gewebe .....	30
3.9 Materialien .....	33
3.9.1 Geräte .....	33
3.9.2 Verbrauchsmaterialien .....	34
3.9.3 Chemikalien und Pufferlösungen.....	34
4. Ergebnisse .....	36
4.1 Rückstände in Implantaten (Studien 1, 2 und 3) .....	36
4.1.1 Revalor-H <sup>®</sup> , Finaplix-H <sup>®</sup> , Synovex Plus <sup>®</sup> , Synovex-H <sup>®</sup> , Compudose <sup>®</sup> , Component EC <sup>®</sup> , Implus S <sup>®</sup> und Ralgro <sup>®</sup> (Studie 1).....	36
4.1.2 Finaplix-H <sup>®</sup> , Ralgro <sup>®</sup> und Synovex-H <sup>®</sup> (Studie 2) .....	38
4.1.3 Synovex-H <sup>®</sup> und Synovex Plus <sup>®</sup> (Studie 3) .....	38
4.2 Rückstände in Implantationsstellen (Studien 1, 2 und 3) .....	39
4.2.1 Revalor-H <sup>®</sup> , Finaplix-H <sup>®</sup> , Synovex Plus <sup>®</sup> , Synovex-H <sup>®</sup> , Compudose <sup>®</sup> , Component EC <sup>®</sup> , Implus S <sup>®</sup> und Ralgro <sup>®</sup> (Studie 1).....	39
4.2.2 Finaplix-H <sup>®</sup> , Ralgro <sup>®</sup> und Synovex-H <sup>®</sup> (Studie 2) .....	43
4.2.3 Synovex-H <sup>®</sup> und Synovex Plus <sup>®</sup> (Studie 3) .....	45
4.3 Rückstände in peripheren Geweben nach Mehrfachdosierung von Finaplix-H <sup>®</sup> , Ralgro <sup>®</sup> und Synovex-H <sup>®</sup> (Studie 2).....	47
4.4 Rückstände in peripheren Geweben bei Kälbern (Studie 3) .....	51
4.5. Rückstände in maternalem und fötalem Kaninchengewebe (Studie 4).....	54
5. Diskussion .....	58
5.1 Methoden.....	58
5.2 Grenzwerte für hormonal wirksame Leistungsförderer .....	59
5.3 Rückstände in Implantationsstellen.....	63
5.4 Rückstände in peripheren Geweben.....	66
5.5 Transfer von Trenbolon, Zeranol und Melengestrolacetat vom Muttertier zum Fötus.....	72
6. Zusammenfassung .....	75

---

7. Summary .....	76
8. Literatur .....	77
DANKSAGUNG .....	IX
LEBENS LAUF .....	X
PUBLIKATIONEN.....	XI

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADI:	acceptable daily intake
BSE:	bovine spongiforme enzephalopathie
CBG:	corticosteroid-binding globulin
CIS:	<i>Carcinoma in situ</i>
DAD:	Diodenarraydetektion
E1:	Östron
E2:	Östradiol
E2-benz:	Östradiolbenzoat
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
f:	frei
FAO:	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA:	U. S. Food and Drug Administration
f + k:	frei und konjugiert
GC:	Gaschromatographie
GH:	Wachstumshormon
GÖ:	Gesamtöstrogene
GVP:	Good Veterinary Practice
HPLC:	Hochleistungsflüssigchromatographie
IAC:	Immunoaffinitätschromatographie
IGF1:	insulin-like growth factor 1
JECFA:	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LH:	Luteinisierungshormon
LOEL:	lowest-observed-effect level
MGA:	Melengestrolacetat
MRL:	maximum residue limit
MS:	Massenspektrometrie
NHEL:	no-hormonal-effect level
n. n.:	nicht nachweisbar
NOEL:	no-observed-effect level
NWG:	Nachweisgrenze
rhAR:	rekombinant hergestellter humaner Androgenrezeptor
rhER $\alpha$ :	rekombinant hergestellter humaner Östrogenrezeptor $\alpha$
rhER $\beta$ :	rekombinant hergestellter humaner Östrogenrezeptor $\beta$

SHBG:	sex hormone-binding globulin
Syn.-H:	Synovex-H <sup>®</sup>
Syn. Plus:	Synovex Plus <sup>®</sup>
TBA:	Trenbolonacetat
TbO:	Trendion
TbOH:	Trenbolon
T-prop:	Testosteronpropionat
WDF:	Wiederfindung
WHO:	World Health Organization
WTO:	World Trade Organization

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Implantationspräparate

Tabelle 2: Versuchsdesign Studie 1

Tabelle 3: Aufarbeitungsschema der Kaninchenproben

Tabelle 4: Retentionszeiten HPLC-DAD

Tabelle 5: Retentionszeiten HPLC/ELISA

Tabelle 6: Arbeitsbereiche der ELISA-Kalibrierkurven (Mittelwerte über n Testansätze)

Tabelle 7: Bestimmung der Wirkstoffgehalte in den Originalpräparaten

Tabelle 8: Genauigkeit und Präzision der Rückstandsanalytik von Implantationsstellen (HPLC-DAD)

Tabelle 9: Validierungsdaten der Rückstandsanalytik von peripheren bovinen Geweben (HPLC/ELISA)

Tabelle 10: Qualitätsparameter der Rückstandsmessungen der Kaninchengewebe (HPLC/ELISA)

Tabelle 11: GC-MS: Retentionszeiten und diagnostische Ionen zur Substanzidentifizierung

Tabelle 12: Ergebnisse der GC-MS-Bestätigungsanalysen (Studie 2)

Tabelle 13: Rückstände in den herauspräparierten Implantaten - Studie 1

Tabelle 14: Rückstände in den Implantaten nach Mehrfachdosierung - Studie 2 (Mittelwerte: n = 2 bei 1-facher und 3-facher, n = 4 bei 5-facher Dosis)

Tabelle 15: Rückstände im Gewebe nach Applikation unterschiedlicher Implantationspräparate in den Halsmuskel (Studie 1.3)

Tabelle 16: Rückstände nach Gabe von Finaplix-H<sup>®</sup> (Studie 2)

Tabelle 17: Rückstände nach Behandlung mit Ralgro<sup>®</sup> (Studie 2)

Tabelle 18: Testosterongehalte nach Applikation von Synovex-H<sup>®</sup> (Studie 2)

Tabelle 19: Östrogengehalte nach Synovex-H<sup>®</sup>-Behandlung (Studie 2)

Tabelle 20: Metabolitenmuster von Trenbolon und Östrogenen nach Gabe von Finaplix-H<sup>®</sup> und Synovex-H<sup>®</sup>

Tabelle 21: Östrogengehalte nach Applikation von Synovex-H<sup>®</sup> (Syn.-H) bzw. Synovex Plus<sup>®</sup> (Syn. Plus) (Studie 3, Kälber)

Tabelle 22: Testosterongehalte nach Behandlung mit Synovex-H<sup>®</sup> bzw. Synovex Plus<sup>®</sup> (Studie 3, Kälber)

Tabelle 23: Trenbolonrückstände nach Gabe von Synovex Plus® (Studie 3, Kälber)

Tabelle 24: Rückstände in den Kaninchengeweben nach Trenbolonacetat-  
Behandlung

Tabelle 25: Rückstände in den Kaninchengeweben nach Zeranol-Behandlung

Tabelle 26: Rückstände in den Kaninchengeweben nach Melengestrolacetat-  
Behandlung

Tabelle 27: Metabolitenmuster von Trenbolon in Kaninchengewebe

Tabelle 28: Internationale Toleranzgrenzen für Rückstände hormonal wirksamer  
Masthilfsmittel

Tabelle 29: Mögliche Kontamination von verarbeitetem Fleisch durch Implantations-  
stellen

Tabelle 30: Literaturübersicht zu Studien mit Trenbolonacetatbehandlung

Tabelle 31: Literaturübersicht: Studien zu Zeranol

Tabelle 32: Übersicht über Studien zu Östradiolgehalten in Rindfleisch

Tabelle 33: Übersicht über Studien zu Testosterongehalten in Rindfleisch

---

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Hormonal wirksame Masthilfsmittel

Abbildung 2: Unterschiedliche Implantationsorte (Studie 1.2)

Abbildung 3: Rückstände im Gewebe nach Applikation von Revalor-H<sup>®</sup> (Studie 1) -  
Implantationsinnenbereich

Abbildung 4: Rückstände im Gewebe nach Applikation von Revalor-H<sup>®</sup> (Studie 1) –  
Implantationsaußenbereich

Abbildung 5: Rückstände im Ohr nach Mehrfachdosierung (Studie 2) – Implantations-  
innenbereich

Abbildung 6: Rückstände im Gewebe bei Ebern und Kälbern (Studie 3) – Implanta-  
tionsinnen-/außenbereich

# 1. Einführung - Hormonal wirksame Leistungsförderer

## 1.1 Handelskonflikt

Seit den 1950er Jahren werden hormonal wirksame Wachstumsförderer in der Tiermast eingesetzt, um die Futterumsetzung zu verbessern, die Stickstoffretention und die Proteinsynthese zu erhöhen und die Fettdepotbildung zu reduzieren. Sie entfalten ihre Wirkung in Abhängigkeit von Spezies, Geschlecht, Alter, Applikationsart, Dosierung und Stickstoffgehalt im Futter (van der Wal und Berende, 1983). Besonders effektiv ist die Anwendung bei Tieren mit niedriger endogener Hormonproduktion, wie Kälbern und Ochsen, aber auch Färsen. Neben den natürlichen Sexualhormonen oder entsprechenden Esterderivaten, Testosteronpropionat, Östradiol oder Östradiolbenzoat und Progesteron, finden auch Trenbolonacetat, Zeranol und Melengestrolacetat Verwendung (Abbildung 1).

In der Europäischen Union sind hormonal wirksame Wachstumsförderer seit 1988 generell verboten (Council of the European Communities, 1996). Unter anderem in den USA (Code of Federal Regulations, 1999a) und in Kanada ist die Verwendung der sechs beschriebenen Substanzen jedoch erlaubt und weit verbreitet. Während Östradiol und Zeranol für Ochsen, Färsen und Kälber zugelassen sind, darf Trenbolon nur an Ochsen und Färsen verabreicht werden. Testosteron und Melengestrolacetat sind nur bei Färsen erlaubt, Progesteron nur bei Ochsen und Kälbern.

70 bis 90 % der gemästeten Rinder in Nordamerika werden nach Herstellerangaben vor der Schlachtung mindestens einmal implantiert (Hoechst Roussel Vet, 1999a). Da die Europäische Union jedoch die Einfuhr von Fleisch, das von hormonbehandelten Rindern stammt, verweigert, kam es Mitte der 1990er Jahre zu einem Handelskonflikt vor der Welthandelsorganisation WTO (World Trade Organization). Seit dem Abkommen über sanitäre und phytosanitäre Maßnahmen von 1994 ist nämlich die Einführung von Handelshemmnissen nur dann erlaubt, wenn wissenschaftlich abgesicherte Gründe dafür angeführt werden können, die eine Gefährdung der Verbrauchergesundheit rechtfertigen. Auf dieser Basis ist die Europäische Union nach einer Klage der USA und Kanadas vor der WTO zu einer angemessenen Risikobewertung aufgefordert worden.

Abbildung 1: Hormonal wirksame Masthilfsmittel

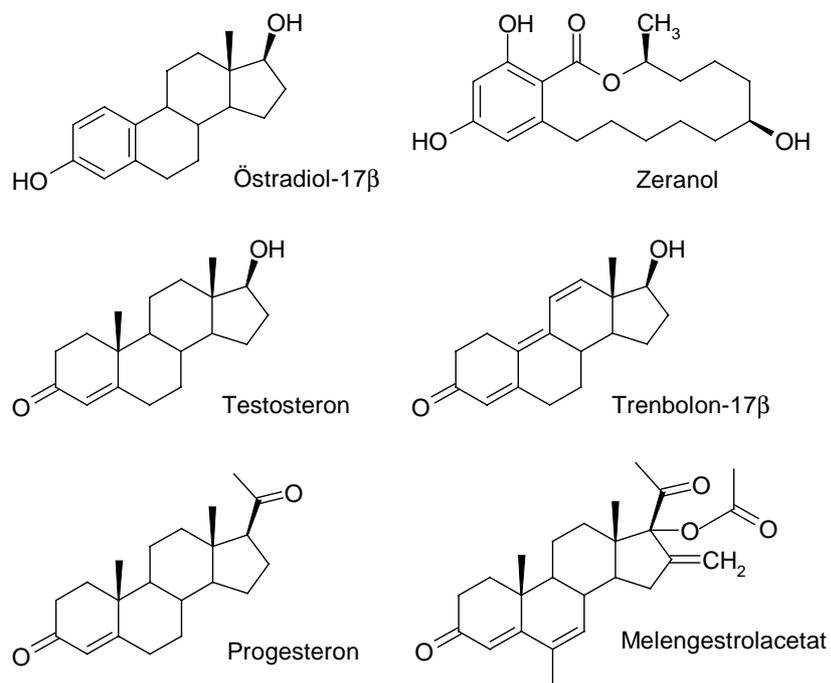


Tabelle 1: Implantationspräparate

<b>Implantationspräparat (Hersteller)</b>	<b>Wirkstoffgehalt Hauptkomponente/ Nebenkomponente</b>	<b>zugelassen für</b>
Revalor-H <sup>®</sup> (Hoechst Roussel Vet, Sommerville, USA)	140 mg Trenbolonacetat/ 14 mg Östradiol	Färsen
Finaplix-H <sup>®</sup> (Hoechst Roussel Vet, Sommerville, USA)	200 mg Trenbolonacetat	Färsen
Synovex-H <sup>®</sup> (Fort Dodge Laboratories, Fort Dodge, USA)	200 mg Testosteronpropionat/ 20 mg Östradiolbenzoat	Färsen
Synovex Plus <sup>®</sup> (Fort Dodge Laboratories, Fort Dodge, USA)	200 mg Trenbolonacetat/ 28 mg Östradiolbenzoat	Ochsen
Implus S <sup>®</sup> (Upjohn, Kalamazoo, USA)	200 mg Progesteron/ 20 mg Östradiolbenzoat	Ochsen
Component EC <sup>®</sup> (Vetlife Inc., Norcross, USA)	100 mg Progesteron/ 10 mg Östradiolbenzoat	Kälber
Compudose <sup>®</sup> (Vetlife Inc., Norcross, USA)	25,7 mg Östradiol	Rinder
Ralgro <sup>®</sup> (Mallinckrodt Veterinary Inc., Mundelein, USA)	36 mg Zeranol	Rinder

## **1.2 Anwendung und Wirkungsweise**

Die Applikation erfolgt mit Ausnahme von Melengestrolacetat, das oral wirksam ist, subkutan in Form von Depotpräparaten (Tabelle 1). Von dort aus diffundieren die Pharmaka langsam ins Gewebe, aus Estern werden rasch die entsprechenden Wirkformen freigesetzt und gelangen so zu ihren Zielorganen. Im Rahmen der Biotransformation in der Leber unterliegen sie je nach Spezies unterschiedlichem oxidativen und reduktivem Umbau, wobei sich die synthetischen Substanzen resistenter erweisen als die natürlichen. Schließlich werden die Abbauprodukte als Glucurono- oder Sulfokonjugate mit dem Urin oder der Galle ausgeschieden. Nach bakterieller Hydrolyse im Intestinaltrakt können die bilär eliminierten Verbindungen rückresorbiert werden (enterohepatischer Kreislauf), wodurch ihre Exkretion verlangsamt wird.

Östradiol-17 $\beta$  (17 $\beta$ -Estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol) ist das wirksamste natürlich vorkommende Östrogen. Seine Metaboliten Östriol, Östron und Östradiol-17 $\alpha$  werden mit einer relativen Affinität von 26 %, 14 % bzw. 13 % vom humanen Östrogenrezeptor  $\alpha$  (rhER $\alpha$ ; rekombinant hergestellt) gebunden (Seifert et al., 1999). In einem Reporterassay hingegen wurde die Aktivität von Östradiol-17 $\alpha$  gegenüber dem rhER $\alpha$  mit 7 %, die gegenüber dem rhER $\beta$  mit 2 % beschrieben (Kuiper et al., 1998). 1 – 2 mg Östradiol-17 $\beta$  oral verabreicht führten bei ovariectomierten Frauen nach dreiwöchiger Behandlung in 50 % der Fälle zu einer Entzugsblutung. Östradiol-17 $\beta$ -3-benzoat und Östron zeigten gleiche Effekte bei 8 % bzw. 240 % dieser Dosis. Die orale Wirksamkeit von Östradiol-17 $\alpha$  kann man aus Studien im Allen-Doisy-Test auf etwa 10 % schätzen (Herr et al., 1970). Östradiol-17 $\beta$  wird im Ovar, der Plazenta, den Testes und in kleineren Mengen auch der Nebennierenrinde produziert. Auch außerhalb dieser Drüsen, beispielsweise im Fettgewebe, entsteht es durch Aromatisierung von Androgenen. Östrogene sind entscheidend an der Entwicklung der weiblichen Geschlechtsmerkmale beteiligt. Sie sind im Zusammenspiel mit Progesteron wichtig für die zyklischen Veränderungen beim weiblichen Säugetier, den Transport und die Einnistung des befruchteten Eies und den normalen Verlauf einer Schwangerschaft. Unter den zahlreichen extragenitalen Wirkungen der Östrogene soll an dieser Stelle ihre wichtige Rolle beim Knochenwachstum und der Knochenreifung nicht unerwähnt bleiben. Sie zeigen bei Mädchen wie auch bei Jungen einen biphasischen Effekt mit maximaler Stimulation

in niedrigen Konzentrationen (4 pg Östradiol-17 $\beta$ /ml Serum; Cutler, 1997), während in hohen Konzentrationen der pubertäre Wachstumsschub beendet wird. In diesem Zusammenhang wird die schnellere Epiphysenreifung und der frühere Eintritt in die Pubertät bei Mädchen im Vergleich zu Jungen mit ihren in der Präpubertät höheren Östradiolgehalten erklärt (0,6 pg/ml Serum ggü. 0,08 pg/ml; Klein et al., 1994). Die anabole Wirksamkeit von Östradiol führt man auf eine Stimulation der somatotropen Achse zurück, da es die Wachstumshormonsekretion (Davis et al., 1974), die Wachstumshormonrezeptoren in der Leber (Breier et al., 1988) und die IGF1 (insulinlike growth factor 1)-Gehalte im Blut (Sauerwein et al., 1992) ansteigen lässt. Darüber hinaus wird, wie auch beim Testosteron, ein direkter Effekt auf das Muskelwachstum über spezifische Rezeptoren postuliert. Denn gerade in denjenigen Muskelpartien an Hals, Schulter und Hinterbein, die für den Sexualdimorphismus verantwortlich sind, findet man beim Kalb relativ hohe Konzentrationen an freiem und daher sensitivem Rezeptor (Sauerwein und Meyer, 1989).

Zeranol ( $\alpha$ -Zearalanol; 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12-Decahydro-7 $\alpha$ ,14,16-trihydroxy-3-methyl-1H-2-benzoxacyclotetradecin-1-on) ist ein nicht-steroidales Östrogen mit anaboler Wirkung, das großtechnisch aus Zearalenon, einem Mykotoxin aus *Fusarium spp.*, synthetisiert wird. Es tritt aber auch natürlich als Metabolit in *Fusarium spp.*-Kulturen auf (Richardson et al., 1985). Im Rind wird Zeranol zu Zearalanon und Taleranol ( $\beta$ -Zearalanol) abgebaut und frei oder konjugiert als Glucuronid oder Sulfat ausgeschieden (FAO, 1987). In sexuell unreifen Ratten wurde anhand der uterotropen Wirkung nach oraler Gabe eine relative östrogene Wirkung gegenüber Östradiol-17 $\beta$  von 1/150 für Zeranol, 1/400 für Zearalanon und 1/350 für Taleranol festgestellt (Everett et al., 1987). Die relative Affinität zum rhER $\alpha$  wird für Zeranol mit 57 %, für Taleranol mit 19 % und für Zearalanon mit 13 % angegeben (Seifert et al., 1999).

Testosteron (17 $\beta$ -Hydroxyandrost-4-en-3-on), neben 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron das wichtigste natürliche Androgen, wird hauptsächlich in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens, aber auch im Ovar und der Nebennierenrinde synthetisiert. Es fördert die Ausbildung männlicher Geschlechtsmerkmale und verbessert durch seinen anabolen Wirkanteil die Stickstoffbilanz und damit die Wachstumsrate. Dieser Effekt lässt sich neben der unmittelbaren rezeptorvermittelten Stimulation der Proteinsynthese (Sauerwein und Meyer, 1989) durch seine antiglucocorticoiden Eigenschaften (Danhaive und Rousseau, 1988) wie

auch durch eine Stimulation der Wachstumshormonausschüttung (Davis et al., 1977) erklären. Allerdings kann man aufgrund der Aromatisierbarkeit von Testosteron seinen Einfluss auf die somatotrope Achse nicht losgelöst von dem der Östrogene betrachten (Davis et al., 1977).

Trenbolon (17 $\beta$ -Hydroxyestra-4,9,11-trien-3-on) werden neben seiner androgenen auch gestagene (Bauer et al., 2000; Meyer und Rapp, 1985) und antiglucocorticoide Wirkungen (Danhaive und Rousseau, 1986) zugeschrieben. Die androgene Wirkung von Trenbolonacetat wird etwa drei- bis fünfmal stärker als die von Testosteronpropionat angegeben, die anabole sogar acht- bis zehnmal (Neumann 1975). Zur Wachstumsförderung beim Rind wird es in Form von Trenbolonacetat appliziert, im Körper jedoch rasch in das aktive Trenbolon-17 $\beta$  umgewandelt, das weiter zu Trendion oxidiert und schließlich zum Epimer Trenbolon-17 $\alpha$  reduziert wird (Pottier et al., 1981). Trenbolon-17 $\beta$  und seine Abbauprodukte binden unterschiedlich stark an den Androgenrezeptor. In einem Bindungsassay mit rekombinant hergestelltem humanen Androgenrezeptor (rhAR) konnten relativ zu 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron 109 % Bindung bei Trenbolon-17 $\beta$ , 4,5 % bei Trenbolon-17 $\alpha$  und 0,36 % bei Trendion gemessen werden. Für Testosteron wurde zum Vergleich ein Wert von 31 % angegeben (Bauer et al., 2000). Die gegenüber Progesteron gemessene relative Affinität des bovinen Gestagenrezeptors beläuft sich auf 137 % für Trenbolon-17 $\beta$ , 2,0 % für Trenbolon-17 $\alpha$  und 1,0 % für Trendion (Bauer et al., 2000). Die relative Bindungsaffinität des bovinen Glucocorticoidrezeptors gegenüber Trenbolon-17 $\beta$  beträgt 9,4 % im Verhältnis zu Cortisol (Bauer et al., 2000).

Progesteron (Pregn-4-en-3,20-dion) ist das wichtigste endogene Gestagen und als Synthesestufe weiterer Hormone in allen steroidproduzierenden Organen zu finden. Hauptproduktionsorte sind das Corpus luteum und die Plazenta. Zu seinen wichtigsten Funktionen gehört es, den Uterus für die Nidation der befruchteten Eizelle vorzubereiten und die Schwangerschaft zu erhalten. Eine ihm anfänglich zugeschriebene Wachstumsförderung (Gassner et al., 1960) konnte später jedoch nicht mehr untermauert werden (Meyer, 2001).

Melengestrolacetat (MGA; 17 $\alpha$ -Acetoxy-6-methyl-16-methylenpregna-4,6-dien-3,20-dion) wirkt ebenfalls gestagen, ist jedoch im Gegensatz zu Progesteron oral wirksam. Es hat die zehnfache bis hundertfache orale Wirksamkeit von Chlormadinonacetat oder Medroxyprogesteronacetat. Parenteral ist es beim Rind 125-mal potenter, den Östrus zu hemmen, als Progesteron (Lauderdale, 1983). Die relative Bindung an den

bovinen Progesteronrezeptor ist etwa fünfmal höher als die von Progesteron (Bauer et al., 2000). Darüber hinaus wurden ihm glucocorticoide Effekte zugeschrieben (Duncan et al., 1964). Die relative Bindung an den rhAR gegenüber 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron lässt mit 0,3 % nicht auf androgene Nebenwirkungen schließen (Bauer et al., 2000). MGA wird in Dosen von 0,6  $\mu$ g/kg zur Zyklussynchronisation bzw. 0,5 mg/Tag bei Färsen zur Wachstumsförderung eingesetzt. Seine Wirkung beruht auf einer Steigerung der endogenen Östradiolsynthese (Henricks et al., 1997). Nach Dosen von 0,5 mg/Tag steigt bei Färsen der Plasmagehalt an Östradiol-17 $\beta$  um das Vier- bis Fünffache bis auf Peakniveaus des normalen Zyklus an. Doch das durch zunehmende Östradiolkonzentrationen ausgelöste positive Feedback, das normalerweise die Ovulation auslöst, wird durch MGA gehemmt und der Zyklus in der späten Follikelphase angehalten (Hageleit et al., 2000).

### **1.3 Missbrauchsszenarien**

Die sechs genannten hormonalen Leistungsförderer werden außer Melengestrolacetat in Form von Implantaten verabreicht. Diese sind ohne veterinärmedizinische Aufsicht unter der Auflage einer „Guten Veterinärpraxis“ (GVP) zur Anwendung zugelassen. Das heißt, die Applikation muss unter genauer Befolgung der Herstelleranweisungen erfolgen und das Hormondepot muss während des Schlachtvorgangs entfernt werden, da durch die in den Implantationsstellen verbliebenen Wirkstoffrückstände hohe Hormonmengen in die Nahrungskette gelangen und eine Gefährdung für den Verbraucher darstellen können (Daxenberger et al., 2000). Rechnet man mit einem Fleischanteil von 200 kg bei einer schlachtreifen Färsen und einer Portionsgröße von 250 g, so besteht für den Konsumenten zwar nur eine Wahrscheinlichkeit von etwa 0,1 %, eine komplette Implantationsstelle zu verzehren, doch sollte eine umfassende Bewertung der Anwendungspraxis von Hormonimplantaten auch Risiken dieser Größenordnung nicht aus den Augen verlieren. Darüber hinaus betonte die WTO in ihrem Schiedsspruch, dass sich eine Risikobewertung nicht allein auf Ergebnisse stützen darf, die unter streng kontrollierten Bedingungen in einem Labor erzielt wurden, sondern auch die Bedingungen des realen Lebens berücksichtigen soll (WTO, 1998). Da insbesondere Folgen missbräuchlicher Anwendung in den bisherigen

Untersuchung außer Acht gelassen wurden, standen sie im Mittelpunkt der vorliegenden Studien.

Nach den gültigen Standards dürfen Implantationspräparate nur subkutan in das mittlere Drittel auf der Rückseite des Ohres appliziert werden. Selbst aus Herstellerstudien geht jedoch hervor, dass Implantationen am falschen Ort durch falsche Techniken vorkommen können (Hoechst Roussel Vet, 1999b). Besonders bei unruhigen Tieren besteht bei Abwehrbewegungen die Gefahr, dass der Implantateur während der Applikation abrutscht und das Präparat in den Ohrgrund, andere Kopfpartien oder den Hals gesetzt wird. Falsches Management kann gerade auch in Großbetrieben mit mehreren Mitarbeitern durch mangelnde Koordination unbeabsichtigt zu Mehrfachapplikationen führen. Bei schlechter Dokumentation kann es zu früh und damit zu oft zum erneuten Setzen von Implantaten kommen. Wie in 1.1 erläutert wurde, sind die unterschiedlichen Wirkstoffe nur für bestimmte Spezies zugelassen. Mangelnde Information oder ein beabsichtigtes Zuwiderhandeln kann auch hier zu Verstößen führen. Auszuschließen ist auch nicht, dass mit dem Ziel, höhere Gewinne zu erwirtschaften, Präparate nicht ins Ohr, sondern in minderwertige Fleischpartien gesetzt werden. Dort können sie möglicherweise beim Schlachtvorgang nicht entdeckt werden und der Landwirt könnte im Rahmen von Programmen, die Rindfleisch unbehandelter Tiere propagieren, höhere Preise erhalten. Ein finanzielles Plus mag sich der Viehzüchter auch erwarten, wenn er mehrere Implantate setzt, um die pharmakologische Wirkung und damit die Futterumsetzungsrate vermeintlich noch zu steigern. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass wiederholte Behandlung sowohl von Seiten der Hersteller wie auch der Wissenschaft empfohlen wird (Griffin und Mader, 1997; Smith et al., 1999). Weiteres Missbrauchspotential stellt sich auf dem Gebiet der Ebermast dar. Eber sind hinsichtlich ihres Fleischansatzes sehr vielsprechend. Ein Hindernis ist jedoch der Geruch, der Fleisch von adulten Ebern anhaftet. Er wird einerseits verursacht durch Skatol, ein Amin, das durch mikrobielle Umsetzung bei der Verdauung entsteht. Die zweite Komponente ist das Sexualpheromon  $5\alpha$ -Androst-16-en-3-on, das im Hoden synthetisiert wird. Durch Gabe von Androgenen kann seine Produktion durch negatives hypothalamisches Feedback gedrosselt werden (Daxenberger et al., 2001).

### **1.4 Transplazentaler Übergang exogener Hormone in den Fötus**

Aufgrund der Bedeutung von Hormonen bei der Steuerung der Entwicklung können Störungen des endokrinen Systems diesbezüglich tiefgreifende Folgen haben (Gray und Ostby, 1998). Im Rahmen einer Neubewertung des Einsatzes hormonal wirksamer Leistungsförderer werden deshalb immer wieder auch deren mögliche Einflüsse auf Entwicklungsstörungen und die Entstehung bestimmter Krebsformen diskutiert (European Commission, 1999).

Sexualhormone spielen bereits im Fötus eine wichtige Rolle bei der Geschlechtsrealisation und der Prägung der Gehirnentwicklung (Spindler, 1997). So fördert in fötalen Leydig-Zellen produziertes Testosteron die Differenzierung der Wolffschen Gänge und deren Umwandlung zu Nebenhoden und löst darüber hinaus die Bildung von Samenblase und Prostata aus (Spindler, 1997). Auch das Sexualverhalten erwachsener Säuger wird durch Testosteron beeinflusst, das im Hoden des Konzeptus gebildet wird. Es wird von bestimmten Hirnregionen, insbesondere dem Hypothalamus, aufgenommen und durch Aromatase zu Östradiol umgesetzt. Ist der Östradiolgehalt im fötalen Gehirn reduziert, führt das zu einer Abnahme typischer männlicher Verhaltensweisen im Erwachsenenalter (Spindler, 1997).

Während die Geschlechtsdifferenzierung bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt abgeschlossen ist, kann die Entwicklung der Reproduktionsorgane und des Zentralnervensystems auch noch in späteren Phasen durch Noxen negativ beeinflusst werden (Gray und Ostby, 1998). In diesem Zusammenhang wird auch immer wieder die Rolle sogenannter „endocrine disruptors“ erörtert (Gray und Ostby, 1998). Damit sind Substanzen gemeint, die das Hormonsystem negativ beeinflussen können, sei es, indem sie die Wirkungen endogener Hormone imitieren oder antagonisieren, ihr Synthese- oder Metabolisierungsmuster oder den Gehalt an Hormonrezeptoren verändern (Sonnenschein und Soto, 1998). Herbizide, wie Atrazin, die Insektizide DDT, Lindan und Dieldrin, das Fungizid Hexachlorbenzol und Industriechemikalien wie Bisphenol-A, Phthalate, Alkylphenole und polychlorierte Biphenyle werden u. a. zu den „endocrine disruptors“ gezählt (Sonnenschein und Soto, 1998). Neben diesen Xenobiotika werden aber auch Phytoöstrogenen, wie Isoflavonen, Coumestanen, Lignanen oder Phytosterolen und Mykoöstrogenen entsprechende Effekte zugeschrieben (Fritsche und Steinhart, 1999), ganz

abgesehen von kontraceptiven Wirkstoffen und hormonalen Leistungsförderern. Zwischen der wachsenden Belastung mit „endocrine disruptors“ und dem verstärkten Auftreten bestimmter Krebsformen werden ursächliche Zusammenhänge vermutet (Sonnenschein und Soto, 1998). Auch die Zunahme an Hodenkeimzellkrebs, die in den letzten 50 Jahren bei Männern in der Altersgruppe zwischen 25 und 40 beobachtet wurde, ist ein Aspekt dieser anhaltenden Diskussion (Rajpert-De Meyts und Skakkebæk, 2000). Die Formen des Hodenkrebses bei jungen Erwachsenen entwickeln sich aus nicht-invasivem Carcinoma *in situ* (CIS), das früh in einer Keimzelle entsteht (Skakkebæk et al., 1987). Da insbesondere bei Personen mit Kryptorchidismus und anderen angeborenen Fehlern der Gonadenentwicklung Hodenkrebs mit einer hohen Inzidenz auftritt, sieht man verstärkte Anzeichen für den Einfluss intrauteriner Faktoren bei der malignen Transformation von Keimzellen (Dieckmann und Skakkebæk, 1999). Vor diesem Hintergrund werden auch die Auswirkungen einer *in utero*-Exposition gegenüber hormonell wirksamen Substanzen untersucht. Während zu Zeranol und Trenbolon unter anderem auch im Rahmen ihrer Evaluierung durch das JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (WHO, 1988) schon Studien zu ihrer Teratogenität durchgeführt wurden, unterblieb es jedoch bisher, besonderes Augenmerk auf die Differenzierung und neoplastischen Transformation von Keimzellen zu richten. Darüber hinaus wurden derartige Studien meist an Ratten oder Mäusen durchgeführt. Bisher wurden atypische Keimzellen, die CIS im menschlichen Hoden ähneln, jedoch nur bei Kaninchen (Veeramachaneni und Vandewoude 1999) und bei Pferden (Veeramachaneni und Sawyer, 1998) beobachtet. In beiden Fällen waren diese Zellen mit einem sich entwickelnden intratubulären Seminom assoziiert, ließen sich also mit CIS in Verbindung bringen (Veeramachaneni, 2000). Kaninchen eignen sich demnach als Modellorganismen, um in Bezug auf die Spermatogenese und testikuläre Neoplasmen Parallelen zum Menschen ziehen zu können (Skakkebæk et al., pers. Mitteilung). Da sie darüber hinaus eine relativ lange Phase der Entwicklung und Differenzierung der Reproduktionsorgane besitzen, wird eine Untersuchung der Exposition in gerade dieser wichtigen Periode der pränatalen Entwicklung erleichtert (Gondos et al., 1973; Gondos et al., 1975).

## 2. Aufgabenstellung

Die Arbeit war daraufhin ausgerichtet, Rückstände nach missbräuchlicher Anwendung von Hormonimplantaten zu erfassen und dabei ein möglichst breites Spektrum potentieller Missbrauchsmöglichkeiten abzugreifen. Dazu wurde folgendes Versuchsdesign entwickelt: In einer ersten Studie sollten Implantationen von Revalor-H<sup>®</sup>, einem in Nordamerika häufig verwendeten Präparat, am falschen Ort, bei verbotenen Spezies und mit unterschiedlich langen Wartezeiten vor der Schlachtung geprüft werden. Auch weitere sieben Präparate (vgl. Tabelle 1), die das gesamte Wirkstoffspektrum umfassten, wurden hinsichtlich ihrer Rückstände nach Applikation in Muskelgewebe untersucht. Dabei wurde zwischen den herauspräparierten Implantaten sowie direkt und weiter umgebendem Gewebe differenziert. Eine zweite Studie befasste sich mit dem Thema Mehrfachdosierung. Ziel war dort neben der Untersuchung der Implantationsstellen (Pellets, Ohr, Ohrgrund) speziell die Bewertung der Rückstandssituation in den peripheren, essbaren Geweben Lende, Leber, Niere und Nierenfett. Die drei Formulierungen Finaplix-H<sup>®</sup>, Synovex-H<sup>®</sup> und Ralgro<sup>®</sup> wurden ausgewählt, um ein breites Wirkstoffspektrum abzudecken. Im dritten Versuch wurde der Aspekt „verbotene Spezies“ bzw. „verbotenes Alter“ aufgegriffen: Eber und Kälber wurden mit den testosteron- und trenbolonhaltigen Präparaten Synovex-H<sup>®</sup> und Synovex Plus<sup>®</sup> behandelt. Während bei den Ebern der Schwerpunkt auf den Implantationsstellen (s. o.) lag, wurden bei den Kälbern auch Rückstände in den peripheren Geweben untersucht.

Abschließender Teil der Arbeit war eine systematische Studie zum plazentalen Transfer exogener Hormone in den Fötus im Rahmen einer Forschungszusammenarbeit zur Entstehung von CIS. Nach pränataler Exposition von Kaninchen in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit wurde die Wirkstoffverteilung von Trenbolon, Zeranol und Melengestrolacetat in Muttertier und Föten analysiert, um konkrete Relationen zu eventuellen Entwicklungsstörungen aufstellen zu können. Die Ergebnisse können später als Basis für *in vitro*-Studien dienen.

Methodische Grundlage war die hochleistungsflüssigchromatographische Analyse der Implantat- bzw. Gewebeextrakte mit anschließender UV-Detektion bei den Implantationsstellen und ELISA-Detektion bei der Analyse der peripheren Gewebe. Bereits etablierte Methoden sollten durch interne Standardisierung validiert werden und die Identität der Rückstände durch massenspektrometrische Verfahren

abgesichert werden. Die Ergebnisse sollten zu einer aktualisierten Bewertung des Risikos führen, das sich für den Konsumenten ergibt, wenn Implantationspräparate unter Missachtung der Vorschriften angewendet werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Tierversuch, Probennahme und -präparation

#### 3.1.1 Studie 1: Fehlapplikation von Implantationspräparaten am falschen Ort

Tabelle 2 zeigt einen Überblick über das Versuchsdesign von Studie 1. Im Basisversuch 1.1 wurden fünf Holstein-Friesian Färsen acht Wochen lang mit Revalor-H<sup>®</sup> in einfacher Dosierung behandelt. Die Implantate wurden in die Halsmuskulatur etwa 6 cm unterhalb der Halswirbelsäule mit Hilfe der Originalimplantationspistolen gesetzt. Dieses Grundexperiment wurde in den übrigen Versuchsabschnitten in Bezug auf Implantationsort (Studie 1.2; vgl. Abbildung 2), Implantationspräparat (1.3), Behandlungsdauer bzw. Menge der Implantate (1.4) und sexuellen Status der Tiere (1.5) variiert. Parallel wurden zwei unbehandelte Färsen als Kontrollen gehalten (1.6). Alle Tiere wurden in der institutseigenen Versuchsstation Veitshof aufgestellt.

Die Färsen waren zu Beginn des Versuchs 77 bis 99 Wochen alt und im Mittel 367 kg schwer. Das Alter des Ochsen betrug 102 Wochen (389 kg Anfangsgewicht), das des männlichen Kalbes 13 (140 kg) und das des weiblichen 14 Wochen (105 kg). Die mittleren Zunahmen lagen bei den behandelten Färsen bei 15 % im Vergleich zu 12 % der Kontrollgruppe. Der Ochse nahm im Behandlungszeitraum um 36 %, die Kälber um 58 % (männlich) bzw. 9 % (weiblich) zu.

Nach der Schlachtung wurden die Injektionsstellen, soweit sie lokalisiert werden konnten, großzügig herausgeschnitten (1,5 – 3 kg) und bis zur Aufarbeitung bei –20°C gelagert.

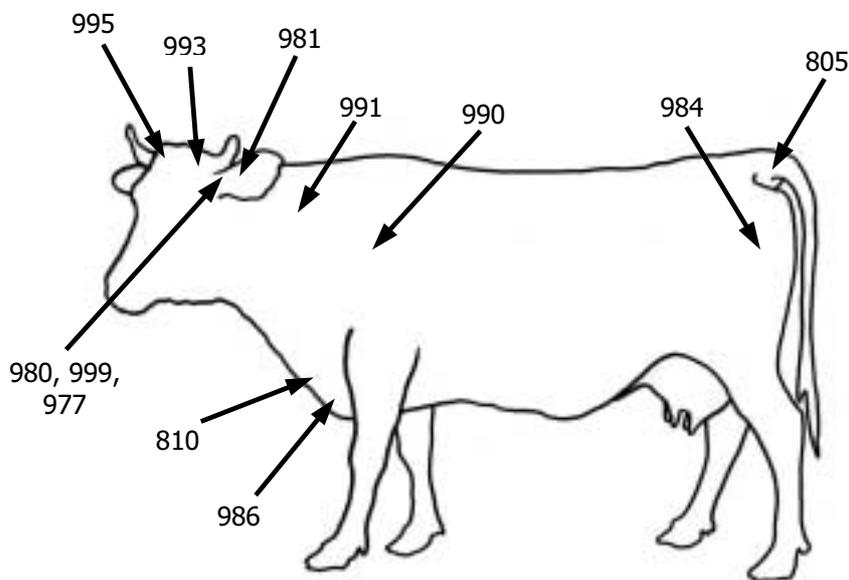
Bei der Aufarbeitung der Implantationsstellen wurden die Pellets, soweit sie detektierbar waren, vorsichtig aus dem Gewebe präpariert, um sie getrennt von diesem zu analysieren. 7 der 32 Implantate (Tiernummer 804, 805, 993, 983, 809, eine der drei von 901 und 010) konnten nicht wieder gefunden werden. Dort wurde - außer bei 901 - eine Gewebeprobe um die mutmaßliche Einstichstelle herum entnommen. Mit Ausnahme der Krone (1.2) wurde Gewebe in einem Umkreis von ca. 2,5 cm um die zurück gebliebenen Pellets (sog. „innerer Implantationsbereich“) von nochmals etwa 1,5 cm darum herum liegendem „äußerem Implantationsbereich“ (jeweils ca. 30 – 250 g; nicht bei 804, 983 und 010) getrennt. Im Falle der

Tabelle 2: Versuchsdesign Studie 1

Studie	Tier#	Ort der Implantation	Präparat	Dosis	Dauer (Tage)	Sexueller Status
1.1	804	Hals ( <i>M. splenius, M. serratus</i> )	Revalor-H <sup>®</sup>	1	56	Färse
	992					
	801					
	811					
	988					
1.2	981	Ohrmuschel	Revalor-H <sup>®</sup>	1	56	Färse
	980	Ohrgrund a ( <i>M. cervicoauricularis</i> )				
	999	Ohrgrund b ( <i>M. cervicoscutularis</i> )				
	977	Ohrgrund c ( <i>M. cervicoauricularis</i> )				
	993	Scutulum				
	995	Krone ( <i>M. frontalis</i> )				
	991	Hals, subkutan				
	990	Schulter ( <i>M. deltoideus</i> )				
	810	Brustmuskel ( <i>M. pectoralis desc.</i> )				
	986	Wamme				
	805	Schwanzansatz ( <i>M. coccygeus</i> )				
	984	Hinterbein ( <i>M. semitendinosus</i> )				
1.3	996	Hals ( <i>M. splenius, M. serratus</i> )	Finaplix-H <sup>®</sup>	1	56	Färse
	000		Synovex Plus <sup>®</sup>			
	975		Synovex-H <sup>®</sup>			
	994		Compudose <sup>®</sup>			
	982		Component EC <sup>®</sup>			
	985		Implus S <sup>®</sup>			
	983		Ralgro <sup>®</sup>			
1.4	809	Hals ( <i>M. splenius, M. serratus</i> )	Revalor-H <sup>®</sup>	1	84	Färse
	978			1	28	
	901			3	28, 84, 140	
1.5	010	Hals ( <i>M. splenius, M. serratus</i> )	Revalor-H <sup>®</sup>	1	56	Ochse
	922					Männl. Kalb
	521					Weibl. Kalb
1.6	987	-	-	-	56	Färse
	998					

Ohrmuschel (1.2) wurde eine ca. 3 cm große Region um die Injektionsstelle als innere Region (ca. 20 g) und der Ohrgrund (ca. 40 g) als äußere Region genommen. Die Gewebe wurden in Würfel von ca. 0,1 g geschnitten und im Verhältnis 1 : 1 (Ohr: 1 : 2) mit 67 mM Phosphatpuffer pH 7,2 homogenisiert und à 8 g aliquotiert. Nur der Innenbereich aus Versuch 1.2, Hals, subkutan, sowie die Außenbereiche von Wamme und Scutulum (jeweils Unterhautfettgewebe) wurden à 2 g ohne Puffer weiterverarbeitet.

Abbildung 2: Unterschiedliche Implantationsorte (Studie 1.2)



### 3.1.2 Studie 2: Mehrfachdosierung bei Färsen

Gruppen von je acht Holstein-Friesian Färsen (Alter: 54 - 73 Wochen; Anfangsgewicht Kontrollgruppe 323 kg, mittlere Zunahme 9,8 %; Anfangsgewicht Behandlungsgruppe: 320 kg, mittlere Zunahme 15 %) wurden auf dem Hof der Familie Heigel in Schweitenkirchen aufgestellt und acht Wochen vor der Schlachtung mit den Hormonimplantaten Finaplix-H<sup>®</sup>, Ralgro<sup>®</sup> bzw. Synovex-H<sup>®</sup> behandelt. Jeweils zwei Tiere erhielten die einfache, die dreifache oder die zehnfache Dosis, zwei blieben unbehandelt. Gemäß den Angaben der Hersteller wurden die Implantate subkutan in das mittlere Drittel der Rückseite des rechten Ohres appliziert. Bei der Zehnfachbehandlung wurden jeweils fünf Implantate in beide Ohren injiziert.

Bei der Schlachtung wurden die Implantationsstellen sowie Lende, Leber, Niere und Nierenbeckenfett entnommen und anschließend bei – 20 °C aufbewahrt.

Die Ohren wurden wie in 3.1.1 präpariert. Lende (ca. 50 g) wurde zu gleichen Teilen mit 67 mM Phosphatpuffer pH 7,2 homogenisiert und à 8 g aliquotiert. Niere und der innere Bereich der Leber (je ca. 30 g) wurden mit der doppelten Menge an 0,5 M Acetatpuffer pH 4,8 homogenisiert und zu je 3 g aufgeteilt. Das Nierenbeckenfett wurde fein auf etwa Getreidekorngröße gewürfelt und 2 g davon zur Analyse eingesetzt.

### 3.1.3 Studie 3: Behandlung von Ebern und Kälbern

Jeweils vier Eber (Deutsche Landrasse x Pietrain) wurden in der Versuchsstation Thalhausen (Lehrstuhl für Tierzucht, TU München-Weihenstephan) im Alter von 137 Tagen für die letzten 35 Tage der Mast mit Synovex-H<sup>®</sup> bzw. Synovex Plus<sup>®</sup> in zweifacher Dosis behandelt (Ausgangsgewicht: 79 kg, mittlere Zunahme: 38 %). Die Implantate wurden mit Hilfe der Originalimplantationspistolen 4 – 5 cm tief in die Halsmuskulatur auf der Höhe der *M. cleidomastoideus* und *M. cleidooccipitalis* appliziert. Vier unbehandelte Eber dienten als Kontrollen (Ausgangsgewicht: 80 kg, mittlere Zunahme: 37%).

In der Versuchsstation Veitshof wurden je zwei weiblichen Holstein-Friesian Kälbern von 24 bis 30 Wochen 56 Tage vor der Schlachtung die Präparate Synovex-H<sup>®</sup> bzw. Synovex Plus<sup>®</sup> in die Ohrmuschel implantiert (vgl. 3.1.2). Zwei Kälber bildeten die Kontrollgruppe.

Die behandelten wie auch die unbehandelten Tiere zeigten bei einem Ausgangsgewicht von 145 kg bzw. 165 kg innerhalb der 8 Wochen eine Zunahme von 28 %.

Auch hier wurden bei der Schlachtung die Implantationsstellen sowie Lende, Leber, Niere und Nierenbeckenfett entnommen. Die Präparation der Implantationsstellen erfolgte wie in 3.1.1 erläutert (ca. 50 g Innenbereich und 100 g Außenbereich bei den Ebern). Die peripheren Gewebe der Kälber wurden wie in 3.1.2 zur Analyse vorbereitet.

### 3.1.4 Studie 4: Behandlung trächtiger Kaninchen

Die Versuchsgruppe umfasste sieben trächtige Dutch-Belted Kaninchen mit einem Gewicht von ca. 2,5 kg zu Behandlungsbeginn. Zwei wurden ab Tag 14 der Trächtigkeit bis Tag 27 täglich mit 0,5 mg Melengestrolacetat/kg Körpergewicht in Maissirup gefüttert, zwei erhielten an Tag 14, 21 und 27 jeweils eine Injektion subkutan von 0,5 mg Trenbolonacetat/kg Körpergewicht in Färberdistelöl und einem Tier wurde an Tag 14 der Trächtigkeit subkutan ein Zeranolimplantat (0,25 mg/kg Körpergewicht) gesetzt. Zwei Tiere blieben unbehandelt. Bei der Schlachtung an Tag 27 wurden den Muttertieren und Föten Muskel-, Leber-, Nieren- und Fettproben sowie die Plazenten entnommen.

Das Experiment wurde am Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory der Colorado State University (Fort Collins, USA) durchgeführt. Von dort wurden die Proben auf Trockeneis versandt und anschließend bis zur Analyse bei – 20 °C gelagert. Je Muttertier wurden ein männlicher und ein weiblicher Fötus untersucht, vom mit Zeranol behandelten je zwei.

Die Gewebe wurden mit dem Skalpell fein zerkleinert und mit Ausnahme des Fettes in Puffer homogenisiert. Muskel sowie alle Gewebe zur Analyse auf Melengestrolacetat wurden in 67 mM Phosphatpuffer pH 7,2 aufgenommen, die übrigen Leber-, Nieren- und Plazentaprobe in 0,5 M Acetatpuffer pH 4,8. Zur besseren Übersicht zeigt Tabelle 3 die unterschiedlichen Mengenverhältnisse an Gewebe und Puffer, sowie die zur Analyse eingesetzten Quantitäten. Aufgrund der sehr geringen Probenmengen (< 1 g) mussten die Gewebe zum Teil in reichlich Puffer aufgenommen werden, um sie gut homogenisieren zu können.

Tabelle 3: Aufarbeitungsschema der Kaninchenproben

<b>Gewebe</b>	<b>Verhältnis Gewebe : Puffer</b>	<b>Einwaage [g]</b>
Maternaler Muskel	1 : 2	4
Maternale Leber/Niere	1 : 2	1
Maternales Fett	-	1
Plazenta	1 : 3	6
Fötaler Muskel	1 : 10	1 - 2
Fötale Leber	1 : 5	2
Fötale Niere	1 : 10	1
Fötale Fett	-	0,1 – 0,2

## **3.2 Extraktion**

### **3.2.1 Implantate**

Die Pellets wurden in 8 ml Reinstwasser aufgenommen und dreimal mit 8 ml tert. Butylmethylether (mindestens 2 h) bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach jeder Extraktion wurden die Suspensionen bei 850 x g und 4 °C 20 min zentrifugiert und anschließend bei – 60 °C eingefroren. Die organische Phase wurde dekantiert und bei 60 – 80 °C im Wasserbad unter Schütteln evaporiert. Der Rückstand wurde in 10 ml Methanol vollständig rückgelöst und 100 µl davon bei 60 °C in einer Evaporatorzentrifuge unter vermindertem Druck (3 hPa) zur Trockene eingedampft. Vor der HPLC wurde in Acetonitril aufgenommen und je nach zu erwartendem Rückstandsgehalt verdünnt (Daxenberger et al., 2000).

### **3.2.2 Muskel und Bindegewebe**

Die Aufarbeitung erfolgte in Anlehnung an die bei Meyer und Hoffmann (1987) beschriebene Methode (Daxenberger et al., 2000; Lange et al., 2001).

Nach der Zugabe von internem Standard (vgl. 3.6) wurden die Proben zweimal mit je 8 ml tert. Butylmethylether (Kaninchengewebe: 5 ml) bei Raumtemperatur extrahiert (Implantationsstellen: zweimal über Nacht; periphere Gewebe: 2 h und über Nacht). Die Kaninchenproben zur Analyse auf Melengestrolacetat wurden nach Hageleit et al. (2001) mit 5 ml Petroleumbenzin zweimal 2 h bei 40 °C im Wasserbad geschüttelt. Die Suspensionen wurden bei 850 x g und 4 °C 15 min zentrifugiert und mindestens 30 min bei – 60 °C eingefroren. Der Überstand wurde dekantiert und bei 60 – 80 °C im Wasserbad unter Schütteln evaporiert. Zur Entfernung störenden Fettes wurde der noch warme Rückstand in Methanol gelöst (Implantationsstellen: 2 ml; periphere Gewebe: 1,25 ml) und für mindestens 30 min bei – 60 °C eingefroren. Die Proben wurden bei 2000 x g und - 10 °C 15 min zentrifugiert, die Methanolphase dekantiert und mit Reinstwasser verdünnt (Implantationsstellen: 4,5 ml; periphere Gewebe: 5 ml, da hier wegen des kleineren Fettpellets mehr Methanol dekantiert werden konnte). Anschließend erfolgte eine Octadecylsilicagel-Festphasenreinigung der Extrakte. Dazu wurden die Säulchen mit 2 ml Methanol gewaschen und mit 2 ml 20 mM Tris-HCl pH 8,5/Methanol 80/20 (v/v) equilibriert. Nach dem Auftragen der Probe folgte Waschen mit 2 ml 20 mM Tris-HCl pH 8,5/Methanol 80/20 (v/v) und 2 ml

40 % Methanol, bevor die Analyten mit 1,5 ml Methanol (Implantationsstellen; zur besseren Erfassung der Steroidester) bzw. 1,5 ml 80 % Methanol (periphere Gewebe) eluiert wurden. Das Solvens wurde bei 60 °C in einer Evaporatorzentrifuge (vgl. 3.2.1) entfernt und der Trockenrückstand in 400 µl Acetonitril (Implantationsstellen Innenbereich), 100 µl Acetonitril (Implantationsstellen Außenbereich) bzw. 300 µl 20 mM Tris-Acetat pH 7,2/Acetonitril 80/20 (v/v) (periphere Gewebe) aufgenommen.

### **3.2.3 Leber, Niere und Plazenta**

Nach Zugabe von internem Standard und 8 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (EC 3.2.1.31 und EC 3.1.6.1) wurden die Proben für 2 h bei 37 °C zur Hydrolyse konjugierter Steroide inkubiert. Anschließend wurden die Proben jeweils zweimal mit 5 ml tert. Butylmethylether extrahiert (2 h und über Nacht). Der weitere Analyseprozess folgte den Angaben für peripheres Muskelgewebe.

Leber, Niere und Plazenta zur Analyse auf Melengestrolacetat wurde ohne Hydrolyse wie Muskelgewebe behandelt.

### **3.2.4 Nierenbeckenfett**

Nach Zugabe von internem Standard wurden die Proben zweimal mit 8 ml (Kaninchen: 5 ml) tert. Butylmethylether bzw. Petroleumbenzin bei Melengestrolacetat bei 40 °C im Wasserbad extrahiert (2 h und über Nacht). Die Probengefäße wurden bei 900 x g und – 10 °C 15 min zentrifugiert und die organische Phase dekantiert. Die vereinigten Etherphasen wurden evaporiert und der Rückstand warm in 2 ml Methanol (Kaninchen: 1,25 ml) aufgenommen, gut geschüttelt und für mindestens 30 min bei – 60 °C eingefroren. Die Überstände wurden mit Reinstwasser verdünnt und einer Festphasenreinigung an Octadecylsilicagel unterzogen, wie für peripheres Muskelgewebe beschrieben (3.2.2).

## **3.3 HPLC-DAD (Implantationsstellen)**

20 µl Extrakt in Acetonitril wurden auf einer RP18-Säule (PRONTOSIL, 250 x 4.0 mm) aufgetrennt (Probenschleife: 100 µl). Als Eluens für Trenbolon-17β, Östradiol-

17 $\beta$ , Testosteron, Zeranol und Equilenin diente Acetonitril/20 mM Tris-Acetat pH 7,2 42/58 (v/v). Nach 20 min wurde der Anteil von Acetonitril auf 70 % erhöht, um Trenbolonacetat, Östradiolbenzoat, Testosteronpropionat, Progesteron, Testosteronacetat und 16 $\alpha$ -Methylprogesteron zu erfassen (Flussrate: 1 ml/min, Säulentemperatur: 25 °C).

Die Substanzen wurden anhand ihrer charakteristischen Retentionszeiten und ihrer spezifischen UV-Spektren identifiziert (vgl. Tabelle 4).

Die Kalibrierung des HPLC-Systems erfolgte durch Integration der Peakflächen (jeweils am Absorptionsmaximum) von sechs Kalibrierlösungen, deren Konzentrationen mindestens eine Zehnerpotenz abdeckten, und anschließende lineare Regression ( $r^2 > 0,999$ ).

Tabelle 4: Retentionszeiten HPLC-DAD

<b>Substanz</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>	<b>Absorptionsmaximum [nm]</b>
Trenbolon-17 $\beta$	8,3	340
Zeranol	10,7	261
Östradiol-17 $\beta$	11,6	281
Testosteron	13,1	240
Equilenin	14,8	230
Trenbolonacetat	26,3	340
Progesteron	27,2	240
16 $\alpha$ -Methylprogesteron	30,0	240
Testosteronacetat	30,3	240
Testosteronpropionat	36,1	240
Östradiolbenzoat	37,6	281

### **3.4 HPLC-ELISA (periphere Gewebe)**

#### **3.4.1 HPLC**

250  $\mu$ l Extrakt in 20 mM Tris-Acetat pH 7,2/Acetonitril 80/20 (v/v) wurden auf die RP18-HPLC-Säule (PRONTOSIL, 250 x 4,0 mm) aufgetragen (Probenschleife: 500  $\mu$ l). Aufgrund des höheren Probenvolumens und einer damit verbundenen höheren Matrixbelastung der stationären Phase wurde der Trennsäule eine 4 x 3 mm-Octadecylsilicalgelkartusche vorgeschaltet.

Als Laufmittel diente bei der Untersuchung der bovinen Gewebe Acetonitril/20 mM Tris-Acetat pH 7,2 38/62 (v/v) (Flussrate 1 ml/min, Säulentemperatur 25 °C) zur Trennung von Trenbolon-17 $\beta$ , Trenbolon-17 $\alpha$  und Trendion (mobile Phase A) und in einem Verhältnis von 42/58 (v/v) zur Fraktionierung der Östrogene und Testosteron sowie zur Erfassung von Zeranol (mobile Phase B). Bei der Analyse von Trenbolon wurden Fraktionen von 250  $\mu$ l, bei den übrigen 500  $\mu$ l-Fraktionen gesammelt. Das Solvens wurde in einer Evaporatorzentrifuge entfernt und der Rückstand in 40 % Methanol rückgelöst (150  $\mu$ l für Östrogene und Testosteron in Lende und für Zeranol, sonst 250  $\mu$ l).

Die Peaks wurden anhand ihrer Retentionszeit (Tabelle 5) in Verbindung mit ihrem UV-Spektrum (im Falle der internen Standards) bzw. ihrer spezifischen Reaktion im ELISA identifiziert. Die Quantifizierung der internen Standards erfolgte nach DAD wie in 3.3 beschrieben (Norgestrel:  $r^2 > 0.999$ ; Equilenin:  $r^2 > 0,998$ ; 16 $\alpha$ -Methylprogesteron:  $r^2 > 0,999$ ).

Bei der Untersuchung der Kaninchengewebe musste die etablierte Methode entsprechend der hohen Mengen an Trenbolonacetatmetaboliten modifiziert werden. Eine ausreichende Trennung von Trenbolon-17 $\beta$  und Trenbolon-17 $\alpha$  wurde nur durch eine Reduktion des Acetonitrilanteils im Laufmittel auf 36 % erreicht (mobile Phase C: Acetonitril/20 mM Tris-Acetat pH 7,2 36/64 (v/v)). Im Grenzbereich zwischen Trenbolon-17 $\beta$  und Trenbolon-17 $\alpha$  wurden 200  $\mu$ l-Fraktionen, im übrigen 500  $\mu$ l-Fraktionen gesammelt, die in 150  $\mu$ l (200  $\mu$ l bei maternaler Niere und Plazenta) 40 % Methanol zur Quantifizierung eingesetzt wurden. Aufgrund eines endogenen Störpeaks, der bei mobiler Phase A mit Equilenin eluierte, wurden Leber- und Nierenproben auch nach Zeranol-Behandlung mit mobiler Phase C chromatographiert.

Zum Nachweis von Melengestrolacetat diente ein nach Schiffer et al. (2001) entwickeltes System mit einer kürzeren RP18-Säule (NUCLEOSIL, 150 x 4,6 mm) und Methanol/20 mM Tris-Acetat pH 7,2 70/30 (v/v) als Eluens (mobile Phase D). Die Proben wurden in 250  $\mu$ l 20 mM Tris-Acetat pH 7,2/Methanol 60/40 (v/v) injiziert. Auch hier wurde eine Octadecylsilicagelkartusche vorgeschaltet. Fraktionierung erfolgte in 500  $\mu$ l-Schritten. Nach dem Evaporieren wurden die Proben in 200  $\mu$ l 40 % Methanol rückgelöst. Bei fötalem Fett und maternaler Leber waren es 300  $\mu$ l, bei maternalem Fett 500  $\mu$ l 40 % Methanol. Maternale Leber wurde anschließend noch 1 : 25 verdünnt. Dies war notwendig, um Störsignale zu unterdrücken. Bei der

Überprüfung der Methode mit artifiziell kontaminierten Proben wurden die Muskel-, Nieren- und Plazentafraktionen in 200 µl, die Leber- und Fettfraktionen in 300 µl 40 % Methanol aufgenommen.

Tabelle 5: Retentionszeiten HPLC/ELISA

Mobile Phase	Analyt	Retentionszeit [min]
Mobile Phase A <sup>1</sup>	Trenbolon-17β	12,0
	Trenbolon-17α	13,0
	Trendion	18,8
	Equilenin	22,1
Mobile Phase B <sup>2</sup>	Zeranol	12,3
	Östradiol-17β	12,3
	Testosteron	13,7
	Östradiol-17α	14,8
	Equilenin	15,5
	Östron	18,3
	Norgestrel	24,7
Mobile Phase C <sup>3</sup>	Trenbolon-17β	13,5
	Trenbolon-17α	15,0
	Zeranol	20,5
	Trendion	22,0
	Equilenin	27,0
Mobile Phase D <sup>4</sup>	Melengestrolacetat	12,6
	16α-Methylprogesteron	18,0

<sup>1</sup>Acetonitril/20 mM Tris-Acetat pH 7,2 38/62 (v/v);

<sup>2</sup>Acetonitril/20 mM Tris-Acetat pH 7,2 42/58 (v/v);

<sup>3</sup>Acetonitril/20 mM Tris-Acetat pH 7,2 36/64 (v/v);

<sup>4</sup>Methanol/20 mM Tris-Acetat pH 7,2 70/30 (v/v)

### 3.4.2 ELISA

Die ELISAs für Trenbolon, Testosteron, Gesamtöstrogene, Melengestrolacetat und Zeranol wurden wie in den einschlägigen Literaturstellen beschrieben durchgeführt (Meyer und Hoffmann, 1987; Blottner et al., 1996; Meyer et al., 1997; Hageleit et al., 2001; Lange et al., 2001).

Das Analyseprotokoll gestaltete sich wie folgt: Mit 1 µg Schaf-anti-Kaninchen-IgG/Loch beschichtete Mikrotiterplatten wurden bei 4 – 8 °C mit 100 µl Verdünnung des Meerrettichperoxidase(HRP)-markierten Antigens, 20 µl Probe und 100 µl

spezifischem Kaninchen-Antiserum über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Detektion mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat bei 450 nm. Die Kalibrierkurven und Proben wurden in 40 % Methanol vorbereitet. Der Arbeitsbereich (vgl. Tabelle 6) wurde zwischen 80 % und 20 % relativer Bindung festgelegt (maximale Bindung von markiertem Antigen am Antikörper: 100 %).

Bei der Analyse der bovinen Proben wurde bei Lende und Nierenfett mit Hilfe einer Kalibrierkurve aus Trenbolon-17 $\beta$ , bei Leber und Niere aus Trenbolon-17 $\alpha$  quantifiziert. Die Konzentrationen der übrigen zwei Metaboliten wurde über die Kreuzreaktion berechnet. Ausgehend von Trenbolon-17 $\beta$  lagen folgende Kreuzreaktivitäten vor: Trenbolon-17 $\alpha$  64%, Trendion 105 %; ausgehend von Trenbolon-17 $\alpha$ : Trenbolon-17 $\beta$  156 %, Trendion 164 %.

Die Rückstände in den Kaninchengeweben konnten aufgrund des geringeren Probenumfangs mit den jeweiligen spezifischen Kalibrierkurven bestimmt werden.

Tabelle 6: Arbeitsbereiche der ELISA-Kalibrierkurven (Mittelwerte über n Testansätze)

<b>Analyt</b>	<b>Arbeitsbereich [pg/ml]</b>
Melengestrolacetat (n = 25)	39 - 770
Östradiol-17 $\beta$ (n = 191)	19 - 500
Testosteron (n = 39)	26 - 1200
Trenbolon-17 $\alpha$ (Rind; n = 56)	13 - 210
Trenbolon-17 $\alpha$ (Kaninchen; n = 40)	8,9 - 130
Trenbolon-17 $\beta$ (Rind; n = 45)	8,8 - 110
Trenbolon-17 $\beta$ (Kaninchen; n = 50)	7,5 - 87
Trendion (n = 29)	5,8 - 82
Zeranol (Rind, n = 44)	37 - 2300
Zeranol (Kaninchen; n = 34)	17 - 1100

### **3.5 Standardisierung der Messungen**

Wie beschrieben wurde mit Ausnahme der Implantate, wo aufgrund der guten Wiederfindungsraten auf eine Standardisierung verzichtet werden konnte, zu jeder Probe vor der Extraktion interner Standard zugegeben: 1  $\mu$ g Equilenin/Probe für Trenbolon-17 $\beta$ , Östradiol-17 $\beta$ , Testosteron und Zeranol, 1  $\mu$ g 16 $\alpha$ -

Methylprogesteron/Probe für Progesteron sowie 1 µg Testosteronacetat/Probe für Trenbolonacetat, Testosteronpropionat und Östradiolbenzoat bei der HPLC-DAD-Quantifizierung.

Da die Trennung von Equilenin und Östradiol-17 $\alpha$  für die HPLC/ELISA-Quantifizierung nicht ausreichend war, wurde in diesem Fall Norgestrel als interner Standard gewählt. Hier wurden 600 ng Equilenin/Probe bei Trenbolon und Zeranol, 3 µg Norgestrel/Probe für die Östrogene und Testosteron sowie 3 µg 16 $\alpha$ -Methylprogesteron für Melengestrolacetat zugesetzt. In diesen Konzentrationen war eine Quantifizierung mittels HPLC-DAD möglich.

Für den Fall, dass die Validierungsergebnisse den Anforderungen der Kommissionsentscheidung über die Verfahren zum Nachweis der Rückstände von Stoffen mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung (Commission of the European Communities, 1993) entsprachen (vgl. 3.7.1), wurden die Hormongehalte durch interne Standardisierung korrigiert. Mit interner Standardisierung ist hier die Quantifizierung des Standardpeaks und die Korrektur der gemessenen Analytenkonzentration um die Wiederfindung des Standards gemeint. Wenn Genauigkeit und Präzision nicht durch interne Standardisierung verbessert werden konnten, wurde externe Standardisierung angewendet, d. h. die gemessene Hormonkonzentration wurde um die durchschnittliche Wiederfindung des Hormons in artifiziell kontaminierten Kontrollproben korrigiert.

### **3.6 Validierung der Methoden**

#### **3.6.1 HPLC-DAD – Implantate**

Seit 1993 gelten zur Validierung von Testmethoden zum Nachweis der Rückstände von Stoffen mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung EU-weit die Kriterien der Kommissionsentscheidung 93/256/EC (Commission of the European Communities, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden die Anforderungen für Bestätigungsmethoden als Maßgabe gewählt. Als wesentliche Kriterien sind demnach Spezifität, Genauigkeit, Präzision, Nachweisgrenze und Bestimmbarkeitsgrenze anzugeben.

Spezifität bedeutet, es müssen „eindeutige Informationen über die chemische Struktur des Analyten“ geliefert werden, welche die eindeutige Unterscheidung zwischen den untersuchten Verbindungen zulassen. Die Spezifität der HPLC-DAD

gründet sich auf die spezifischen HPLC-Retentionszeiten der einzelnen Substanzen in Verbindung mit ihren charakteristischen UV-Spektren.

Nach wiederholter Untersuchung von Referenzmaterial darf die Abweichung des mittleren experimentell bestimmten Gehaltes (nach Korrektur durch die Wiederfindungsrate) vom wahren Wert (Genauigkeit) für Konzentrationen größer 10 ng/g zwischen - 20 % und + 10 % liegen (Commission of the European Communities, 1993). Da weder Plazebopräparate als Referenzmaterial zur Verfügung standen noch die pharmazeutisch-technologischen Hilfsstoffe für eine Matrixsimulation bekannt waren, konnte keine Validierung im oben beschriebenen Sinn durchgeführt werden. Es wurden daher jeweils 3 Originalpräparate (vgl. Tabelle 1) einer Wirkstoffbestimmung unterzogen (Tabelle 7). Im Mittel stimmten die analysierten Gehalte mit den Herstellerangaben zwischen 84 und 104 % gut überein. In den Revalor-H<sup>®</sup>- und Finaplix-H<sup>®</sup>-Implantaten waren detektierbare Mengen an freigesetztem Trenbolon-17 $\beta$  enthalten (0,14 bzw. 0,20 % des Gehaltes an Trenbolonacetat).

Unter wiederholbaren Bedingungen sollte der Variationskoeffizient für Analytkonzentrationen von 1  $\mu$ g/g bei mehrfacher Analyse maximal zwischen 8,0 % und 11 % liegen (Commission of the European Communities, 1993). Diese Anforderungen konnten bei der Extraktion von Trenbolonacetat aus Finaplix-H<sup>®</sup> und Synovex Plus<sup>®</sup> sowie Testosteronpropionat aus Synovex-H<sup>®</sup> nicht erfüllt werden, was auf technisch-methodische Schwierigkeiten bei der Analyse, aber auch auf schwankende Wirkstoffgehalte von Seiten des Herstellers zurückgeführt werden könnte.

Die Bestimmbarkeitsgrenze, d. h. die niedrigste Konzentration für welche die Methode mit spezifizierter Genauigkeit und Präzision validiert worden ist, wurde in diesem Fall nicht angegeben, da keine artifiziell kontaminierten Proben analysiert wurden und die Rückstandsmengen in den Implantationspräparaten weit über der Sensitivität der Messmethode lagen.

Schwierigkeiten ergaben sich bei der Angabe der Nachweisgrenzen (NWG). Sie ist definiert als Summe aus dem Mittelwert zuzüglich der dreifachen Standardabweichung einer Blindprobenbestimmung von mindestens 20 repräsentativen Blindproben bzw. dem dreifachen des Rauschens zwischen zwei Peaks im Falle spektrometrischer Methoden (Commission of the European Communities, 1993). Da - wie bereits erwähnt - keine negativen Referenzproben

verfügbar waren und auch zwischen den Analytenpeaks der Originalpräparate kein Matrixrauschen messbar war, wurden die Substanzen als identifiziert angesehen, wenn sie nach Voreinstellung eines Rauschschwellenwertes von 0,5 Absorptionseinheiten vom Integrator erkannt wurden. 10 ng/Injektion (niedrigkonzentrierte Kalibrierlösung) waren in jedem Fall sicher detektierbar. Aufgrund ihrer relativ hohen Absorptionskoeffizienten konnten bei Trenbolonacetat und Trenbolon-17 $\beta$  noch Konzentrationen um 0,5 ng/Injektion eindeutig detektiert werden. Je nach eingesetzter Verdünnung ( $2 \times 10^{-4} - 10^{-5}$ ) ergibt sich bei der Analyse der Implantate eine Nachweisgrenze von 0,003 – 0,05 mg für Trenbolon-17 $\beta$  und Trenbolonacetat bzw. 0,05 – 1 mg für die übrigen Substanzen.

Tabelle 7: Bestimmung der Wirkstoffgehalte in den Originalpräparaten

Implantationspräparat	WDF <sup>1</sup>	WDF	Präzision	Präzision
	Hauptkomp. [%]	Nebenkomp. [%]	Hauptkomp. [%]	Nebenkomp. [%]
Revalor-H <sup>®</sup>	104	96	10	7,3
Finaplix-H <sup>®</sup>	94	-	21	-
Synovex-H <sup>®</sup>	95	94	12	11
Synovex Plus <sup>®</sup>	101	89	13	6,5
Implus S <sup>®</sup>	84	90	3,4	8,6
Component EC <sup>®</sup>	84	85	10	10
Compudose <sup>®</sup>	97	-	2,4	-
Ralgro <sup>®</sup>	89	-	5,7	-

<sup>1</sup>WDF: Wiederfindung

### 3.6.2 HPLC-DAD - Gewebe

Hier wurde die Genauigkeit der Methode als Wiederfindung von zu negativem Kontrollmaterial (Halsmuskulaturgewebe) zugesetzten Analyten berechnet. Dieses negative Kontrollmaterial wurde einem unbehandelten Tier der Versuchsgruppe (998) entnommen. Von jeder der Verbindungen wurden drei verschiedene Mengen zugefügt und die Extraktion jeweils als Fünffachansatz (Zeranol und Progesteron) bzw. Zehnfachansatz (alle übrigen) durchgeführt. Tabelle 8 zeigt die absolute

Wiederfindung (Spalte 3) jeder der acht Substanzen und die Wiederfindung nach Korrektur durch den jeweiligen internen Standard (Spalte 4).

Die Präzision wurde als Variationskoeffizient der Ergebnisse der Genauigkeitsmessungen berechnet (vgl. Tabelle 8, Spalte 5). Die Variationskoeffizienten (gemessen unter Wiederholbarkeitsbedingungen) sollen zwischen 8,0 % und 11 % für Analytkonzentrationen von 1 µg/g bzw. zwischen 12 % und 15 % für Konzentrationen von 100 ng/g liegen (Commission of the European Communities, 1993).

Tabelle 8: Genauigkeit und Präzision der Rückstandsanalytik von Implantationsstellen (HPLC-DAD)

<b>Analyt</b>	<b>Artifizielle Kontamination [ng/g]</b>	<b>Absolute WDF [%]</b>	<b>WDF nach Standard. [%]</b>	<b>Präzision nach Standard. [%]</b>
Trenbolon-17β	99/350/1400	63/59/57	103/93/92	3,2/2,0/3,5
Östradiol-17β	130/450/1800	61/67/67	101/107/107	7,5/2,4/1,9
Testosteron	110/380/1500	57/56/55	93/88/88	3,8/1,9/2,3
Zeranol	120/670/2600	74/71/69	108/103/104	8,1/3,6/0,25
Trenbolonacetat	890/2700/11000	66/63/63	104/102/99	4,1/4,8/1,8
Östradiolbenzoat	780/2300/9600	62/60/60	99/96/94	3,3/5,5/1,8
Testosteronpropionat	930/2800/11000	62/61/62	97/98/97	3,9/5,0/1,4
Progesteron	460/1600/4600	69/62/61	108/101/99	1,7/0,84/1,8

Die Wiederfindungen nach Korrektur lagen zwischen 88 % und 108% und die Variationskoeffizienten maximal bei 8,1 %. Equilenin, 16α-Methylprogesteron sowie Testosteronacetat eignen sich demnach zur internen Standardisierung der HPLC-DAD-Untersuchungen.

Die Bestimmbarkeitsgrenze kann Tabelle 8, Spalte 2 entnommen werden (niedrigster Wert).

Unter den gewählten Integrationsparametern war der Matrixhintergrund der negativen Referenzproben nicht erfassbar. Deshalb wurde im Einzelfall je nach dem Erscheinungsbild des Chromatogramms entschieden, ob Analyten eindeutig identifizierbar waren. Im Zweifelsfall wurden die entsprechenden UV-Spektren der Peaks mit denen der Referenzsubstanzen verglichen. Bei Trenbolon-17β und

Trenbolonacetat liegt die Nachweisgrenze demnach bei 4 g eingesetztem Gewebe etwa bei 2 ng/g, bei Östradiol-17 $\beta$ , Östradiolbenzoat, Testosteron und Testosteronpropionat bei 10 ng/g, bei Progesteron und Zeranol bei 20 ng/g.

### 3.6.3 HPLC/ELISA (bovines Gewebe)

Die Spezifität der Kopplung von HPLC mit anschließender ELISA-Detektion liegt in den unterschiedlichen Retentionszeiten der einzelnen Substanzen in Verbindung mit ihren spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen begründet.

Den Anforderungen von 93/256/EC (Commission of the European Communities, 1993) gemäß darf die Genauigkeit der Methode bei Konzentrationen von 1 ng bis 10 ng zwischen – 30 % und + 10 %, für Konzentration unter 1 ng/g zwischen – 50 % und + 20 % liegen. Auch in diesem Fall wurden die Genauigkeitsmessungen mit artifiziell kontaminiertem Material einer unbehandelten Färse aus der Versuchsgruppe (998) durchgeführt. Für jedes der vier Gewebe und jeden der vier Analyten wurden drei verschiedene Standardkonzentrationen zugefügt und die Extraktion jeweils als Dreifachansatz durchgeführt. Ausnahmen davon sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Für Analytkonzentrationen von 10 ng/g hat man typische Variationskoeffizienten von Messungen unter Wiederholbarkeitsbedingungen zwischen 16,0 % und 21,3 % bzw. zwischen 22,5 % und 30,0 % für Konzentrationen < 1 ng/g errechnet (Commission of the European Communities, 1993).

Tabelle 9 zeigt die absolute Wiederfindung (Spalte 5) und die Wiederfindung nach Korrektur durch den internen Standard (Spalte 6) und jeweils daneben die entsprechenden Variationskoeffizienten. Außer bei Trenbolon-17 $\alpha$  in Leber und Niere, Östradiol in Lende, Zeranol in Lende, Leber und Niere sowie Testosteron wurde intern standardisiert, da bei Trenbolon-17 $\alpha$  die Konzentrationen nach Standardisierung unter-, in den übrigen Fällen überschätzt worden wären.

Die Bestimmbarkeitsgrenzen sind jeweils die niedrigsten Werte in Tabelle 9, Spalte 4. Als Nachweisgrenzen wurden die Mittelwerte der Konzentrationen an freiem Antigen bei 80 % relativer Bindung über alle jeweiligen ELISA-Kalibrierkurven zuzüglich der dreifachen Standardabweichung angegeben (Tabelle 9, Spalte 3).

Tabelle 9: Validierungsdaten der Rückstandsanalytik von peripheren bovinen Geweben (HPLC/ELISA)

Analyt	Matrix	NWG [pg/g]	Artifizielle Kontamination [pg/g]	Absolute WDF [%]/ Präzision <sup>1</sup> [%]	WDF nach Standard. [%]/ Präzision <sup>2</sup> [%]
Trenbolon-17β	Lende <sup>2</sup>	1,0	90/170/350	70/12	116/12
Trenbolon-17α	Leber <sup>1</sup>	5,9	1100 <sup>3</sup> /2100 <sup>3</sup> /5000 <sup>4</sup>	35/34	58/31
Trenbolon-17α	Niere <sup>1</sup>	6,1	450 <sup>4</sup> /860 <sup>3</sup> /1400 <sup>4</sup>	43/28	68/37
Trenbolon-17β	Fett <sup>2</sup>	1,7	260/500/1400	57/15	118/11
Zeranol	Lende <sup>1</sup>	2,7	10/27/61	96/12	152/14
Zeranol	Leber <sup>1</sup>	9,8	410 <sup>4</sup> /1500 <sup>4</sup> /5100 <sup>4</sup>	81/20	156/29
Zeranol	Niere <sup>1</sup>	10	510 <sup>3</sup> /910 <sup>4</sup> /1500 <sup>4</sup>	71/12	189/40
Zeranol	Fett <sup>2</sup>	4,7	61/300/1000	57/20	106/21
Östradiol-17β	Lende <sup>1</sup>	1,3	2,5 <sup>6</sup> /7,5/20	85/9.9	122/14
Östradiol-17β	Leber <sup>2</sup>	8,3	150/500/2000	44/24	96/12
Östradiol-17β	Niere <sup>2</sup>	8,1	150/500/2000	56/18	89/11
Östradiol-17β	Fett <sup>2</sup>	4,2	10 <sup>6</sup> /50/250	49/20	89/16
Testosteron	Lende <sup>1</sup>	1,7	27/48/82	75/13	141/13
Testosteron	Leber <sup>1</sup>	12	110/250/600	64/12	143/20
Testosteron	Niere <sup>1</sup>	13	110/250/600	75/18	122/25
Testosteron	Fett <sup>1</sup>	5,5	55/120/300	70/23	126/20

<sup>1</sup>externe Standardisierung; <sup>2</sup>interne Standardisierung; <sup>3</sup>Vierfachansatz;  
<sup>4</sup>Fünffachansatz; <sup>6</sup>Doppelansatz

### 3.6.4 HPLC/ELISA (Kaninchengewebe)

Um die Anwendbarkeit des bereits validierten HPLC/ELISA-Analysenverfahrens auf Kaninchengewebe zu überprüfen, wurde bei einem ortsansässigen Metzger ein frisches, handelsübliches Kaninchen ungarischer Herkunft erworben. Gewebeproben (Muskel, Leber, Niere, Fett) wurden wie die der Muttertiere zur Analyse vorbereitet, artifiziell kontaminiert und analysiert. Plazentagewebe wurde aus einem Pool der vier unbehandelten Föten gewonnen. Hier musste zur Validierung der Probenumfang mangels Materials reduziert werden (vgl. Tabelle 10).

Um Unterschiede bei der Extrahierbarkeit zu erkennen, wurden hier Zusätze aller drei Trenbolonmetaboliten untersucht. Tabelle 10 zeigt die Resultate der Analysen.

Tabelle 10: Qualitätsparameter der Rückstandsmessungen der Kaninchengewebe (HPLC/ELISA)

Analyt	Matrix	NWG [pg/g]	Artifizielle Kontamination [pg/g]	Absolute WDF [%]/ Präzis. <sup>1</sup> [%]	WDF nach Stand. [%]/ Präzis. <sup>2</sup> [%]
Trenbolon-17β	Muskel <sup>2</sup>	1,7	30/60/120	52/15	82/16
Trenbolon-17α		1,8	9/15/30	71/13	112/15
Trendion		0,76	9/15/30	71/4,1	111/2,0
Trenbolon-17β	Leber <sup>2</sup>	3,8	150/300/600	28/9,1	54/11
Trenbolon-17α		2,8	1500/3000/6000	41/8,5	81/3,8
Trendion		2,6	12/24/48	25/15	49/21
Trenbolon-17β	Niere <sup>2</sup>	1,3	30/60/120	35/24	65/26
Trenbolon-17α		4,2	150/300/600	35/11	64/12
Trendion		5,3	24/48/96	37/27	76/14
Trenbolon-17β	Fett <sup>2</sup>	1,8	100/200/400	53/1,1	108/4,3
Trenbolon-17α		1,9	10/20/40	58/6,2	117/7,1
Trendion		3,1	50/100/200	50/11	102/10
Trenbolon-17β	Plazenta <sup>1</sup>	0,56	1500/6000	34/1,3	122/14
Trenbolon-17α		1,1	1500/6000	39/3,8	139/8,8
Trendion		1,4	75/300	39/8,9	138/21
Zeranol	Muskel <sup>2</sup>	1,1	3,4/6,8/14	44/3,9	67/24
	Leber <sup>1</sup>	11	720/1400/2900	61/18	137/19
	Niere <sup>1</sup>	6,1	360/720/1400	58/20	157/18
	Fett <sup>1</sup>	1,3	25/50/100	84/23	146/29
	Plazenta <sup>1</sup>	1,5	120	58/-	232/-
MGA	Muskel <sup>2</sup>	4,6	750/1500/3000	68/7,4	111/16
	Leber <sup>2</sup>	40	600/1200/2400	79/8,1	83/13
	Niere <sup>1</sup>	32	3000/6000/12000	92/4,2	135/4,3
	Fett <sup>2</sup>	7,2	200/400/800	58/5,7	98/4,9
	Plazenta <sup>2</sup>	9,0	1250/5000	111/21	121/11

<sup>1</sup>externe Standardisierung; <sup>2</sup>interne Standardisierung

Wie sich herausstellte, genügten Genauigkeit und Präzision der internen Standardisierung der Trenbolonbestimmung nur bei Plazenta nicht den Anforderungen von 93/256/EC (Commission of the European Communities, 1993), während bei Zeranol außer bei Muskelgewebe extern standardisiert werden musste, obwohl durch externe Standardisierung auch bei Leber und Niere die Anforderungen nicht erfüllt werden konnten. Interne Standardisierung hätte zu einer Überschätzung der Werte geführt (Tabelle 10, Spalte 6). Die Effizienz der Aufarbeitung von Melengestrolacetat war außer bei Niere vergleichbar mit der von 16α-

Methylprogesteron. Die Verbindung eignet sich daher gut als interner Standard. Obwohl bei Plazenta die erlaubte Abweichung der Wiederfindung um einen Prozentpunkt überschritten wurde, wurden die Messwerte durch interne Standardisierung korrigiert, da dieses Verfahren präziser ist.

In jedem Testansatz wurden negative und positive Proben eingesetzt. Daher konnten die Nachweisgrenzen – für jeden Testansatz separat – aus den „Blindprobenbestimmungen“ als Summe des Mittelwertes der relativen Bindungen und seiner dreifachen Standardabweichung berechnet werden (Tabelle 10, Spalte 3).

### **3.7 Qualitätssicherung**

Um eine einwandfreie Durchführung der Analysen zu gewährleisten, wurden die folgenden Schritte durchgeführt: Vor jeder HPLC-Serie wurde die Sauberkeit der HPLC-Anlage mittels eines Maschinenleerwertes (reines Auftragsmittel) überprüft. Um die Reinheit der Reagenzien und der Lösungsmittel sicherzustellen, wurde bei jeder Extraktionsserie ein Reagenzienleerwert mitgeführt. Jede analytische Serie umfasste negative Kontrollproben, die analysiert wurden, um Kontaminationen auszuschließen und eventuellen Störsignale zu identifizieren. Um die Extraktion und die Quantifizierung zu kontrollieren, wurden in jeder Serie artifiziell kontaminierte negative Kontrollproben untersucht.

### **3.8 GC-MS-Bestätigungsanalysen von peripherem bovinem Gewebe**

Zur Bestätigung der Ergebnisse der HPLC/ELISA-Messungen wurden gewachsene Proben aus Studie 2 (je Präparat - Finaplix-H<sup>®</sup>, Synovex-H<sup>®</sup> und Ralgro<sup>®</sup> - die Nieren- und Nierenfettprobe, bei Finaplix-H<sup>®</sup> auch die Leberprobe, mit dem höchsten Gehalt) ausgewählt und diese nach etablierten GC-MS-Verfahren (Daeseleire et al., 1991; Casademont et al., 1996; Meyer et al., 2001) analysiert. Für die Gehalte in Muskelgewebe war keine ausreichende Sensitivität der Methode zu erwarten.

Als interne Standards wurden vor der Extraktion je Probe 10 ng Testosteron-d<sub>3</sub> für Trenbolon-17β, -17α, Trendion und Testosteron, Östradiol-d<sub>3</sub> für Östradiol-17β, Östradiol-17α und Östron und α/β-Zearalanol-d<sub>4</sub> für Zeranol zugegeben. Zur besseren Reinigung der Extrakte war neben der üblichen Aufarbeitung (vgl. 3.2)

Entfetten mit Hexan sowie eine immunoaffinitätschromatographische Reinigung der Leber- und Nierenproben notwendig.

Die Extraktion erfolgte in Abweichung von 3.2.3 und 3.2.4 nur einmal mit je 10 ml tert. Butylmethylether über Nacht. Die Leber- und Nierenextrakte wurden nach dem Evaporieren des Ethers in 0,5 ml 80 % Methanol aufgenommen und durch Überschichten mit 2 ml Hexan entfettet (Leber zweimal, Niere einmal). Vor der Immunoaffinitätschromatographie (IAC) wurden der Leberextrakt wie in 3.2.3 an Octadecylfestphasen gereinigt. Das Eluat sowie die entfetteten Nierenextrakte wurden nach Herstelleranweisung an den Affinitätssäulchen chromatographiert und schließlich mit 70 % Methanol eluiert. Die Fettproben wurden nach dem Evaporieren des Ethers in 2 ml Methanol aufgenommen, bei – 60 °C eingefroren und die Überstände nach Verdünnen mit 0,4 ml Reinstwasser zweimal mit 3 ml Hexan entfettet. Hier war vor der Derivatisierung eine Reinigung über RP18-Festphasen ausreichend.

Die bis hierhin gewonnenen Extrakte wurden vollständig zur Trockene eingeeengt und zur Analyse auf Trenbolon, Testosteron und Östradiol mit 20 µl Heptafluorbuttersäureanhydrid in 50 µl Aceton bei 60 °C für 1 h umgesetzt. Die auf Zeranol zu untersuchenden Proben wurden mit 20 µl N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid 30 min bei 60 °C umgesetzt. Das Aceton wurde im Stickstoffstrom entfernt und die Umsetzungsprodukte in 16 µl (Fett) bzw. 20 µl Oktan (Leber und Niere) rückgelöst. Davon wurden 4 µl splitlos injiziert (Injektortemperatur: 250 °C, Ofenanfangstemperatur: 100 °C/1 min, Temperaturgradient: 16 °C/min, Endtemperatur: 300 °C/4 min; Elektronenstoßionisation, Selected Ion Monitoring). Nach Kalibrierung mit Standardlösungen sechs unterschiedlicher Konzentrationen wurde quantifiziert. Die Peakidentifikation erfolgte über die spezifischen Retentionszeiten sowie bei Trenbolon-17 $\alpha$ -17 $\beta$ , Östradiol-17 $\alpha$ -17 $\beta$  und Zeranol über vier, bei den übrigen über ein diagnostisches Ion (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: GC-MS: Retentionszeiten und diagnostische Ionen zur Substanzidentifizierung

<b>Analyt</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>	<b>Diagnostische Ionen (m/z)</b>
Östradiol-d <sub>3</sub>	12,37	667
Testosteron-d <sub>3</sub>	12,01	683
Östradiol-17 $\alpha$	10,89	356, 409, 451, 664
Östradiol-17 $\beta$	12,42	356, 409, 451, 664
Östron	12,81	466
Testosteron	12,04	680
Trenbolon-17 $\alpha$	10,81	340, 431, 447, 660
Trenbolon-17 $\beta$	11,83	340, 431, 447, 660
Trendion	11,88	462
Zeranol	11,70	307, 433, 523, 538

Tabelle 12: Ergebnisse der GC-MS-Bestätigungsanalysen (Studie 2)

<b>Tier #</b>	<b>Gewebe</b>	<b>Analyt</b>	<b>Gehalt [pg/g]</b>	
			<b>HPLC/ELISA</b>	<b>GC-MS</b>
345	Leber	Trenbolon-17 $\beta$	2400	n. n. <sup>1</sup>
		Trenbolon-17 $\alpha$	34000	11000
		Trendion	160	n. n.
376	Niere	Trenbolon-17 $\beta$	360	n. n.
		Trenbolon-17 $\alpha$	1400	n. n.
		Trendion	47	n. n.
376	Nierenfett	Trenbolon-17 $\beta$	2500	2200
		Trenbolon-17 $\alpha$	200	220
		Trendion	1000	n. n.
369	Niere	Östradiol-17 $\beta$	230	470
		Östradiol-17 $\alpha$	2300	190
		Östron	220	n. n.
		Testosteron	630	420
369	Nierenfett	Östradiol-17 $\beta$	210	210
		Östradiol-17 $\alpha$	< 4,9	7
		Östron	82	n. n.
		Testosteron	630	700
384	Niere	Zeranol	3000	1200
384	Nierenfett	Zeranol	290	350

<sup>1</sup>n. n.: nicht nachweisbar

Die Identität der Analyten konnte dort bestätigt werden, wo die Sensitivität der Methode ausreichte (Tabelle 12). Insbesondere bei Leber und Niere war die Empfindlichkeit der GC-MS jedoch trotz der immunoaffinitätschromatographischen Reinigung der Extrakte aufgrund des nicht unerheblichen Matrixhintergrundrauschens eingeschränkt. Der gegenüber dem HPLC/ELISA-Verfahren zusätzliche IAC-Schritt hatte vermutlich u. a. auch die quantitativen Abweichungen zwischen GC-MS und HPLC/ELISA bei Leber und Niere zur Folge. Die Analyse der Nierenfettproben hingegen zeigte gute Übereinstimmung. Dort lag die Abweichung der Trenbolon- und Östradiolgehalte bei etwa 10 %, die der Zeranolgehalte bei 20 %.

### **3.9 Materialien**

#### **3.9.1 Geräte**

Homogenisiersystem	
Antrieb	Miccra D-8, ART moderne Labortechnik, Müllheim, D
Schaftrohr und Welle	S-20 bzw. S 8 mit W 20 bzw. W 8, ART moderne Labortechnik, Müllheim, D
Stator	30 G, 20 G oder 20 F, ART moderne Labortechnik, Müllheim, D
Schneidemesserrotor	SmR 30 oder SmR 20, ART moderne Labortechnik, Müllheim, D
Evaporatorzentrifuge	Univapo 100 H, Uni Equip, Martinsried, D
Aspirator mit Kältebad	Unijet II, Uni Equip, Martinsried, D
HPLC-Anlage	
Probengeber	LC-507e, Beckman Instruments, München, D
Pumpe	LC-125, Beckman Instruments, München, D
Diodenarraydetektor	LC-168, Beckman Instruments, München, D
Säulenofen	Jetstream Plus, Beckman Instruments, München, D
Fraktionensammler	FRAC-100, Pharmacia, Uppsala, S
Photometer	Spectra Image, Tecan, Crailsheim, D
GC-Anlage	GC 8000, Carlo Erba, Rodano, I
MS-Anlage	Platform II, Fisons/Micromass, Altrincham, GB

### 3.9.2 Verbrauchsmaterialien

RP18-Festphasen	Bakerbond SPE C <sub>18</sub> , J. T. Baker Inc., Phillipsburg, USA
Trenbolon/19-Nortestosteron-IAC-Säulen	Coring System Diagnostix, Gernsheim, D
Zeranol-IAC-Säulen	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München, D
HPLC-Säulen	PRONTOSIL 120-5-C18 H 5,0 µm, NC-04 (250 x 4.0 mm), Bischoff, Leonberg, D EC 150/4,6 NUCLEOSIL 100-5 C18, Macherey-Nagel, Düren, D
Kartuschensystem	SecurityGuard™- Kit, Phenomenex, Torrance, USA C18-Kartuschen, 4 x 3.0 mm, Phenomenex, Torrance, USA
GC-Säule	DB-5, 0,25 mm x 15 m, 25 µm Filmdicke, J & W Scientific, Folsom, USA
Mikrotiterplatten	Nunc-Immuno™ MaxiSorp™, Nunc, Roskilde, DK
Sterilfilter	Steritop™ 0,22 µm, Millipore, Bedford, USA

### 3.9.3 Chemikalien und Pufferlösungen

Die Chemikalien hatten, soweit möglich, mindestens p. A.-Qualität.

Standardsubstanzen:

Equilenin	Steraloids, Newport, USA
Melengestrolacetat, 16α-Methylprogesteron	ICN, Costa Mesa, USA
Norgestrel, Nortestosteron, Östradiol-17α, Östradiol-17β, Östradiolbenzoat, Östron, Progesteron, Testosteron, Testosteronacetat, Testosteronpropionat, Trenbolon-17β, Trenbolonacetat, α-Zearalanol, β-Zearalanol, Zeralanon, α-Zearalenol, β-Zearalenol, Zearalenon	Sigma, Deisenhofen, D
Trenbolon-17α, Trendion	Roussel-Uclaf, Paris, F
Östradiol-17β-d <sub>3</sub> , Testosteron-d <sub>3</sub> , α/β-Zearalanol-d <sub>4</sub>	RIVM Bilthoven, NL

Enzym-markierte Antigene und Antikörper (hauseigen):

Trenbolon	Trenbolon-17β-glucuronid-HRP Antiserum T 2 Pool 3 vom 27.11.1979
Testosteron	Testosteron-3-carboxymethyloxim-HRP Antiserum T 11α Pool 5 vom 10.08.1976
Gesamtöstrogene	Östradiol-17β-17-hemisuccinat-HRP Antiserum E 2/3 Pool 1
Melengestrolacetat	MGA-3-carboxymethyloxim-HRP Antiserum 1764 I 11

Zeranol	Zeranol-16-carboxybutylether-HRP Antiserum Kaninchen 3/0993
Lösungsmittel und Trägergas:	
Aceton getrocknet	Merck 1.00299
Acetonitril für HPLC	Baker 9017, Merck 1.00030, Riedel-de-Haën 34851
Helium 5.0	Linde
Methanol	Baker 8045, Fluka 65543
Methanol für HPLC	Baker 8402
Oktan	Merck 806910
Petroleumbenzin (40 – 60 °C)	Baker 8115
Reinstwasser (L = 18,2 MΩcm):	
Reinwasser:	
Osmoseanlage	Wasserwerk HP100 (1989)
Reinstwassersystem	Milli-Q-PLUS, Millipore, Bedford, USA
Tert. Butylmethylether	Baker 9042, Fluka 20256, Riedel-de-Haën 33020, Merck 1.01995 oder 1.01849
Übrige Reagenzien:	
β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus <i>Helix pomatia</i>	Merck 1.04114
Heptafluorbuttersäureanhydrid	Sigma H-1006
N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid	Sigma M-7891
Pufferlösungen:	
0,5 M Acetatpuffer pH 4,8	
68 g/l Natriumacetat-Trihydrat	Merck 1.06267
pH 4,8 einstellen mit Eisessig	Merck 1.00063
67 mM Phosphatpuffer pH 7,2	
2,72 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck 1.04873
8,37 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck 1.06580
20 mM Tris-Acetat pH 7,2	
2,42 g/l Tris(hydroxymethyl)aminomethan	
pH 7,2 einstellen mit Eisessig	
steril filtrieren	
20 mM Tris-HCl pH 8,5 mit 20 % Methanol	
100 ml 200 mM Tris-HCl-Stammlösung pH 8,5	
24,2 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma T-1503
pH 8,5 einstellen mit 5 M HCl	Merck 1.09911
700 ml Reinstwasser	
200 ml Methanol	

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Rückstände in den Implantaten (Studien 1, 2 und 3)

#### 4.1.1 Revalor-H<sup>®</sup>, Finaplix-H<sup>®</sup>, Synovex Plus<sup>®</sup>, Synovex-H<sup>®</sup>, Compudose<sup>®</sup>, Component EC<sup>®</sup>, Implus S<sup>®</sup> und Ralgro<sup>®</sup> (Studie 1)

Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die Rückstände, die in Studie 1 in den herauspräparierten Pellets gemessen wurden. In der Basisstudie 1.1 (Revalor-H<sup>®</sup> 8 Wochen nach Applikation in den Halsmuskel) waren das im Mittel 42 mg Trenbolonacetat, 4,7 mg Östradiol-17 $\beta$  und 0,074 mg Trenbolon-17 $\beta$ . Das entspricht rund 30 % der applizierten Dosis. Ein Revalor-H<sup>®</sup>-Implantat besteht ursprünglich aus sieben Einzelpellets mit je 20 mg Trenbolonacetat und 2 mg Östradiol. Bezieht man die Anzahl der wiedergefundenen Pellets in die Berechnungen ein, findet man noch fast 40 % der ursprünglich enthaltenen Wirkstoffmenge.

In der Ohrmuschel (981), die einzig als Implantationsort zugelassen ist, waren hingegen noch 55 % der ursprünglich verabreichten Dosis detektierbar. Die Rückstände in den übrigen Revalor-H<sup>®</sup>-Pellets (Versuch 1.2, 1.4, 1.5) zeigen mit durchschnittlich 41 mg Trenbolonacetat, 4,4 mg Östradiol-17 $\beta$  und 0,055 mg Trenbolon-17 $\beta$  keine bemerkenswerten Abweichungen von denen des Basisversuchs. Ausreißer nach oben (991) oder unten (810) werden nivelliert, wenn man berücksichtigt, wie viele Pellets wieder gefunden worden waren. Ausnahmen bilden allein die 4-Wochen-Behandlung (978) und eine der Proben nach Dreifachapplikation (901-2). Insgesamt gesehen wurden in den Revalor-H<sup>®</sup>-Implantaten (Versuch 1.2, 1.4, 1.5) 35 % der ursprünglich enthaltenen Hormone bzw. 25 % der applizierten Dosis gemessen.

Unterschiedliche Präparationen (1.3) beeinflussen die Rückstandssituation. So sticht das Silicongummiimplantat Compudose<sup>®</sup> mit noch 58 % des Ausgangsgehaltes an Östradiol-17 $\beta$  nach 8-wöchigem Einsatz hervor, während im Synovex Plus<sup>®</sup>-Präparat (Verbleib 6 %) fast der gesamte Wirkstoffinhalt freigesetzt worden war. Auch bei Finaplix-H<sup>®</sup> war mit 19 % unterdurchschnittlich wenig Trenbolonacetat in den Pellets verblieben.

Tabelle 13: Rückstände in den herauspräparierten Implantaten - Studie 1

Studie	Tier#	Präparat	Anzahl Pellets gefunden/original	Hauptk. [mg]	Hauptk. hydrolysiert [mg]	Nebenk. [mg]	Nebenk. hydrolysiert [mg]
1.1	804	Revalor-H <sup>®</sup>	0/7	-	-	-	-
	992		6/7	38	0,069	4,5	-
	801		7/7	57	0,12	6,1	-
	811		5/7	40	0,055	4,0	-
	988		5/7	34	0,050	4,0	-
1.2	981	Revalor-H <sup>®</sup>	7/7	74	0,085	7,9	-
	980		6/7	29	0,081	3,2	-
	999		7/7	48	0,053	5,3	-
	977		6/7	43	0,043	4,4	-
	993		0/7	-	-	-	-
	995		6/7	32	0,072	3,0	-
	991		7/7	57	0,070	6,5	-
	990		7/7	54	0,086	6,5	-
	810		3/7	20	0,026	2,0	-
	986		6/7	48	0,060	5,3	-
	805		0/7	-	-	-	-
	984		7/7	47	0,050	5,3	-
	1.3	996	Finaplix-H <sup>®</sup>	9/10	33	0,050	-
000		Synovex Plus <sup>®</sup>	3/8	4,8	0,010	0,68	< 0,05
975		Synovex-H <sup>®</sup>	4/8	31	< 0,20	3,3	< 0,20
994		Compudose <sup>®</sup>	1/1	15	-	-	-
982		Component EC <sup>®</sup>	4/4	33	-	3,8	< 0,30
985		Implus S <sup>®</sup>	8/8	53	-	7,1	< 0,30
983		Ralgro <sup>®</sup>	0/3	-	-	-	-
1.4	809	Revalor-H <sup>®</sup>	0/7	-	-	-	-
	978		5/7	59	0,064	6,1	-
	901		7/7	42	0,045	4,6	-
			3/7	10	0,010	1,0	-
			0/7	-	-	-	-
1.5	010	Revalor-H <sup>®</sup>	0/7	-	-	-	-
	922		6/7	37	0,050	3,9	-
	521		7/7	46	0,065	4,7	-

#### 4.1.2 Finaplix-H<sup>®</sup>, Ralgro<sup>®</sup> und Synovex-H<sup>®</sup> (Studie 2)

Bei der Analyse der Implantate nach Mehrfachdosierung ergaben sich annähernde, aber nicht stringente Dosisbeziehungen (Tabelle 14). So war nach fünffacher Dosis etwa die sechs- bis siebenfach höhere Menge als nach einfacher detektierbar.

Im Mittel waren in den Finaplix-H<sup>®</sup>-Präparaten noch 23 %, in den Synovex-H<sup>®</sup>-Präparaten 41 % und bei Ralgro<sup>®</sup> 17 % der applizierten Wirkstoffmenge nachweisbar. Während bei Finaplix-H<sup>®</sup> Trenbolon-17 $\beta$  0,3 % des gesamten Rückstandes ausmachte, konnten bei Synovex-H<sup>®</sup> nur die Muttersubstanzen nachgewiesen werden.

Tabelle 14: Rückstände in den Implantaten nach Mehrfachdosierung - Studie 2 (Mittelwerte: n = 2 bei 1-facher und 3-facher, n = 4 bei 5-facher Dosis)

Präparat	Dosis	Hauptkomp. [mg]	Hauptkomp. hydrol. [mg]	Nebenkomp. [mg]	Nebenkomp. hydrol. [mg]
Finaplix-H <sup>®</sup>	1-fach <sup>1</sup>	45	0,12	-	-
	3-fach	71	0,18	-	-
	5-fach	300	0,97	-	-
Synovex-H <sup>®</sup>	1-fach	66	< 0,3	6,2	< 0,3
	3-fach	280	< 1,4	26	< 1,4
	5-fach	460	< 2,3	42	< 2,3
Ralgro <sup>®</sup>	1-fach	5,7	-	-	-
	3-fach	16	-	-	-
	5-fach	35	-	-	-

<sup>1</sup>n = 1, da Verlust der zweiten Probe bei der Aufarbeitung

#### 4.1.3 Synovex-H<sup>®</sup> und Synovex Plus<sup>®</sup> (Studie 3)

Bei den Ebern waren nach 35 Tagen Behandlung mit Synovex-H<sup>®</sup> im Mittel noch 170 mg Testosteronpropionat und 18 mg Östradiolbenzoat in den herauspräparierten Pellets enthalten. Das sind etwa rund 45 % der applizierten Dosis. Hydrolysiert konnten die Wirkstoffkomponenten nicht nachgewiesen werden (Testosteron und Östradiol-17 $\beta$  < 0,8 mg).

In Synovex Plus<sup>®</sup> waren die Wirkstoffe wesentlich stärker abgebaut als in Synovex-H<sup>®</sup>. In den vier Proben wurden durchschnittlich 63 mg Trenbolonacetat (16 % der applizierten Dosis) und 9,4 mg Östradiolbenzoat (17 %) gemessen (Trenbolon-17 $\beta$  < 0,02 mg, Östradiol-17 $\beta$  < 0,4 mg).

Bei den Kälbern wurden nach Synovex-H<sup>®</sup>-Applikation 120 mg Testosteronpropionat (60 % der applizierten Dosis) und 11 mg Östradiolbenzoat (55 %) detektiert (Testosteron und Östradiol-17 $\beta$  < 0,6 mg). Das ist fast das Doppelte gegenüber den analog behandelten Färsen.

Auch in den Synovex Plus<sup>®</sup>-Implantaten waren nach 8 Wochen mit 120 mg Trenbolonacetat und 17 mg Östradiolbenzoat noch etwa 60 % der applizierten Wirkstoffe enthalten. Darüber hinaus wurden 0,11 mg frei vorliegendes Trenbolon-17 $\beta$  gemessen (Östradiol-17 $\beta$  < 0,4 mg).

## **4.2 Rückstände in Implantationsstellen (Studien 1, 2 und 3)**

### **4.2.1 Revalor-H<sup>®</sup>, Finaplix-H<sup>®</sup>, Synovex Plus<sup>®</sup>, Synovex-H<sup>®</sup>, Compudose<sup>®</sup>, Component EC<sup>®</sup>, Implus S<sup>®</sup> und Ralgro<sup>®</sup> (Studie 1)**

Abbildung 3 und 4 (Studie 1.1, 1.2, 1.4 und 1.5) sowie Tabelle 15 (1.3) zeigen eine Übersicht über die in den Implantationsinnen- bzw. -außenbereichen ermittelten Hormonrückstände. Um den weiten Bereich von zum Teil mehr als vier Zehnerpotenzen darstellen zu können, wurde eine logarithmische Skalierung gewählt. In den direkt an die Implantate angrenzenden Geweben wurden nach Gabe von Revalor-H<sup>®</sup>  $10^{-4}$  – 10 mg Trenbolonacetat,  $10^{-3}$  – 10 mg Östradiol-17 $\beta$  und  $10^{-4}$  – 1 mg Trenbolon-17 $\beta$  festgestellt. In den Außenbereichen waren es  $10^{-4}$  bis 0,1 mg Trenbolonacetat,  $10^{-2}$  bis 0,1 mg Östradiol-17 $\beta$  und  $10^{-4}$  bis  $10^{-2}$  mg Trenbolon-17 $\beta$ . In den korrespondierenden Bereichen nahmen die Rückstände nach außen hin um das 2- bis  $10^5$ -fache ab, in einer Probe (809) sogar zu. Dabei war der Abfall bei Trenbolonacetat um ein Vielfaches stärker als bei Östradiol-17 $\beta$  und Trenbolon-17 $\beta$ . In den Innenbereichen lagen im Mittel nur 35 % des gesamten Trenbolons frei vor, während es in den Außenbereichen 65 % waren. Im Muskelgewebe überproportional niedrig waren die Anteile von etwa 10 % in den Innenbereichen 801, 811 und 901-1 und – abgesehen von 809 (s. u.) - mit 27 % in den binde- und fettgewebereichen Außenbereichen von Ohrmuschel (981), Ohrgrund c (977), Haut (991) und Wamme

(986). Relativ hohe Anteile an Trenbolon-17 $\beta$  (63 – 83 %) im Innenbereich waren in den Muskeln 992, 988, 810 und 521 messbar.

Die hohe Variationsbreite ist unter anderem durch die Präparation zu erklären. Die Schwierigkeit lag darin, die ursprünglichen Implantationsstellen am Schlachtkörper zu lokalisieren und die im Gewebe verbliebenen Pellets ohne Kontamination der Umgebung herauszupräparieren. So sind relativ hohe Werte (z. B. Außenbereich 809, 996) vermutlich auf in der Probe verbliebene Pelletbruchstücke zurückzuführen. In den Proben hingegen, die direkt um die sieben mutmaßlichen, nicht mehr ermittelbaren Injektionsstellen herum genommen worden waren (804, 805, 993, 809, 010), waren Rückstände am unteren Ende der Skala zu finden bzw. nicht mehr nachweisbar. Bei Trenbolonacetat und Trenbolon-17 $\beta$  waren die Konzentrationen unter 0,5 bis 1 ng/g, während bei Östradiol-17 $\beta$  bis zu ca. 25 ng/g eindeutig identifiziert werden konnten.

Die Größenordnung der Rückstände der übrigen sieben Implantationspräparate (1.3) bewegte sich, so weit sie detektierbar waren, zwischen 1 und 1000  $\mu$ g (Tabelle 15). Hervorzuheben ist, dass sich der relativ hohe Wirkstoffabbau im Synovex Plus<sup>®</sup>-Implantat auch in geringen Geweberückständen widerspiegelte. Im Innenbereich lagen zudem mehr als 80 % Trenbolon frei vor. Aus Östradiolbenzoat freigesetztes Östradiol-17 $\beta$  konnte hingegen weder innen noch außen nachgewiesen werden. Nach Gabe von Synovex-H<sup>®</sup> waren neben den Produktkomponenten im Innenbereich 15 % freigesetztes Testosteron und Östradiol-17 $\beta$  quantifizierbar, im Außenbereich sogar 25 % Testosteron.

Tabelle 15: Rückstände im Gewebe nach Applikation unterschiedlicher Implantationspräparate in den Halsmuskel (Studie 1.3)

Präparat	Hauptkomp.	Hauptkomp.	Nebenkomp.	Nebenkomp.
	[ $\mu$ g] innen/außen	hydrol. [ $\mu$ g] innen/außen	[ $\mu$ g] innen/außen	hydrol. [ $\mu$ g] innen/außen
Finaplix-H <sup>®</sup>	38/680	18/220	-	-
Synovex Plus <sup>®</sup>	0,67/1,5	3,4/0,95	4,5/2,8	< 0,04/< 0,04
Synovex-H <sup>®</sup>	250/11	50/3,6	110/5,6	17/< 0,04
Compudose <sup>®</sup>	< 0,04/< 0,04	-	-	-
Component EC <sup>®</sup>	200/< 0,08	-	170/< 0,04	15/< 0,04
Implus S <sup>®</sup>	930/< 0,08	-	270/< 0,04	32/< 0,04
Ralgro <sup>®</sup>	< 0,08/< 0,08	-	-	-

Abbildung 3: Rückstände im Gewebe nach Applikation von Revalor-H® (Studie 1) – Implantationsinnenbereich

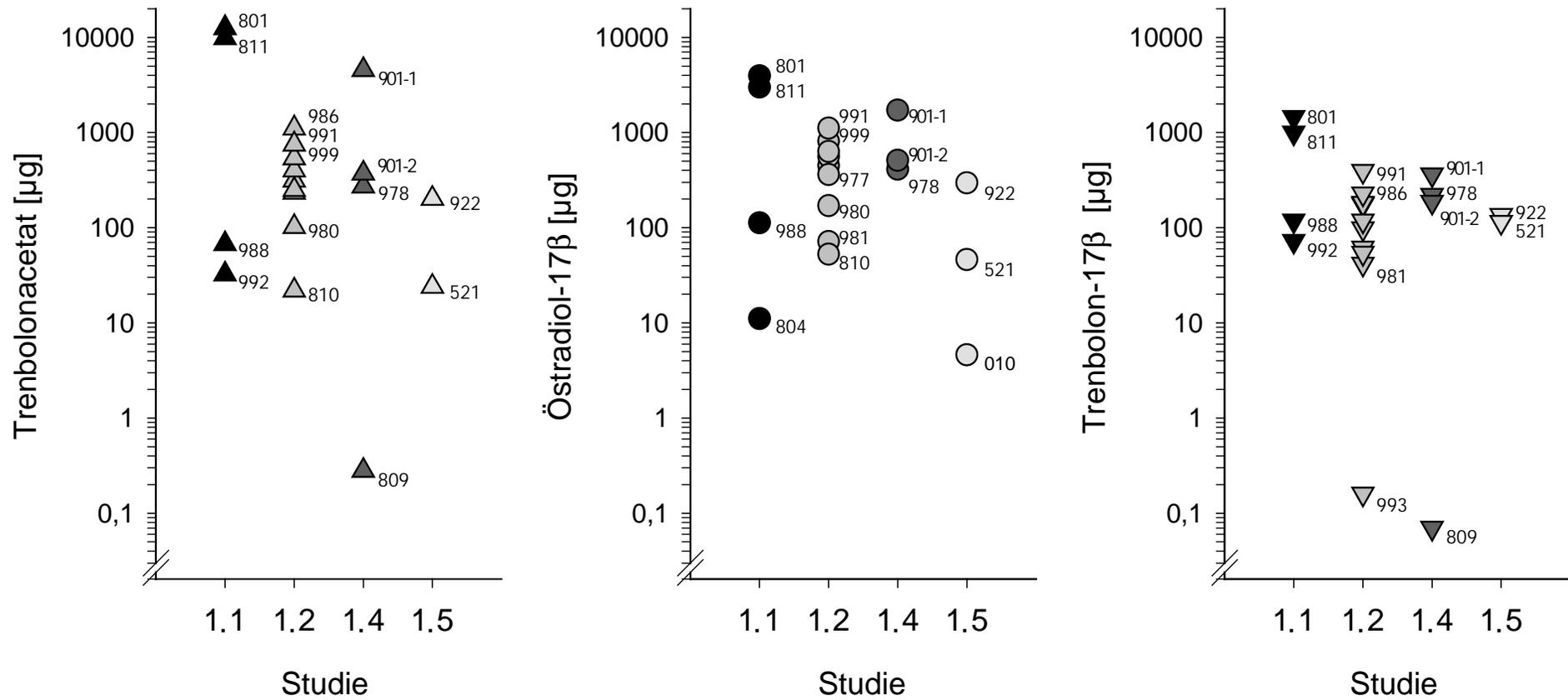
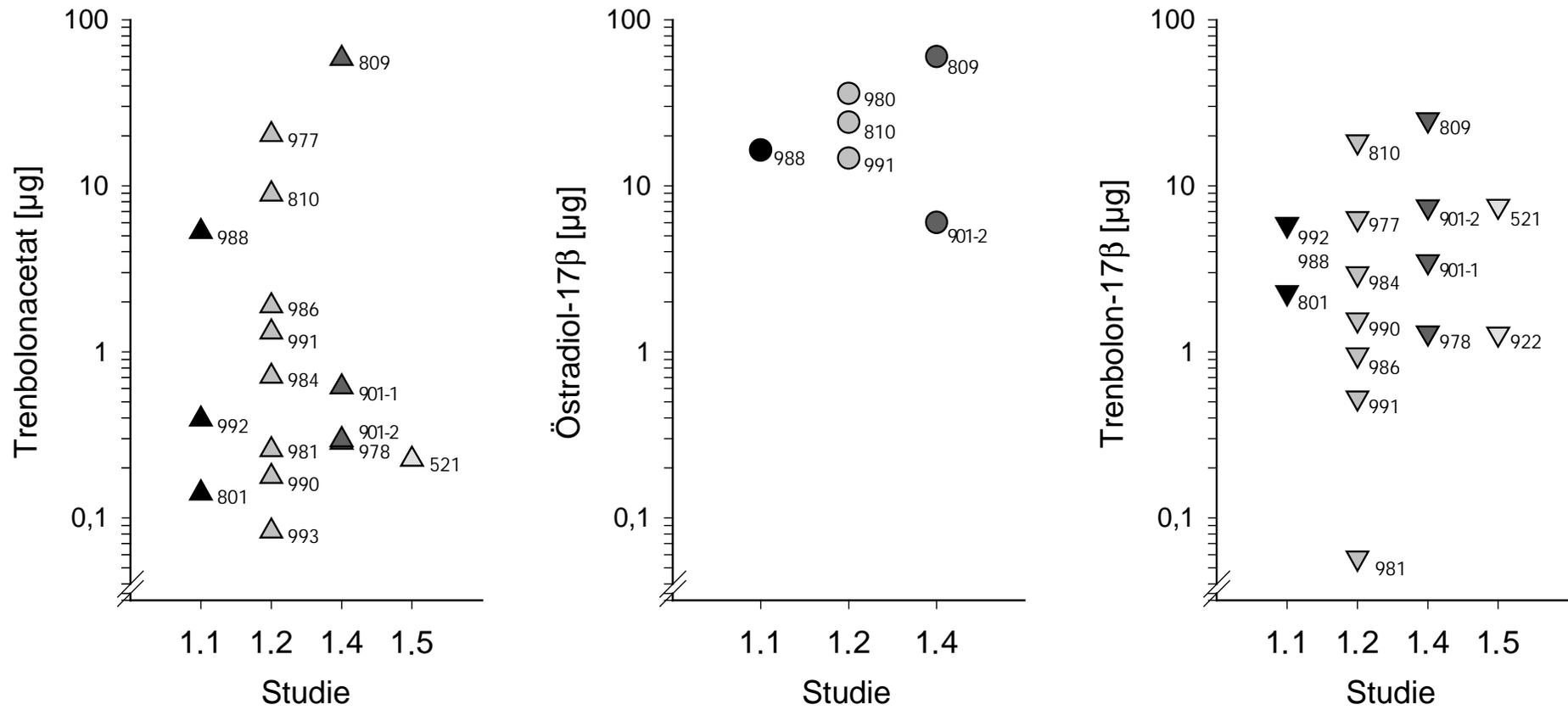


Abbildung 4: Rückstände im Gewebe nach Applikation von Revalor-H® (Studie 1) – Implantationsaußenbereich



#### 4.2.2 Finaplix-H<sup>®</sup>, Ralgro<sup>®</sup> und Synovex-H<sup>®</sup> (Studie 2)

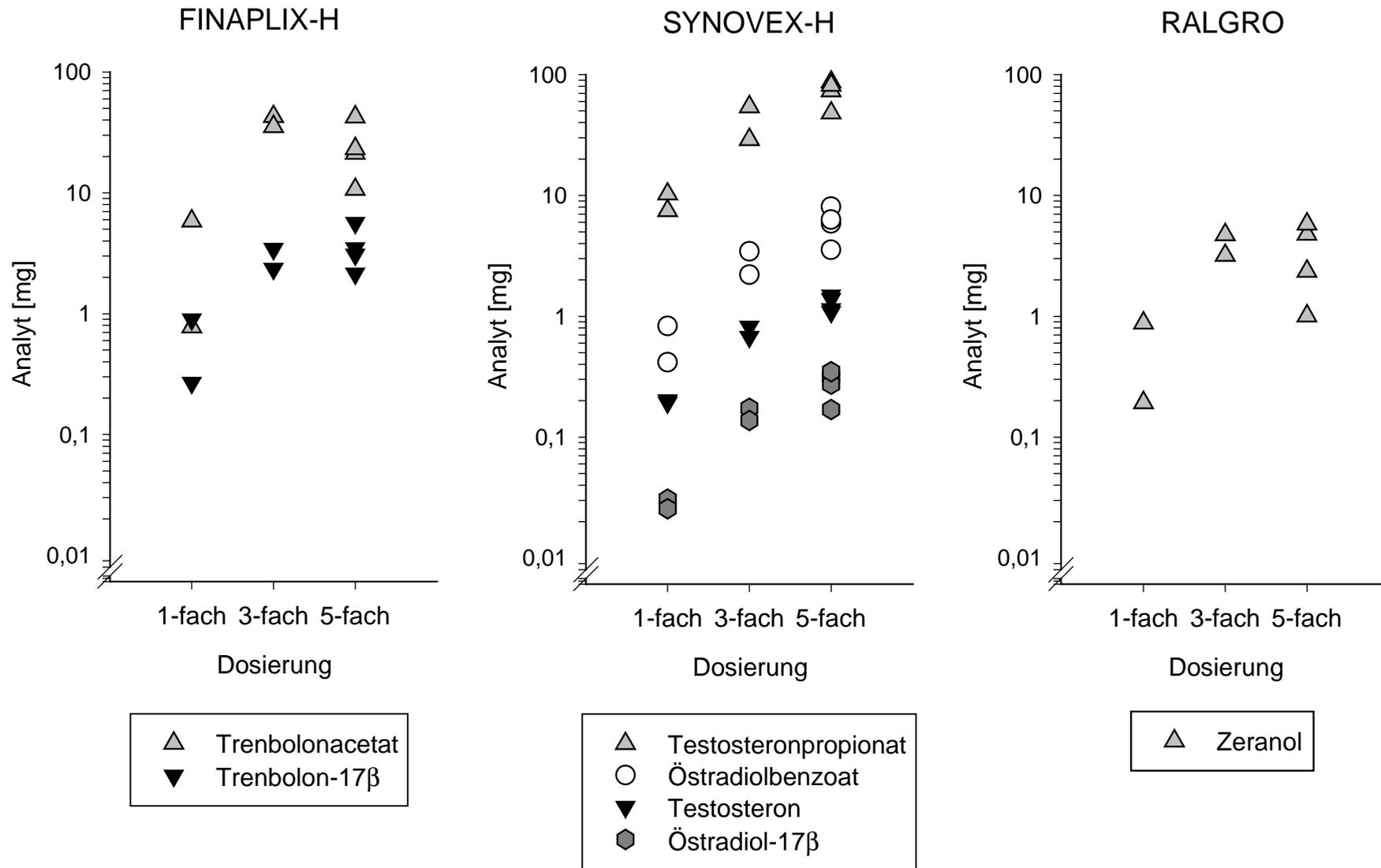
Die Rückstandssituation in den Ohren gestaltet sich grundsätzlich anders als im Halsmuskelgewebe (Abbildung 5). Die Gehalte sind nach einfacher Dosierung um ein Vielfaches höher. Zur Dreifachdosis hin steigen sie an, zur fünffachen flachen bzw. fallen sie ab, zeigen also keine vollständige Dosisabhängigkeit.

Nach fünffacher Dosis von Finaplix-H<sup>®</sup> waren maximal 43 mg Trenbolonacetat messbar. Der Anteil an freiem Trenbolon-17 $\beta$  lag bei 6 bis 26 %, maximal bei 5,6 mg. Im Ohrgrund wurden im Höchstfall 0,24  $\mu$ g Trenbolon-17 $\beta$  analysiert. Das bedeutet, dass Trenbolonacetat nicht mehr in nachweisbarer Menge als Muttersubstanz in den Ohrgrund gelangte und die Trenbolon-17 $\beta$ -Konzentrationen um mindestens das 10<sup>4</sup>-fache abfielen.

Bei Synovex-H<sup>®</sup> wurden 87 mg Testosteronpropionat, 1,4 mg Testosteron, 8,1 mg Östradiolbenzoat und 0,35 mg Östradiol-17 $\beta$  im Höchstfall nach Fünffachdosierung im Ohr detektiert. Im Mittel lagen in der Ohrmuschel 1,9 % Testosteronpropionat und 4,8 % Östradiolbenzoat frei vor, im Ohrgrund 10 % bzw. 29 %. Im Gegensatz zu Finaplix-H<sup>®</sup> waren höhere Konzentrationen in der Ohrmuschel nicht mit höheren Konzentrationen im entsprechenden Ohrgrund korreliert. Nach Maximaldosis konnten noch 59  $\mu$ g Testosteronpropionat und 21  $\mu$ g Testosteron gemessen werden, d. h. die Abreicherung um durchschnittlich den Faktor 4000 bei Testosteronpropionat und 200 bei Testosteron war hier nicht so ausgeprägt wie bei Finaplix-H<sup>®</sup>.

Nach Ralgro<sup>®</sup>-Implantation war in den Ohrmuscheln ein Höchstwert an Zeranol von 5,8 mg zu finden. Im Außenbereich waren die Rückstände soweit reduziert, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze von 0,08  $\mu$ g lagen.

Abbildung 5: Rückstände im Ohr nach Mehrfachdosierung (Studie 2) – Implantationsinnenbereich



### 4.2.3 Synovex-H<sup>®</sup> und Synovex Plus<sup>®</sup> (Studie 3)

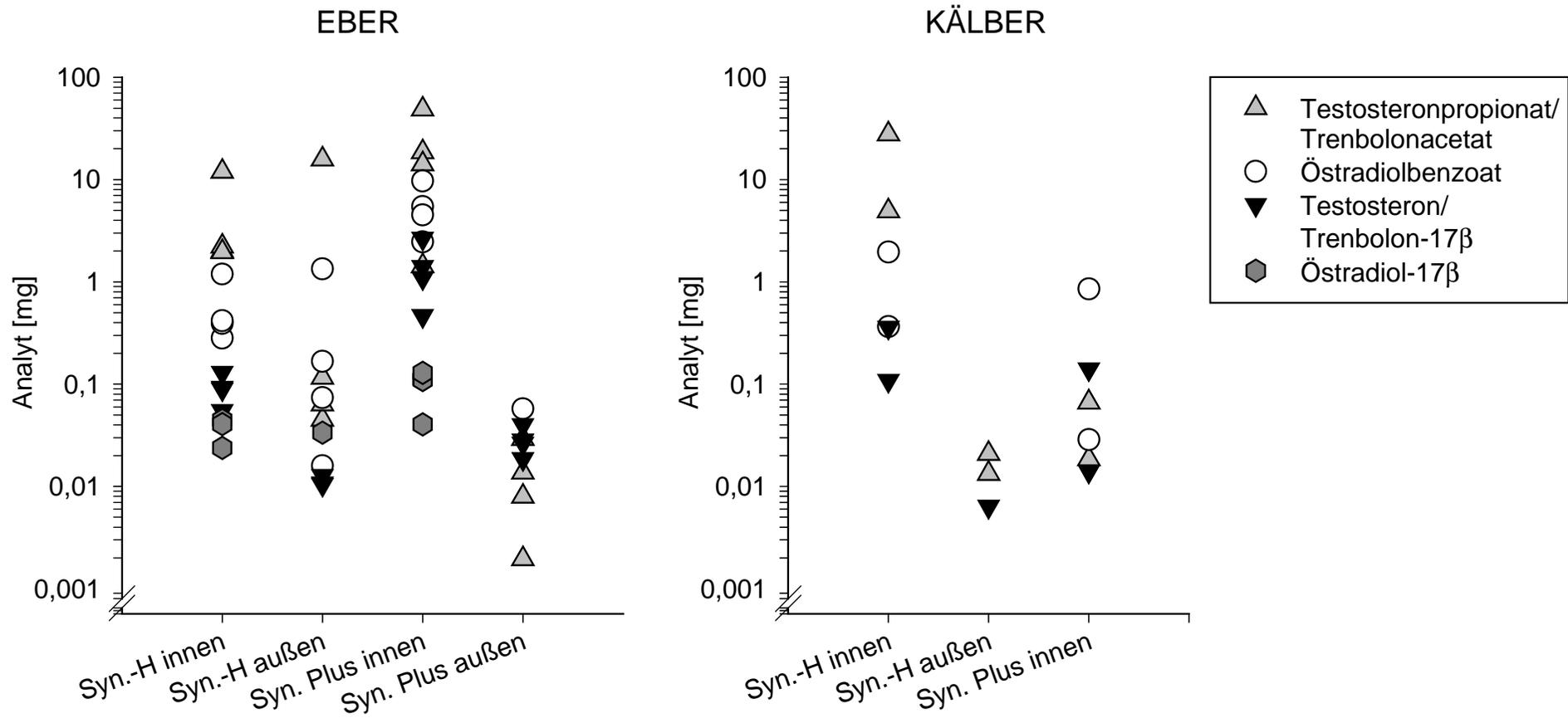
Die Rückstände im Halsmuskel der Eber erreichten nach Synovex-H<sup>®</sup>-Gabe im Innenbereich durchschnittlich 4,6 mg Testosteronpropionat, 0,092 mg Testosteron, 0,57 mg Östradiolbenzoat und 0,032 mg Östradiol-17 $\beta$  (Abbildung 6). Im Mittel lag der Anteil an freiem Testosteron bei 3,4 %, der an freiem Östradiol-17 $\beta$  bei 6,2 %. Die höheren Werte lagen vermutlich an gewanderten, nicht-identifizierten Pellets. Im übrigen ist vom Innen- zum Außenbereich hin eine Abnahme der Rückstände um rund das 15-fache festzustellen.

Synovex Plus<sup>®</sup> führte im Innenbereich zu höheren, im Außenbereich zu niedrigeren Rückständen als Synovex-H<sup>®</sup>. Die Östradiolbenzoatgehalte waren im Gewebe direkt um die Einstichstelle im Mittel siebenmal höher als nach Synovex-H<sup>®</sup>-Gabe, obwohl nur 40 % mehr Östradiolbenzoat im Präparat enthalten sind. Im Außenbereich hingegen war Östradiolbenzoat nur noch in einer Probe nachweisbar. Dort lagen die Rückstände um das 10- bis 10<sup>4</sup>-fache unter denen der Innenbereiche. Herauszustellen ist dabei der Anstieg freien Trenbolons vom Innen- zum Außenbereich von 7,5 % auf 47 %.

Bei den Kälbern (Abbildung 7), denen die Implantate im Gegensatz zu den Ebern ins Ohr gesetzt worden waren, gab es nach Synovex-H<sup>®</sup>-Applikation wesentlich höhere Rückstände als nach Synovex Plus<sup>®</sup>-Gabe. Die Synovex-H<sup>®</sup>-Proben enthielten in der Ohrmuschel einmal teilweise mehr als das Doppelte, einmal etwas weniger als die der Färsen mit gleicher Behandlung. Die Relationen der Komponenten waren untereinander und im Vergleich zu den Färsen ähnlich. Der Ohrgrund wies noch etwa 0,1 % Testosteronpropionat und in einer Probe 6 % Testosteron im Verhältnis zu den Ohrmuscheln auf.

Die Synovex Plus<sup>®</sup>-Kälber enthielten in den Ohren etwa gleich viel Trenbolonacetat und hydrolysierte Komponente, aber stark unterschiedliche Konzentrationen an Östradiolbenzoat. Im Ohrgrund war nur noch in einer Probe 0,04  $\mu$ g Trenbolonacetat detektierbar.

Abbildung 6: Rückstände im Gewebe bei Ebern und Kälbern (Studie 3) – Implantationsinnen-/außenbereich



### **4.3 Rückstände in peripheren Geweben nach Mehrfachdosierung von Finaplix-H<sup>®</sup>, Ralgro<sup>®</sup> und Synovex-H<sup>®</sup> (Studie 2)**

Nach Mehrfachdosierung der Präparate Finaplix-H<sup>®</sup>, Ralgro<sup>®</sup> und Synovex-H<sup>®</sup> konnten in Abhängigkeit von der Dosis ansteigende Hormongehalte in den peripheren Geweben gemessen werden (Tabellen 16 - 19). Ausnahme bildeten die Testosteronkonzentrationen in Leber, die nach der Behandlung mit Synovex-H<sup>®</sup> nicht dosisabhängig anstiegen (Tabelle 18).

Nach Applikation von Trenbolonacetat waren die drei Metaboliten Trenbolon-17 $\beta$ , Trenbolon-17 $\alpha$  und Trendion in den verschiedenen Geweben detektierbar (Tabelle 16). Nach achtwöchiger Behandlung mit 2000 mg Trenbolonacetat (10-fache Dosis) wurden Maximalwerte von 0,32 ng Trenbolon-17 $\beta$ /g Lende, 34 ng Trenbolon-17 $\alpha$ /g Leber, 1,4 ng Trenbolon-17 $\alpha$ /g Niere und 2,5 ng Trenbolon-17 $\beta$ /g Nierenfett nachgewiesen. Das Hauptabbauprodukt in Lende und Fett war Trenbolon-17 $\beta$ , während Trenbolon-17 $\alpha$  in Leber und Niere dominierte. In Leber lagen im Mittel mehr als 90 % Trenbolon-17 $\alpha$  vor, in Niere nur 70 %, demgegenüber in Muskel 90 % Trenbolon-17 $\beta$ . Im Nierenfett verteilten sich die Abbauprodukte wie folgt: 70 % Trenbolon-17 $\beta$ , 5 % Trenbolon-17 $\alpha$  und 25 % Trendion (Tabelle 20).

Die Konzentrationen an Zeranol nach Ralgro<sup>®</sup>-Behandlung erreichten maximal 0,057 ng/g Lende, 8,1 ng/g Leber, 3,0 ng/g Niere und 0,29 ng/g Nierenfett nach zehnfacher Dosierung (360 mg Zeranol).

Die Konzentrationen an Östradiol-17 $\beta$ , Östradiol-17 $\alpha$ , Östron und Testosteron nach Gabe von Synovex-H<sup>®</sup> sind in Tabelle 18 und 19 aufgeführt. Bereits nach einfacher Behandlung zeigen sich in Leber und Niere deutliche Anstiege der Östrogengehalte. In Nierenfett wurden Östradiol-17 $\beta$  und Testosteron akkumuliert. Dagegen war selbst nach zehnfacher Dosierung in Leber kein Anstieg der Testosterongehalte messbar. Maximal wurden folgende Konzentrationen ermittelt: 0,020 ng Östradiol-17 $\beta$  bzw. 0,10 ng Testosteron/g Lende, 2,2 ng Östradiol-17 $\alpha$  bzw. 0,060 ng Testosteron/g Leber, 2,3 ng Östradiol-17 $\alpha$  bzw. 0,63 ng Testosteron/g Niere und 0,21 ng Östradiol-17 $\beta$  bzw. 0,63 ng Testosteron/g Fett. Das Metabolitenmuster von Östradiol nach Behandlung mit Synovex-H<sup>®</sup> ist in Tabelle 20 dargestellt. Östradiol-17 $\beta$  stellte den Hauptanteil in Muskel und Fett dar, während in Leber und Niere 80 % oder mehr als Östradiol-17 $\alpha$  vorlagen.

Tabelle 16: Rückstände nach Gabe von Finaplix-H® (Studie 2)

Tier #	Dosis	Lende			Leber (innerer Bereich)			Niere			Nierenfett		
		TbOH-17 $\beta$ <sup>1</sup> [pg/g]	TbOH-17 $\alpha$ <sup>2</sup> [pg/g]	TbO <sup>3</sup> [pg/g]	TbOH-17 $\beta$ [pg/g]	TbOH-17 $\alpha$ [pg/g]	TbO [pg/g]	TbOH-17 $\beta$ [pg/g]	TbOH-17 $\alpha$ [pg/g]	TbO [pg/g]	TbOH-17 $\beta$ [pg/g]	TbOH-17 $\alpha$ [pg/g]	TbO [pg/g]
329	-	< 1,0	< 1,6	< 1,0	< 3,8	< 5,9	< 3,6	< 3,9	< 6,1	< 3,7	< 1,7	< 2,7	< 1,6
358	-	< 1,0	< 1,6	< 1,0	< 3,8	< 5,9	< 3,6	< 3,9	< 6,1	< 3,7	< 1,7	< 2,7	< 1,6
374	1-fach	110	< 1,6	3,8	420	5100	22	49	350	< 3,7	170	16	120
341	1-fach	76	< 1,6	< 1,0	340	4900	17	86	360	< 3,7	390	28	110
343	3-fach	200	10	6,5	1100	11000	83	260	250	17	1300	71	130
391	3-fach	120	5,4	9,0	240	7100	23	120	420	< 3,7	360	23	130
345	10-fach	230	15	17	2400	34000	160	490	740	78	2300	210	900
376	10-fach	320	22	9,2	1500	27000	110	360	1400	47	2500	200	1000

<sup>1</sup>TbOH-17 $\beta$ : Trenbolon-17 $\beta$ ; <sup>2</sup>TbOH-17 $\alpha$ : Trenbolon-17 $\alpha$ ; <sup>3</sup>TbO: Trendion

Tabelle 17: Rückstände nach Behandlung mit Ralgro® (Studie 2)

Tier #	Dosis	Lende	Leber (innerer Bereich)	Niere	Nierenfett
		Zeranol [pg/g]	Zeranol [pg/g]	Zeranol [pg/g]	Zeranol [pg/g]
306	-	< 2,7	70	12	< 4,7
323	-	< 2,7	60	< 10	< 4,7
359	1-fach	6,2	320	280	44
379	1-fach	7,9	680	200	33
393	3-fach	19	1200	490	33
366	3-fach	29	1700	620	69
310	10-fach	57	3800	1900	67
384	10-fach	25	8100	3000	290

Tabelle 18: Testosterongehalte nach Applikation von Synovex-H® (Studie 2)

Tier #	Dosis	Lende	Leber (innerer Bereich)	Niere	Nierenfett
		Testosteron [pg/g]	Testosteron [pg/g]	Testosteron [pg/g]	Testosteron [pg/g]
352	-	4,4	34	250	14
392	-	14	31	200	< 5,5
332	1-fach	17	26	290	89
344	1-fach	3,9	23	490	80
356	3-fach	16	25	530	310
371	3-fach	13	23	370	250
369	10-fach	100	63	630	630
309	10-fach	37	38	470	590

Tabelle 19: Östrogengehalte nach Synovex-H®-Behandlung (Studie 2)

Tier #	Dosis	Lende			Leber (innerer Bereich)			Niere			Nierenfett		
		E2-17 $\beta$ <sup>1</sup> [pg/g]	E2-17 $\alpha$ <sup>2</sup> [pg/g]	E1 <sup>3</sup> [pg/g]	E2-17 $\beta$ [pg/g]	E2-17 $\alpha$ [pg/g]	E1 [pg/g]	E2-17 $\beta$ [pg/g]	E2-17 $\alpha$ [pg/g]	E1 [pg/g]	E2-17 $\beta$ [pg/g]	E2-17 $\alpha$ [pg/g]	E1 [pg/g]
352	-	3,9	4,4	< 1,1	12	96	< 6,7	< 8,1	67	< 6,6	< 4,2	< 4,9	< 3,4
392	-	3,3	< 1,5	< 1,1	< 8,3	28	< 6,7	28	37	8,8	< 4,2	< 4,9	< 3,4
332	1-fach	3,5	< 1,5	< 1,1	23	150	19	110	270	91	18	< 4,9	5,4
344	1-fach	1,7	< 1,5	< 1,1	37	350	27	31	230	9,2	25	< 4,9	8,3
356	3-fach	4,4	< 1,5	< 1,1	55	570	34	78	430	36	67	< 4,9	18
371	3-fach	4,2	< 1,5	< 1,1	56	360	30	140	410	44	65	< 4,9	9,1
369	10-fach	20	< 1,5	< 1,1	160	2200	170	230	2300	220	210	< 4,9	82
309	10-fach	16	< 1,5	< 1,1	120	930	70	100	930	92	180	< 4,9	44

<sup>1</sup>E2-17 $\beta$ : Östradiol-17 $\beta$ ; <sup>2</sup>E2-17 $\alpha$ : Östradiol-17 $\alpha$ ; <sup>3</sup>E1: Östron

Tabelle 20: Metabolitenmuster von Trenbolon und Östrogenen nach Gabe von Finaplix-H® und Synovex-H®

Analyt [%]	Lende	Leber (innerer Bereich)	Niere	Nierenfett
TbOH-17 $\beta$	92	6,2	27	69
TbOH-17 $\alpha$	4,5	93	70	5
Trendion	3,9	0,4	2,8	26
Östradiol-17 $\beta$	91	8,5	12	77
Östradiol-17 $\alpha$	8,3	85	79	0,6
Östron	1,2	6,3	8,6	23

#### ***4.4 Rückstände in peripheren Geweben bei Kälbern (Studie 3)***

Die Hormongehalte der Kälber variierten individuell sehr stark. Die Konzentrationen an Östradiol und Testosteron lagen zumeist unter denen der Färsen mit vergleichbarer Behandlung (Tabellen 21 – 23).

Nach Applikation von Synovex Plus<sup>®</sup> zeigten die Testosterongehalte eine abnehmende Tendenz gegenüber denen der unbehandelten Tiere. Die Trenbolonrückstände lagen außer bei einer Nierenprobe unterhalb derer nach Finaplix-H<sup>®</sup>-Behandlung. Die Verteilung der Trenbolonmetaboliten in Lende, Leber und Niere ist denen der Färsen vergleichbar. In Nierenfett allerdings überwog Trenbolon mit 50 % bei nur 40 % Trenbolon-17 $\beta$ .

Tabelle 21: Östrogengehalte nach Applikation von Synovex-H® (Syn.-H) bzw. Synovex Plus® (Syn. Plus) (Studie 3, Kälber)

Tier #	Dosis	Lende			Leber (innerer Bereich)			Niere			Nierenfett		
		E2-17β [pg/g]	E2-17α [pg/g]	E1 [pg/g]	E2-17β [pg/g]	E2-17α [pg/g]	E1 [pg/g]	E2-17β [pg/g]	E2-17α [pg/g]	E1 [pg/g]	E2-17β [pg/g]	E2-17α [pg/g]	E1 [pg/g]
951	-	< 1,3	< 1,5	< 1,1	< 8,3	25	< 6,7	< 8,1	12	< 6,6	5,0	< 4,9	< 3,4
955	-	< 1,3	< 1,5	< 1,1	< 8,3	41	< 6,7	< 8,1	62	< 6,6	< 4,2	< 4,9	< 3,4
964	1-fach Syn.-H	7,5	< 1,5	< 1,1	19	180	8,1	68	890	42	47	< 4,9	5,7
965	1-fach Syn.-H	1,3	4,4	< 1,1	< 8,3	24	< 6,7	< 8,1	120	< 6,6	< 4,2	< 4,9	< 3,4
968	1-fach Syn. Plus	4,1	1,0	< 1,1	9,9	120	< 6,7	23	200	8,6	27	< 4,9	6,3
969	1-fach Syn. Plus	< 1,3	2,7	< 1,1	< 8,3	35	< 6,7	42	80	34	< 4,2	< 4,9	< 3,4

Tabelle 22: Testosterongehalte nach Behandlung mit Synovex-H® bzw. Synovex Plus® (Studie 3, Kälber)

Tier #	Dosis	Lende	Leber (innerer Bereich)	Niere	Nierenfett
		Testosteron [pg/g]	Testosteron [pg/g]	Testosteron [pg/g]	Testosteron [pg/g]
951	-	< 1,7	20	160	7,7
955	-	< 1,7	14	140	< 5,5
964	1-fach Syn.-H	11	21	67	130
965	1-fach Syn.-H	1,9	25	160	13
968	1-fach Syn. Plus	2,0	14	88	< 5,5
969	1-fach Syn. Plus	< 1,7	15	140	< 5,5

Tabelle 23: Trenbolonrückstände nach Gabe von Synovex Plus® (Studie 3, Kälber)

Tier #	Dosis	Lende			Leber (innerer Bereich)			Niere			Nierenfett		
		TbOH-17β <sup>1</sup> [pg/g]	TbOH-17α <sup>2</sup> [pg/g]	TbO <sup>3</sup> [pg/g]	TbOH-17β [pg/g]	TbOH-17α [pg/g]	TbO [pg/g]	TbOH-17β [pg/g]	TbOH-17α [pg/g]	TbO [pg/g]	TbOH-17β [pg/g]	TbOH-17α [pg/g]	TbO [pg/g]
951	-	< 1,0	< 1,6	< 1,0	< 3,8	< 5,9	< 3,6	< 3,9	< 6,1	< 3,7	< 1,7	< 2,7	< 1,6
955	-	< 1,0	< 1,6	< 1,0	< 3,8	< 5,9	< 3,6	< 3,9	< 6,1	< 3,7	< 1,7	< 2,7	< 1,6
968	1-fach	23	< 1,6	1,9	310	1900	9,1	73	680	< 3,7	200	23	200
969	1-fach	< 1,0	< 1,6	< 1,0	27	220	< 3,6	< 3,9	82	< 3,7	15	8	24

Tabelle 24: Rückstände in den Kaninchengeweben nach Trenbolonacetat-Behandlung

Tier #	Muskel			Leber			Niere			Fett			Plazenta		
	TbOH-17β [pg/g]	TbOH-17α [pg/g]	TbO [pg/g]												
K <sup>1</sup> 795	< 0,85	< 1,3	< 0,94	< 6,3	< 9,1	< 4,2	< 7,6	< 11	< 4,7	< 1,2	< 1,5	< 0,64	-	-	-
K831	< 0,48	< 1,2	< 0,32	< 7,4	< 11	< 1,9	< 7,9	< 15	< 7,2	< 2,9	< 3,8	< 0,86	-	-	-
781	8200	2800	220	390	12000	57	5900	160000	1000	40000	22000	2500	-	-	-
841	8100	2500	170	370	8700	79	4800	48000	500	26000	12000	1700	-	-	-
K795-M <sup>2</sup>	< 4,9	< 15	< 4,7	< 2,4	< 6,4	< 2,5	< 11	< 4,6	< 7,9	< 22	< 6,9	< 2,1	< 0,44	< 3,3	< 2,4
K795-W <sup>3</sup>	< 4,7	< 8,2	< 5,9	< 3,7	< 5,7	< 2,3	< 5,5	< 17	< 7,4	< 6,8	< 10	< 4,0	< 1,4	< 2,5	< 1,1
K831-M	< 6,3	< 20	< 6,1	< 2,4	< 7,1	< 2,6	< 11	< 4,2	< 8,0	< 29	< 9,1	< 2,7	< 0,35	< 0,66	< 2,0
K831-W	< 9,1	< 16	< 11	< 4,3	< 4,7	< 2,7	< 5,7	< 17	< 7,6	< 6,4	< 9,7	< 3,7	< 1,1	< 1,0	< 0,86
781-M	990	5300	54	51	9100	27	43	1800	43	7400	13000	170	6300	7500	150
781-W	1100	4500	< 6,4	110	18000	66	260	16000	< 15	4600	10000	183	7600	10000	240
841-M	1100	5600	13	43	11000	53	370	15000	< 19	8100	9900	230	5400	7900	110
841-W	580	2100	< 5,9	33	9700	25	Probe fehlte			2600	7100	240	6700	9400	190

<sup>1</sup>K: unbehandeltes Tier; <sup>2</sup>M: männlicher Fötus; <sup>3</sup>W: weiblicher Fötus

#### **4.5. Rückstände in maternalem und fötalem Kaninchengewebe (Studie 4)**

Wie die Auswertung von Studie 4 zeigt (Tabelle 24 - 26), konnten Trenbolon, Zeranol und Melengestrolacetat unter den gewählten Behandlungsbedingungen in fötalen Geweben nachgewiesen werden. Ausnahme war Zeranol in drei der vier Muskelproben und in Fett.

Bei der Analyse der Rückstände nach Trenbolonacetatbehandlung zeigte sich gegenüber den Rindern eine unterschiedliche Verteilung der Metaboliten in Muskel und Fett (Tabelle 27), was auf unterschiedliche Abbauewege der beiden Spezies hindeutet. Während bei den Färsen Trenbolon-17 $\alpha$  nur zu 4,5 % im Muskel vertreten war, waren es bei den Kaninchenmüttern 24 %. Im Fett war der Anteil an Trenbolon-17 $\beta$  ähnlich, wohingegen hier 26 % Trendion in den bovinen Proben nur noch 4 % bei den trächtigen Kaninchen gegenüberstehen. Trenbolon-17 $\alpha$  wird bei den Kaninchen also auch im Muskel- und im Fettgewebe akkumuliert. In der Plazenta lagen die Trenbolon-17 $\alpha$ -Konzentrationen bei einem Gesamtanteil von 57 %. Dieser Anteil wurde in keinem der fötalen Gewebe unterschritten. Im Mittel waren es 4,4 ng/g Muskel, 12 ng/g Leber, 11 ng/g Niere und 9,9 ng/g Fett. Das bedeutet, die Konzentration des gesamten Trenbolons in den fötalen Geweben erreichte im Vergleich zu den maternalen (100 %) etwa 50 % im Muskel, 100 % in der Leber, 10 % in Niere und 30 % im Fett.

Die Rückstände von Zeranol waren in fötalen und maternalen Proben deutlich niedriger als von Trenbolon. In der Plazenta waren es im Mittel 117 pg/g, in der fötalen Leber 130 pg/g (71 % gegenüber der maternalen), in der Niere 135 pg/g (16 %). In Fett betrug die Akkumulation beim Konzeptus höchstens ein Viertel im Vergleich zu den Muttertieren (Nachweisgrenze 11 pg/g). In Bezug auf den Muskel lassen sich aufgrund der stark schwankenden Ergebnisse (< 6,2 pg/g; < 6,2 pg/g, < 11 pg/g und 65 pg/g) keine eindeutigen Schlüsse ziehen.

Melengestrolacetat war in der verhältnismäßig höchsten Konzentration verabreicht worden, d. h. bezogen auf die zugelassene Dosierung von 0,5 mg/Tag bei einer Färse von rund 400 kg ist das bei einem Kaninchen von ca. 2,5 kg das 160-fache. Dementsprechend hoch waren auch die Rückstände bei den Muttertieren, insbesondere in Leber (im Mittel 175 ng/g) und Fett (50 ng/g). Gerade dort war die Akkumulation in fötalem Gewebe gegenüber dem mütterlichen Organismus

---

besonders niedrig mit 4 % in Leber und 12 % in Fett. In den fötalen Nieren waren es 39 %. Im fötalen Muskel hingegen konnten im Mittel fast doppelt so hohe Rückstände wie bei den Müttern detektiert werden.

Tabelle 25: Rückstände in den Kaninchengeweben nach Zeranol-Behandlung

<b>Tier #</b>	<b>Muskel</b> Zeranol [pg/g]	<b>Leber</b> Zeranol [pg/g]	<b>Niere</b> Zeranol [pg/g]	<b>Fett</b> Zeranol [pg/g]	<b>Plazenta</b> Zeranol [pg/g]
K 795	< 3,4	< 10	< 11	< 1,8	-
K 831	< 3,4	< 9,8	< 11	< 4,7	-
838	24	180	860	55	-
K 795-M	< 5,4	< 5,5	< 15	< 9,2	< 3,2
K 795-W	< 8,6	< 4,0	< 14	< 14	< 2,0
K 831-M	< 7,2	< 5,6	< 15	< 12	< 2,6
K 831-W	< 16	< 4,6	< 14	< 13	< 1,5
838-1M	< 6,2	97	36	< 10	140
838-2M	< 6,2	76	60	< 10	140
838-1W	65	140	240	< 13	97
838-2W	< 11	200	210	< 13	90

Tabelle 26: Rückstände in den Kaninchengeweben nach Melengestrolacetat-Behandlung

<b>Tier #</b>	<b>Muskel</b> MGA [pg/g]	<b>Leber</b> MGA [pg/g]	<b>Niere</b> MGA [pg/g]	<b>Fett</b> MGA [pg/g]	<b>Plazenta</b> MGA [pg/g]
K 795	< 6,5	< 650	< 21	< 19	-
K 831	< 6,8	< 590	< 22	< 46	-
832	290	190000	2800	28000	-
840	700	160000	2500	72000	-
K 795-M	< 34	< 23	< 60	< 100	< 3,4
K 795-W	< 40	< 22	< 66	< 120	< 4,4
K 831-M	< 40	< 24	< 56	< 130	< 3,0
K 831-W	< 83	< 28	< 86	< 250	< 4,1
832-M	990	5300	1100	3100	750
832-W	1000	5100	600	5600	950
840-M	950	7700	1000	4700	690
840-W	880	6200	1000	7000	810

Tabelle 27: Metabolitenmuster von Trenbolon in Kaninchengewebe

<b>Analyt [%]</b>	<b>Muskel</b>		<b>Leber</b>		<b>Niere</b>		<b>Fett</b>		<b>Plazenta</b>
	<b>Mutter</b>	<b>Fötus</b>	<b>Mutter</b>	<b>Fötus</b>	<b>Mutter</b>	<b>Fötus</b>	<b>Mutter</b>	<b>Fötus</b>	
TbOH-17 $\beta$	74	18	3,5	0,5	4,8	2,0	63	36	42
TbOH-17 $\alpha$	24	82	96	99	95	98	33	63	57
Trendion	1,8	0,3	0,6	0,4	0,7	0,1	4,1	1,3	1,1

## 5. Diskussion

### 5.1 Methoden

Die vorliegenden Untersuchungen basieren auf einer Abtrennung der Analyten mittels Fest-flüssig-Extraktion mit zum Teil vorhergehender enzymatischer Hydrolyse, anschließender Festphasenextraktion und Hochdruckflüssigchromatographie. Je nach den zu erwartenden Analytkonzentrationen wurde photometrisch bzw. immunologisch detektiert.

Auf dem Gebiet der hochempfindlichen Analytik von Steroidhormonen ist der ELISA derzeit noch am weitesten verbreitet. Er ist aufgrund der relativ einfachen Laborausstattung kostengünstig und er erlaubt einen hohen Probendurchsatz. Gerade was die Analyse von Östrogenen anbelangt, ist seine Sensitivität notwendig, da sich vergleichbar empfindliche GC-MS-Methoden erst in der Entwicklung befinden (Maume et al., 2001) und auch aufgrund der hohen finanziellen Investitionen noch nicht Eingang in die Routineanalytik gefunden haben. Darüber hinaus erfordern pharmakokinetische Untersuchungen, wie im vorliegenden Fall, im Gegensatz zur forensischen Rückstandsanalytik nicht zwingend die Identifikation der Analyten über einen molekularspektrometrischen Nachweis. Durch die Kopplung von ELISA und HPLC wurde die Spezifität der Methode wesentlich erhöht, einzelne Metaboliten konnten getrennt voneinander quantifiziert werden. Durch interne Standardisierung sollten Genauigkeit und Präzision der Resultate verbessert werden. Eventuelle Aufarbeitungsverluste und Störungen bei der chromatographischen Trennung konnten so leichter erkannt und behoben werden. Die HPLC mit DAD-Detektion wurde durch die Standardisierung besonders in punkto Genauigkeit (- 12 % bis + 8 %, im Mittel - 1 %) verbessert. Auch die Präzision (0,25 bis 8,1 %, im Mittel 3,2 %) war zufriedenstellend. Bei der Kopplung der HPLC mit dem ELISA mit zum Teil gleichen Verbindungen von Analyt und Standard wurde eine Genauigkeit nach interner Standardisierung von - 11 % bis + 18 %, im Mittel + 2 % und eine Präzision zwischen 11 und 21 %, im Mittel 14 % erzielt. In mehreren Fällen musste extern standardisiert werden, da die gesuchten Substanzen sonst überschätzt worden wären, d. h. die Wiederfindung des internen Standards relativ zum Analyten besser war.

Insgesamt gesehen hielten die Verfahren den anerkannten Überprüfungsmaßstäben der Kommissionsentscheidung 93/256/EC (Commission of the European Communities, 1993) stand, die Zuverlässigkeit ihrer Ergebnisse war demnach gewährleistet.

## 5.2 Grenzwerte für hormonal wirksame Leistungsförderer

Ausgangspunkt einer Bewertung der vorliegenden Resultate sollen die international empfohlenen Grenzwerte für die untersuchten Substanzen sein (Tabelle 28). Sie wurden bislang nur für die frei vorliegenden Wirkstoffe angegeben, weil man davon ausging, dass die Steroidester im Gewebe zügig hydrolysiert werden und nicht im bedeutenden Maße zur Rückstandslast beitragen. Wie hier jedoch gezeigt wurde, können über Implantationsstellen durchaus veresterte Steroidhormone in die Nahrung gelangen.

Tabelle 28: Internationale Toleranzgrenzen für Rückstände hormonal wirksamer Masthilfsmittel (FAO, 1998; FAO/WHO, 1999; JECFA, 1999)

Substanz	ADI <sup>1</sup> [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht]	MRL <sup>2</sup> [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	NOEL <sup>3</sup> /LOEL <sup>4</sup> [mg/Tag]
Östradiol-17 $\beta$	0,05	-	0,3 (NOEL)
Progesteron	30	-	200 (LOEL)
Testosteron	2	-	100 (NOEL)
Trenbolon	0,02	2 (Muskel: TbOH-17 $\beta$ ) 10 (Leber: TbOH-17 $\alpha$ )	-
Zeranol	0,5	2 (Muskel) 10 (Leber)	-

<sup>1</sup>ADI: acceptable daily intake; <sup>2</sup>MRL: maximum residue level; <sup>3</sup>NOEL: no-observed-effect level; <sup>4</sup>LOEL: lowest-observed-effect level

Coert et al. haben bereits 1975 bei Ratten gezeigt, dass Testosteronundecanoat nach oraler Aufnahme zum Teil schon in der Darmwand in 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron umgewandelt wird und dieses zusammen mit unverändertem Ester durch die Lymphe absorbiert wird. Andere weniger fettlösliche Umsetzungsprodukte gelangten dagegen in den Pfortaderkreislauf. Durch die Aufnahme in die Lymphe und die Umgehung der

Leberpassage wird ein Teil des Testosterons der unmittelbaren Inaktivierung in der Leber entzogen. Diese lange andauernden Wirkungen sind auch für Östradiolester gezeigt worden (Vazquez-Alcantara et al., 1989).

Es bestehen also durchaus Hinweise, dass von Implantationsstellen in zweifacher Hinsicht ein Risiko für den Verbraucher ausgeht, da sich in ihnen größere Mengen an unveränderten Steroidestern befinden: einmal durch die erhöhten Dosen und zum Zweiten durch ihre verlängerte Wirkung.

Für die natürlichen Hormone wurden keine maximalen Rückstandsgrenzen (MRL) angegeben, da nach ihrer Anwendung unter Einhaltung der GVP die Hormonkonzentrationen in essbaren Geweben als nicht gefährlich für den Menschen angesehen werden (FAO/WHO, 1999; JECFA, 1999). Das JECFA legte auf der Grundlage von Studien zu NOEL (no-observed-effect level) und LOEL (lowest-observed-effect level) tolerable Tagesaufnahmen (ADI) fest (Tabelle 28).

Der NOEL für Östradiol basiert auf Untersuchungen mehrerer hormonabhängiger Parameter bei postmenopausalen Frauen, die mit konjugierten Pferdeöstrogenpräparaten behandelt worden waren. Als Steuergröße diente dabei die Serumkonzentrationen an CBG (corticosteroid-binding globulin), dessen Synthese durch Östradiol gefördert wird. Eine Dosis von 0,3 mg/Tag (entsprechend 5 µg/kg Körpergewicht pro Tag) führte nicht mehr zu einer Erhöhung. Division durch einen Sicherheitsfaktor von 100, der interindividuelle Unterschiede und spezielle Sensitivitäten berücksichtigen soll, ergab einen ADI von 0,05 µg Östradiol-17β/kg Körpergewicht (JECFA, 1999). Es ist jedoch anzuzweifeln, ob die Wirkung von Pferdeöstrogenpräparaten, die hauptsächlich aus konjugiertem Equilin und Equilenin bestehen, der von Östradiol äquivalent ist (European Commission, 1999). Darüber hinaus konstatierte eine von der Europäischen Union beauftragte Expertenkommission, dass aufgrund der jüngsten Hinweise zu DNA-Schädigungen und zum mutagenen Potential durch Östradiol und seine Metaboliten kein Grenzwert festgelegt werden kann (European Commission, 1999).

Der LOEL von Progesteron stützt sich auf Studien, bei denen fein partikuläres Progesteron oral verabreicht wurde. 200 mg (entsprechend 3,3 mg/kg Körpergewicht) führten zu Progesteronkonzentrationen im Blut, die auch in der Lutealphase gemessen werden. Längerfristig ergaben sich auch keine Anzeichen für Hyperplasien des Endometriums oder Karzinome (JECFA, 1999).

Dem NOEL von Testosteron (100 mg Testosteron/Tag, entsprechend 1,7 mg/kg Körpergewicht) liegen Experimente zum Einfluss oral, in fein partikulärer Formulierung applizierten Testosterons auf die Sexualfunktionsindizes von fünf Eunuchen zugrunde. Im Gegensatz zu Östradiol und Progesteron (Faktor 100) wurde der ADI hier mit einem Sicherheitsfaktor von 1000 abgeleitet (JECFA, 1999).

Bis dato bestehen jedoch Zweifel daran, ob diese Sicherheitsfaktoren richtig gewählt wurden, um neben individuellen Sensitivitätsunterschieden auch synergistische Effekte ausreichend zu erfassen.

Zur Mutagenität oder Genotoxizität von Progesteron sind keine Studien verfügbar, die zu Testosteron waren negativ. Allerdings ist zu bedenken, dass Testosteron zu Östradiol aromatisiert werden kann und als solches ein höheres Risikopotential besitzt (European Commission, 1999).

Die FDA (U. S. Food and Drug Administration) schreibt in ihren Richtlinien für toxikologische Tests endogener Sexualsteroiden, dass keine physiologische Wirkung auftritt, wenn Konsumenten längerfristig Fleisch verzehren, das einen Mehranteil eines endogenen Steroids enthält, der maximal 1 % der täglichen Produktion der Bevölkerungsgruppe mit der geringsten Syntheserate entspricht. Die täglichen Syntheseraten werden mit 6 µg Östradiol/Tag und 150 µg Progesteron/Tag bei präpubertären Jungen und 32 µg Testosteron/Tag bei präpubertären Mädchen angegeben (FDA, 1994). Demzufolge wäre eine tägliche Aufnahme von 0,06 µg Östradiol, 1,5 µg Progesteron und 0,32 µg Testosteron unbedenklich.

Die ADI wurden jedoch bei 0,05 µg Östradiol, 30 µg Progesteron bzw. 2 µg Testosteron/kg Körpergewicht festgelegt (Tabelle 28). Bei einem Körpergewicht von 25 kg (präpubertäres Kind) errechnet sich für Östradiol demnach eine maximale Tagesaufnahme von 1,25 µg. Dieser Wert überschreitet die Unbedenklichkeitstoleranz der FDA um mehr als das 20-fache. Rechnet man analog mit Progesteron und Testosteron, ist es um ein Vielfaches mehr.

Nach Untersuchungen von Andersson und Skakkebæk (1999) wurden bisher keine Studien zur metabolischen Clearance natürlicher Sexualhormone an gesunden Kindern veröffentlicht und wohl schon aus ethischen Gründen kaum durchgeführt. Dies wäre aber unablässig zur Ermittlung der täglichen Produktionsrate, die als Produkt aus der Plasmakonzentration und der metabolischen Clearance errechnet wird. Es scheint, dass Ausscheidungsraten Erwachsener bei der Berechnung verwendet wurden. Die Autoren schätzen, dass es allein durch die unterschiedliche

Körpergröße um eine Überschätzung um das Zwei- bis Dreifache kommt. Darüber hinaus sei die Ausscheidung bei Kindern durch die höhere Bindungskapazität des SHBG (sex hormone-binding globulin) reduziert und der mikrosomale Abbau der Steroidhormone in der Leber wohl nicht höher als bei Erwachsenen. Des Weiteren besteht seit einigen Jahren die Vermutung, dass die Plasmaöstradiolgehalte bei präpubertären Kindern zu hoch angenommen worden sind. Klein et al. (1994) bestimmten Gehalte von  $0,6 \pm 0,6$  pg Östradiol-17 $\beta$ /ml Plasma bei Mädchen und von  $0,08 \pm 0,2$  pg/ml bei Jungen im präpubertären Alter mit Hilfe eines Bioassays auf der Basis genetisch modifizierter *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen. Auch wenn eine derartige biologische Testmethode nicht die Zuverlässigkeit besitzt, die von einer Bestätigungsmethode gefordert wird und die Ergebnisse bis dato mit anderen Verfahren noch nicht bestätigt werden konnten, so bestehen dennoch verstärkt Hinweise, dass die früher radioimmunologisch, nahe an der Nachweisbarkeitsgrenze bestimmten Plasmaöstradiolgehalte bei Kindern durch Matrixeffekte überschätzt wurden. Andersson und Skakkebæk (1999) schätzen die Tagesproduktion von Östradiol auf der Basis der Untersuchungen von Klein et al. (1994) auf 0,04  $\mu$ g (FDA, 1999: 6,5  $\mu$ g/Tag).

Was die für den menschlichen Organismus fremden Hormone, Zeranol und Trenbolon, anbelangt, wurden vom JECFA maximale Rückstandskonzentrationen festgelegt. Dabei wurden folgende toxikologischer Untersuchungen berücksichtigt (WHO, 1988; WHO, 1990): Für Zeranol konnte weder bei Mäusen noch bei Ratten eine teratogene Wirkung gezeigt werden. Auch die Studien zur Mutagenität von Zeranol, seiner Metaboliten Zearalanon und Taleranol waren in einer Reihe bakterieller und Säugerzellen-Testsystemen negativ. DNA-Schädigungen durch Zeranol wurden in *Bacillus subtilis* (Rec-Assay) festgestellt. Durch Taleranol kam es in Ovarzellen des Chinesischen Hamsters zu chromosomalen Aberrationen. Nach Metabolisierung von Taleranol durch Zugabe von Rattenleber-S9-Präparation fiel der Test allerdings negativ aus. Nach Applikation von 2,25 mg Zeranol/kg Körpergewicht pro Tag traten bei männlichen Mäusen vermehrt Tumoren des Hypophysenvorderlappens auf. Da die Inzidenz dieser spontan selten, jedoch nach Östrogenbehandlung auftretenden Form in einer Kontrollgruppe mit Östradiol-17 $\beta$ -Behandlung (0,375 mg/kg Körpergewicht pro Tag) noch höher war, stellte man die Tumoren in Zusammenhang mit der östrogenen Wirkung. Die Festlegung eines NHEL (no-hormonal-effect level) sollte daher die erforderliche Sicherheit geben.

Studien an weiblichen, ovariectomierten Javanamakaken ließen unterhalb von 0,05 mg/kg Körpergewicht pro Tag keine östrogenabhängigen Wirkungen mehr erkennen. Bei Trenbolon ergaben verschiedene Testanordnungen zum Teil Hinweise auf eine genotoxische Wirkung: der Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* TA 100 ohne Rattenleber-S9-Präparation (Trenbolon-17 $\beta$ ) sowie der Zelltransformationsassay und die Mikronukleusinduktion in Syrischen Hamsterembryofibroblasten (Trenbolon-17 $\alpha$  und - $\beta$ ). In murinen C3H10T1/2-Zellen wurden hingegen weder Zelltransformationen noch Induktion von Mikronuklei detektiert. Trenbolon-17 $\beta$  zeigte darüber hinaus *in vitro* eine irreversible Bindung an DNA aus *Salmonella typhimurium* TA 100 und Kalbsthymus. Der Index der kovalenten Bindung von Trenbolon-17 $\beta$  gegenüber Aflatoxin B1 und Dimethylnitrosamin war jedoch um das über 500- bzw. 300-fache kleiner. Grundlage für die Festlegung des NHEL waren drei Studien an Schweinen. In einer 14-Wochen-Studie mit Trenbolonacetat waren die empfindlichsten Auswirkungen im Bereich der Serumkonzentrationen von Testosteron und Östradiol sowie der Hodengewichte von Ebern bei 2 bis 3  $\mu$ g Trenbolonacetat/kg Körpergewicht pro Tag beobachtbar.

Vor diesem Hintergrund sowie Ergebnissen von Rückstandsmessungen, die unter GVP-Bedingungen durchgeführt wurden (FAO, 1987; FAO, 1990), wurden die Verbindungen zugelassen. Nach Einschätzung der Möglichkeiten einer analytischen Überwachung wurden die MRL festgelegt. Die Zulassung dieser Wirkstoffe blieb u. a. wegen der uneindeutigen Lage bei Trenbolon seither jedoch nicht unumstritten.

### **5.3 Rückstände in Implantationsstellen**

Die Ergebnisanalyse legt die Vermutung nahe, dass neben der Behandlungsdauer auch die Gewebezusammensetzung des Applikationsortes und die Formulierung der Präparate die Freisetzung der Wirkstoffe und damit die Rückstandssituation beeinflusst. Während nach 8 Wochen im Halsmuskel (Studie 1.1) im Revalor-H<sup>®</sup>-Implantat im Schnitt noch 40 % des ursprünglichen Gehaltes an Trenbolonacetat bzw. Östradiol-17 $\beta$  detektiert wurden, waren es nach 4 Wochen (Tier 978) noch fast 60 %. Darüber hinaus zeigte sich bei der Gegenüberstellung von 1.2 und 1.1 bzw. 2, 3 (Kälber) und 1.3, dass die Hormone im Ohr langsamer aus den Matrices freigegeben werden als im Halsmuskel. Obwohl in Studie 2 und 3 (Kälber) die Erfassung der Rückstände in den peripheren Geweben im Vordergrund stand und

der gesamte Kopfbereich als BSE-Risikomaterial inzwischen weder in die menschliche noch in die tierische Nahrungskette gelangen darf, war es aus pharmakokinetischer Sicht von Interesse, die Rückstandssituation in den Implantaten, Ohr und Ohrgrund zu erfassen. Während bei Revalor-H<sup>®</sup> im Ohr 55 % der applizierten Dosis detektiert wurden, waren es im Hals 30 %. Bei Finaplix-H<sup>®</sup> waren es 23 % gegenüber 17 %, bei Synovex-H<sup>®</sup> 40 % (Färsen) gegenüber 16 %. Auch aus pharmakotechnologischer Sicht unterscheiden sich die Präparate. Während bei Compudose<sup>®</sup> Silicongummi als Trägermaterial fungiert, sind es bei den übrigen der verwendeten Implantate aus nicht näher beschriebenen Hilfsstoffen komprimierte Pellets. Im Silicongummiimplantat Compudose<sup>®</sup> waren nach 8 Wochen noch fast 60 % (15 mg) der ursprünglichen Menge an Östradiol-17 $\beta$  enthalten, während die Rückstände im umgebenden Gewebe unter 10 ng/g lagen. In den Revalor-H<sup>®</sup>-Pellets (Studie 1.1) waren demgegenüber nur noch etwa 40 % des Ausgangsöstradiolgehaltes messbar, die Konzentrationen im umgebenden Gewebe waren aber um ein Vielfaches höher. Auch bei der Freisetzung von Östradiolbenzoat aus Synovex-H<sup>®</sup> und Synovex Plus<sup>®</sup> (Studie 3 Eber) zeigen sich Unterschiede, die sicherlich auf die Formulierung zurückzuführen sind. Während die Hormonrückstände in den Synovex-H<sup>®</sup>-Pellets bei 45 % lagen, waren in denen von Synovex Plus<sup>®</sup> nur noch 17 % Östradiolbenzoat nach 5 Wochen enthalten. Im Implantationsinnenbereich ergab sich ein umgekehrtes Bild. Hier waren die Östradiolbenzoatkonzentrationen bei Synovex Plus<sup>®</sup> fast zehnmal, die Gehalte an Östradiol-17 $\beta$  dreimal so hoch – sicherlich bedingt durch höhere Freisetzung aus den Synovex Plus<sup>®</sup>-Implantaten.

Nach Applikation in essbare Teile des Schlachtkörpers (Versuch 1) können in einem Fleischstück bis zu 10 mg Trenbolonacetat, 0,001 mg Trenbolon-17 $\beta$ , 0,3 mg Testosteronpropionat, 0,05 mg Testosteron, 0,3 mg Östradiolbenzoat, 4 mg Östradiol-17 $\beta$  oder 0,9 mg Progesteron zurückbleiben. In herauspräparierbaren Pellets waren nach 8 Wochen demgegenüber noch rund 20 bis 50 % des Ausgangswirkstoffgehaltes nachweisbar, d. h. 60 mg Trenbolonacetat, 0,1 mg Trenbolon-17 $\beta$ , 30 mg Testosteronpropionat, 7 mg Östradiolbenzoat, 7 mg Östradiol-17 $\beta$  oder 50 mg Progesteron. Im Kamm der Eber (Versuch 3) wurden maximal 12 mg Testosteronpropionat, 0,13 mg Testosteron, 49 mg Trenbolonacetat, 2,6 mg Trenbolon-17 $\beta$ , 9,6 mg Östradiolbenzoat und 0,13 mg Östradiol detektiert.

Aufgrund der Gefahr der Kontamination beim Entfernen der Pellets aus dem Gewebe ist es schwierig, eine Verteilungskinetik Implantat – Implantationsinnenbereich – Implantationsaußenbereich aufzustellen. Betrachtet man die Applikationen von Revalor<sup>®</sup>-H in essbares Gewebe, da hier im Vergleich zu den übrigen Präparaten eine Reihe von Ergebnissen zur Verfügung steht, so nehmen im ersten Schritt die Mengen im Mittel um das 10- bis 20-fache, im zweiten um das 50- bis 500-fache ab. Die Implantate stellen demnach das bedeutendste Risiko für den Verbraucher dar, da sie zum Teil bei der Fleischinspektion nicht gefunden werden können. So können mehrere Kilogramm bis zu mehreren Tonnen von Fleisch bei der Verarbeitung einer Implantationsstelle kontaminiert werden (s. u., Tabelle 29). Doch selbst makroskopisches Entfernen der Präparate kann eine erhebliche Kontamination des Schlachtkörpers nicht verhindern. Über das umgebende Gewebe können noch hohe Mengen hormonal wirksamer Substanzen in die Nahrungskette gelangen und damit ein Risiko für den Verbraucher darstellen, da die Wirkstoffe selbst Hitzebehandlung überstehen (Rapp und Meyer, 1989).

Wenn man nun in einer „worst-case“-Betrachtung annimmt, dass aus 60 mg Trenbolonacetat in einer Fleischportion von 250 g etwa 52 mg Trenbolon-17 $\beta$  im Körper freigesetzt werden, müsste bei einem MRL von 2  $\mu$ g/kg durch die Verarbeitung mindestens eine „Verdünnung“ von 1 : 104000 erfolgen, um die Toleranzgrenze zu unterschreiten. Chargen dieser Größe (26 t) sind aber selbst bei der industriellen Verarbeitung unrealistisch. Das hieße andererseits, dass bei der Prozessierung von 600 kg Fleisch der MRL um mehr als das Vierzigfache überschritten werden würde. Tabelle 29 zeigt weitere Beispiele einer solchen Modellkalkulation. Das höchste Gefährdungspotential geht demnach von Trenbolon bzw. -acetat und Östradiol aus. Testosteronpropionat ist an dritter Position einzuordnen, Progesteron kann hingegen auf der Basis der geltenden Richtwerte als weniger risikorelevant eingestuft werden. Zu Zeranol sind keine abschließenden Aussagen möglich, da aufgrund der fehlenden Ergebnisse die Rückstandssituation dort nicht evaluiert werden konnte.

Tabelle 29: Mögliche Kontamination von verarbeitetem Rindfleisch durch Implantationsstellen

<b>Substanz</b>	<b>Angenommene Rückstandsmenge in einer Implantationsstelle</b>	<b>Zugrundegelegter Grenzwert</b>	<b>Nötiger „Verdünnungsfaktor“</b>
Östradiol	7 mg	ADI 3 µg/60 kg	2300
Progesteron	50 mg	ADI 1,8 mg/60 kg	28
Testosteron (als Testosteronpropionat)	30 mg	ADI 120 µg/60 kg	250
Trenbolon (als Trenbolonacetat)	60 mg	MRL 2 µg/kg	104000

#### **5.4 Rückstände in peripheren Geweben**

In den peripheren Geweben wurde der MRL von 10 ng Trenbolon-17 $\alpha$ /g Leber (FAO/WHO, 1999) nach Zehnfachdosierung von Finaplix-H<sup>®</sup> bei beiden Tieren (34 ng/g bzw. 27 ng/g) und nach Dreifachdosierung bei einem Tier (11 ng/g) überschritten. In Muskel konnte selbst nach Zehnfachdosierung keine Verletzung des MRL (2 ng Trenbolon-17 $\beta$ /g) festgestellt werden. Es wurden maximal 0,3 ng/g gemessen. In Niere belief sich der Höchstwert auf 1,4 ng Trenbolon-17 $\alpha$ /g, in Nierenfett auf 2,5 ng Trenbolon-17 $\beta$ /g.

Bei der Analyse dieser Resultate ist zu berücksichtigen, dass nach Applikation von 6,7-<sup>3</sup>H-Trenbolonacetat beobachtet wurde, dass mehr als 90 % der Rückstände nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar waren (Ryan und Hoffmann, 1978). Hoffmann et al. (1984) bezifferten die Fraktion extrahierbarer freier und konjugierter Steroide in Muskel auf 5 %, in Leber auf 10 - 15 %. Ein Großteil der gebundenen Radioaktivität konnte durch Proteolyse mit Trypsin und Pepsin wasserlöslich gemacht werden (Ryan und Hoffmann, 1978), d. h. diese proteingebundenen Rückstände können im Gastrointestinaltrakt zum Teil wieder freigesetzt werden.

Die Behandlung mit Ralgro<sup>®</sup> führte auch nach zehnfacher Dosis nicht zu Rückständen, die oberhalb der Grenzwerte von 2 ng/g Muskel und 10 ng/g Leber (FAO/WHO, 1999) liegen (Tabelle 16). Beide Leberproben und eine Nierenprobe der unbehandelten Kontrollgruppe wurden zwar positiv getestet (70 bzw. 60 pg Zeranol/g

Leber bzw. 12 pg Zeranol/g Niere), doch Kennedy et al. haben bereits 1998 beschrieben, dass Zeranol *in vivo* aus den weit verbreiteten *Fusarium spp.*-Toxinen  $\alpha$ -Zearalenol und Zearalenon gebildet werden kann. Darüber hinaus war eine deutliche Unterscheidung gegenüber den einfach behandelten Tieren möglich. Die Gehalte in Leber unterschieden sich mindestens um den Faktor 5, in Niere sogar um mehr als das 15-fache.

Zur Einschätzung der Östradiolgehalte wurden die Inkremente der FDA herangezogen (Code of Federal Regulations, 1999b). Sie sind als Differenz zwischen den Konzentrationen definiert, die man in behandelten und unbehandelten Tieren findet. Schon die einfach behandelten Tiere zeigten ansteigende Östrogengehalte in Leber und Niere. Die durch negatives Feedback verringerte endogene Synthese könnte demnach schon hier durch Freisetzung aus dem Präparat überkompensiert worden sein. Nach dreifacher Dosis von Synovex-H<sup>®</sup> wurde bereits der festgelegte Differenzwert von 0,24 ng/g Leber bzw. 0,36 ng/Niere überstiegen (im Mittel 0,40 ng/g Leber bzw. 0,37 ng/g Niere nach dreifacher und 1,5 ng/g Leber bzw. 1,5 ng/g Niere nach zehnfacher Dosierung). In Lende und Fettgewebe wurden die Toleranzgrenzen von 0,12 ng/Muskel und 0,48 ng/g Fett nicht erreicht.

Die Rolle langkettiger C-17-Östradiolfettsäureester sollte in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben, auch wenn in der vorliegenden Studie keine Untersuchungen dazu gemacht wurden. Ihre Synthese konnte beim Rind in Leber und Nierenfett nachgewiesen werden (Paris und Rao, 1989; Paris et al., 1994). Eine mögliche Akkumulation im Fettgewebe nach Östradiolbehandlung sollte aufgrund der lange anhaltenden Wirkungen (Vazquez-Alcantara et al., 1989) noch erforscht werden.

Für Testosteron sind durch die FDA Grenzwerte in ungekochten Gewebe von Ochsen und Kälbern festgelegt worden: 0,64 ng/g Muskel, 1,3 ng/g Leber, 1,9 ng/g Niere und 2,6 ng/g Fett (Code of Federal Regulations, 1999c). Selbst nach zehnfacher Gabe wurde bei den Färsen keine Verletzung dieser Werte festgestellt. In Leber war nicht einmal ein Anstieg gegenüber den unbehandelten Tieren sichtbar. Die Synthese abbauender Enzyme könnte in einem so hohen Maß induziert gewesen sein, dass Testosteron selbst nicht erhöht war.

Im Kälbersversuch wurden bei keinem der Tiere die genannten Grenzwerte für Östradiol, Testosteron oder Trenbolon erreicht. Das Absinken der

Testosteronkonzentrationen nach Gabe von Trenbolonacetat lässt sich durch ein negatives Feedback auf die endogene Testosteronsynthese erklären.

Zur Beurteilung der Plausibilität der Ergebnisse wurden Studien mit ähnlichen Präparaten in vergleichbaren Dosierungen herangezogen. Zu Trenbolon gibt es zwei Studien, die auf radioimmunologischen Messungen beruhen (FAO, 1990; Hoffmann und Oettel, 1976). Mit Ausnahme der Trenbolon-17 $\alpha$ -Gehalte in Leber und Niere von Färsen sind dort die Gehalte höher (Tabelle 15 und 30). Ein Grund dafür könnte verbesserte Extraktion und Reinigung sowie die separate Detektion der einzelnen Metaboliten sein.

Die Studien bezüglich Zeranol (O'Keefe, 1984; Dixon und Russel, 1986) stimmen mit den erzielten Ergebnissen überein, was die Leberproben betrifft. Die Werte in Muskel und Fett sind in den Vergleichstudien höher, die in Niere niedriger (Tabelle 16 und 31).

Auch eine Gegenüberstellung der Östradiol- und Testosterongehalte (Tabelle 17, 18, 32, 33) spiegelt die Tendenz wider, dass die vorliegenden Werte unter denen der Vorgängerstudien liegen. Besonders bei den zwei natürlichen Hormonen muss, wie die Daten von Scippo et al. (1993) zeigen, stets eine erhebliche biologische Streuung miteinbezogen werden. Die höheren Werte in Leber und Niere können unter anderem durch unterschiedliche Probennahme erklärt werden, da im inneren Teil der Leber ein größerer Anteil an Gallengängen enthalten ist und demnach höhere Hormonkonzentrationen zu erwarten sind.

Was das Östrogenmuster anbelangt, ist nur eine Studie mit Compudose-behandelten (20 mg Östradiol-17 $\beta$ ) männlichen Kälbern verfügbar (Meyer et al., 1984a). Dieser Untersuchung folgend enthalten Proben behandelter Rinder mit einem höheren Gesamtöstrogengehalt 26 % Östradiol-17 $\beta$ , 4 % Östradiol-17 $\alpha$  und 70 % Östron. Auf einem vergleichbaren Niveau bedeutet das eine gute Übereinstimmung.

Tabelle 30: Literaturübersicht zu Studien mit Trenbolonacetatbehandlung

Autoren	Tiere	Behandlung	Muskel		Leber		Niere		Nierenfett	
			TbOH-17 $\beta$ [pg/g]	TbOH-17 $\alpha$ [pg/g]	TbOH-17 $\beta$ [pg/g]	TbOH-17 $\alpha$ [pg/g]	TbOH-17 $\beta$ [pg/g]	TbOH-17 $\alpha$ [pg/g]	TbOH-17 $\beta$ [pg/g]	TbOH-17 $\alpha$ [pg/g]
Hoffmann und Oettel, 1976	Kälber	20 mg E2-17 $\beta$ + 140 mg TBA <sup>1</sup> 69 Tage	125 (f <sup>2</sup> )		2105 (f + k <sup>3</sup> )		886 (f + k)		477 (f)	
FAO, 1990	Färsen	300 mg TBA 60 Tage	152 (f)	60 (f)	1162 (f + k)	1762 (f + k)	484 (f + k)	257 (f + k)	345 (f)	93 (f)

<sup>1</sup>TBA: Trenbolonacetat; <sup>2</sup>f: frei; <sup>3</sup>f + k: frei und konjugiert

Tabelle 31: Literaturübersicht: Studien zu Zeranol

Autoren	Tiere	Behandlung	Muskel	Leber	Niere	Nierenfett
			Zeranol [pg/g]	Zeranol [pg/g]	Zeranol [pg/g]	Zeranol [pg/g]
O'Keefe, 1984	männliche Kälber	-	1	140	28	64
O'Keefe, 1984	männliche Kälber	35 mg Zeranol 67 Tage	14	350	76	60
Dixon und Russel, 1986	Kühe	36 mg Zeranol 70 Tage	130	300	160	180

Tabelle 32: Übersicht über Studien zu Östradiolgehalten in Rindfleisch

Autoren	Tiere	Behandlung	Muskel		Leber		Niere		Nierenfett	
			E2-17β [pg/g]	E1 [pg/g]	E2-17β [pg/g]	E1 [pg/g]	E2-17β [pg/g]	E1 [pg/g]	E2-17β [pg/g]	E1 [pg/g]
Henricks und Torrence, 1977	Färsen	-	12		38		40			
Henricks und Torrence, 1977	Färsen	-	13		71		71			
Henricks et al., 1982	Färsen	-							45 - 67	
Kushinsky, 1983	Färsen	-	5,5	2,5	1,5	1,7	2,9	1,4	13	11
Kushinsky, 1983	Färsen	20 mg E2-benz <sup>1</sup> +200 mg T-prop <sup>2</sup> 61 Tage	11	4,0	3,2	1,5	9,8	3,6	49	28
Meyer et al., 1984b	weibliche Kälber	-	2 (GÖ <sup>3</sup> )		600 (GÖ)		270 (GÖ)			
Meyer et al., 1984b	weibliche Kälber	20 mg E2-benz+200 mg T-prop, 75 Tage	16 (GÖ)		854 (GÖ)		780 (GÖ)			
Scippo et al., 1993	Kälber	-	3,5 - 33	15 - 78	5,3 - 53	170-198	7,8 - 69	23-166	5,6 - 50	80 - 94

<sup>1</sup>E2-benz: Östradiolbenzoat; <sup>2</sup>T-prop: Testosteronpropionat; <sup>3</sup>GÖ: Gesamtöstrogene

Tabelle 33: Übersicht über Studien zu Testosterongehalten in Rindfleisch

Autoren	Tiere	Behandlung	Muskel	Leber	Niere	Nierenfett
			Testosteron [pg/g]	Testosteron [pg/g]	Testosteron [pg/g]	Testosteron [pg/g]
Hoffmann und Rattenberger, 1977	Färsen	-	92	193	595	250
Kushinsky, 1983	Färsen	-	20	10		30
Hoffmann und Rattenberger, 1977	weibliche Kälber	-	16	39	256	178
Hoffmann und Rattenberger, 1977	weibliche Kälber	20 mg E2-17 $\beta$ +200 mg T-prop 77Tage	70	47	685	340
Scippo et al., 1993	weibliche Kälber	-	10 - 420	10	60 - 380	20 - 170

### **5.5 Transfer von Trenbolon, Zeranol und Melengestrolacetat vom Muttertier zum Fötus**

Kaninchen besitzen, wie auch Primaten, eine Placenta haemochorialis, d. h. das Chorionepithel grenzt direkt an das mütterliche Blut, da neben dem Uterusepithel auch das Gefäßendothel des mütterlichen Endometriums abgebaut wird. Im Gegensatz zu den Primaten (Placenta haemomonochorialis) ist bei den Kaninchen das Chorionepithel zweischichtig (Placenta haemodichorialis). Eine äußere syncytiale und eine innere zelluläre Trophoblastenschicht bilden die Diffusionsbarriere zwischen dem mütterlichen und dem fötalen Organismus (Schnorr, 1989). Diese Plazentaschranke kann von lipophilen Verbindungen leicht passiert werden (Forth et al., 1992), wie im vorliegenden Versuch auch für Trenbolon, Zeranol und Melengestrolacetat gezeigt werden konnte.

Stellt man die drei untersuchten Substanzen in Bezug auf ihre Verteilungskinetiken in maternalem und fötalem Organismus einander gegenüber, lassen sich Parallelen feststellen. Während bei Trenbolon und Zeranol die größte Differenz zwischen Mutter und Konzeptus in der Niere vorlag, war es bei Melengestrolacetat die Leber. In eben diesen Organen wurden entsprechend bei den Müttern die höchsten Geweberückstände detektiert. Bei den Föten hingegen glichen sich die Trenbolon- und Zeranolgehalte in Leber und Niere, bei Melengestrolacetat waren die Konzentrationen in der fötalen Leber noch sechsmal höher als in der Niere.

Diese Befunde könnten zunächst einmal darauf hindeuten, dass die primäre Ausscheidung von Trenbolon und Zeranol bei Kaninchen über den Harn erfolgt. Zum anderen ist der Unterschied zwischen Mutter und Konzeptus Beleg dafür, dass die exkretorische Kapazität von fötaler Leber und Niere noch nicht mit der des mütterlichen Organismus vergleichbar ist. Es ist bekannt, dass die fötalen Nieren relativ früh in der Entwicklung mit der Harnbildung beginnen, auch wenn ihre Tätigkeit zu diesem Zeitpunkt noch nicht lebensnotwendig ist, da die Stoffwechselprodukte des Konzeptus über die Plazenta an das mütterliche Blut abgegeben werden (Schnorr, 1989). Wenn auch die Akkumulation von Rückständen in fötaler Leber und Niere nicht so ausgeprägt war wie in den entsprechenden mütterlichen Organen, so waren die Gehalte gegenüber Muskel doch erhöht. Das lässt darauf schließen, dass die Funktionsfähigkeit im Behandlungszeitraum, der zweiten Trächtigkeitshälfte bis hin zur Geburt, schon in beträchtlichem Maße

ausgebildet war. Über die metabolische Kapazität der fötalen Leber zu diesem Zeitpunkt lässt sich spekulieren. Im humanen Fötus gibt es bereits im zweiten Trimester Anzeichen für aktive Metabolisierung und Konjugation (Tsukamoto, 1984). Der im Vergleich zu den maternalen Geweben relativ hohe Anteil von Trenbolon-17 $\alpha$  in den fötalen Geweben könnte Hinweis sein, dass das in den Fötalkreislauf gelangte Trenbolon dort in der Leber weiter abgebaut wird.

Betrachtet man die Rückstandsunterschiede zwischen den Geschwistern, fällt auf, dass in Fett bei Trenbolon-17 $\beta$  und Melengestrolacetat eine deutliche Geschlechtsdifferenz besteht. Während Trenbolon-17 $\beta$  bei den männlichen Föten stärker akkumuliert wird, überwiegt Melengestrolacetat bei den weiblichen Geschwistern. Bei Melengestrolacetat findet man das gleiche Verhältnis – wenn auch weniger stark ausgeprägt - schon in der Plazenta, wohingegen sich dort bei den Trenbolonmetaboliten gegenüber dem Fett ein umgekehrtes Bild darstellt. Alle drei Metaboliten liegen bei den Schwestern in höheren Konzentrationen vor als bei den Brüdern. Nach Zeranol-Behandlung wiesen die zwei weiblichen Geschwister jeweils höhere Rückstände in ihren Geweben auf als ihre Brüder, in der Plazenta waren die Gehalte jedoch bei den Schwestern niedriger. Auch in der Relation der Gehalte in Leber und Niere unterschieden sich die jeweils gleichgeschlechtlichen Geschwisterpaare voneinander. Während bei den Brüdern die Konzentrationen in Niere nur etwa die Hälfte derjenigen in Leber ausmachten, waren es bei den Schwestern 1,3-mal so viel, d. h. es bestehen mögliche Abweichungen in der Entwicklung der Organfunktionen, die aber einer näheren Prüfung bedürfen.

Für eine differenzierte Analyse der toxikologischen Konsequenzen der vorliegenden Untersuchungen ist es auch wichtig, die Metabolisierungsmuster der Substanzen im Kaninchen mit denen im Menschen zu vergleichen. Trenbolon und Zeranol werden bei Mensch (Spranger und Metzler, 1991; Baldwin et al., 1983) und Kaninchen (s. o.) hauptsächlich über den Urin ausgeschieden, während bei der Ratte die biläre Exkretion überwiegt (Pottier et al., 1981; Baldwin et al., 1983). Eine zweite Parallele ist, dass auch beim Kaninchen der Hauptmetabolit von Trenbolonacetat Trenbolon-17 $\alpha$  ist, während bei der vielfach in Teratogenitätsstudien untersuchten Ratte 16 $\alpha$ -Hydroxytrendion und 16 $\alpha$ -Hydroxy-17 $\beta$ -trenbolon überwiegen (Spranger und Metzler, 1991). Im Kaninchen tritt Trendion bei der Biotransformation wohl nur intermediär, nicht als Speicherform auf. Diese Aspekte sind zu berücksichtigen, wenn man von

---

Teratogenitätsstudien in Ratten Risiken für den humanen Organismus ableiten möchte.

## 6. Zusammenfassung

Bei der Anwendung hormonal wirksamer Leistungsförderer in der Tiermast in Form von Implantationspräparaten ist die Einhaltung der GVP unabdingbar. Gelangen Implantationsstellen in die Nahrungskette, können ganze Chargen von Fleischprodukten kontaminiert werden. Das höchste Gefährdungspotential geht dabei von Trenbolonacetatpräparaten aus, gefolgt von Östradiol bzw. Östradiolbenzoat, Testosteronpropionat und Progesteron. Eine Evaluierung von Zeranol war diesbezüglich im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht möglich. Bei Mehrfachdosierung können in peripheren Geweben weder nach Behandlung mit Zeranol noch mit Testosteronpropionat unzulässig hohe Rückstände detektiert werden. Missbräuchliche Anwendung von Trenbolonacetat und Östradiolbenzoat hingegen kann zur Verletzung erlaubter Toleranzgrenzen führen. Eine Überschreitung des MRL für Leber wurde in einem von zwei Tieren nach Applikation von 600 mg und bei zwei Tieren nach Applikation von 2000 mg Trenbolonacetat festgestellt. Die U. S.-Östradiolgrenzwerte wurden in Leber und in Niere schon nach dreifacher Dosis von Synovex-H<sup>®</sup> überschritten. Die Behandlung von Kälbern mit Synovex-H<sup>®</sup> und Synovex Plus<sup>®</sup> führte zu ähnlichen Rückstandsniveaus wie nach Behandlung von Färsen mit Synovex-H<sup>®</sup> bzw. Finaplix-H<sup>®</sup>.

Mögliche Auswirkungen von Rückständen hormonaler Leistungsförderer in der Nahrung müssen stets im Zusammenhang mit der Gesamtbelastung durch „endocrine disruptors“ gesehen werden. Besonderes Augenmerk gilt dabei möglichen irreversiblen Effekten auf die pränatale und präpubertäre Entwicklung. Der plazentale Transfer von Trenbolon, Zeranol und Melengestrolacetat konnte beim Kaninchen anhand von Rückstandsuntersuchungen fötaler Gewebe gezeigt werden, d. h. diese Verbindungen passieren die Plazentaschranke und können so möglicherweise *in utero* die Organogenese beeinträchtigen.

## 7. Summary

Application of hormonal growth promoting implant preparations in animal fattening has to take place in observance of GVP. Implantation sites reaching the food chain can contaminate whole batches of processed meat. The highest potential risk comes from trenbolone acetate preparations, followed by estradiol or estradiol benzoate, testosterone propionate and progesterone. An evaluation of zeranol was not possible within the scope of this study. After multiple application, treatment with zeranol or testosterone propionate does not cause any infringement of threshold levels in peripheral tissues. Misuse of trenbolone acetate and estradiol benzoate, however, may lead to illicit values. Exceeding of the MRL was found in liver in one out of two animals after treatment with 600 mg and in two out of two animals after treatment with 2000 mg trenbolone acetate. U. S. estradiol threshold levels were violated in the liver and in the kidney even after 3-fold dose of Synovex-H<sup>®</sup>. Treatment of calves with Synovex-H<sup>®</sup> or Synovex Plus<sup>®</sup> led to similar residue levels as after Synovex-H<sup>®</sup> or Finaplix-H<sup>®</sup> treatment of heifers.

Possible effects of residual hormonal growth promoters in food have to be connected with the overall burden of endocrine disruptors. Attention has to be directed to irreversible effects on prenatal and prepubertal development. The placental transfer of trenbolone, zeranol and melengestrol acetate could be shown in rabbit after residue analysis of fetal tissues. These substances pass the placental barrier and could possibly impair organogenesis *in utero*.

## 8. Literatur

Andersson AM, Skakkebaek NE. Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *European Journal of Endocrinology* 1999;140:477-485.

Baldwin RS, Williams RD, Terry MK. Zeranol: A review of the metabolism, toxicology, and analytical methods for detection of tissue residues. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1983;3:9-25.

Bauer ERS, Daxenberger A, Petri T, Sauerwein H, Meyer HHD. Characterisation of the affinity of different anabolics and synthetic hormones to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progesterin receptor. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2000;108:838-846.

Blottner S, Hingst O, Meyer HHD. Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of Reproduction and Fertility* 1996;108:299-305.

Breier BH, Gluckmann PD, Bass JJ. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status and oestradiol-17 $\beta$  on hepatic high- and low-affinity somatotrophic binding sites. *Journal of Endocrinology* 1988;116:169-177.

Casademont G, Pérez B, García Regueiro JA. Simultaneous determination, in calf urine, of twelve anabolic agents as heptafluorobuturyl derivatives by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography Biomedical Applications* 1996;686:189-198.

Code of Federal Regulations. Food and Drugs, 21, Ch. I, Part 522.842, 522.2478 und 522.2680. US Government Printing Office, Washington, D. C., 1999a:  
[http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_99/21cfrv6\\_99.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_99/21cfrv6_99.html).

Code of Federal Regulations. Food and Drugs, 21, Ch. I, Part 556.240. US Government Printing Office, Washington, D. C., 1999b:  
[http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_99/21cfrv6\\_99.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_99/21cfrv6_99.html).

Code of Federal Regulations. Food and Drugs, 21, Ch. I, Part 556.710. US Government Printing Office, Washington, D. C., 1999c:  
[http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_99/21cfrv6\\_99.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_99/21cfrv6_99.html).

Coert A, Geelen J, de Visser J, van der Vies J. The pharmacology and metabolism of testosterone undecanoate (TU), a new orally active androgen. *Acta Endocrinologica* 1975;79:789-800.

Commission of the European Communities. Commission Decision 93/256/EC of 14 April 1993 laying down the methods to be used for detecting residues of substances having a hormonal or thyrostatic action. *Official Journal of the European Community* 1993;L118:64-74.

Council of the European Communities. Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists. Official Journal of the European Community 1996;L125.

Cutler GB Jr. The role of estrogen in bone growth and maturation during childhood and adolescence. *Journal of Steroid Biochemistry* 1997;61:141-144.

Daeseleire E, de Guesquière A, van Peteghem C. Derivatization and gas chromatographic-mass spectrometric detection of anabolic steroid residues isolated from edible muscle tissues. *Journal of Chromatography Biomedical Applications* 1991;562:673-679.

Danhaive PA, Rousseau GG. Binding of glucocorticoid antagonists to androgen and glucocorticoid hormone receptors in rat skeletal muscle. *Journal of Steroid Biochemistry* 1986;24:481-487.

Danhaive PA, Rousseau GG. Evidence for sex-dependent anabolic response to androgenic steroids mediated by muscle glucocorticoid receptors in the rat. *Journal of Steroid Biochemistry* 1988;29:575-581.

Davis SL, Borger ML. Dynamic changes in plasma prolactin, luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized ewes. *Journal of Animal Science* 1974;38:795-802.

Davis SL, Ohlson DL, Klindt J, Anfinson NS. Episodic growth hormone secretory patterns in sheep: relationship to gonadal steroids. *American Journal of Physiology* 1977;233:E519-E523.

Daxenberger A, Lange I, Meyer K, Meyer HHD. Detection of anabolic residues in misplaced implantation sites in cattle. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International* 2000;83:809-819.

Daxenberger A, Hageleit M, Kraetzel WD, Lange IG, Claus R, Le Bizec B, Meyer HHD. Suppression of androstendione in entire male pigs by anabolic preparations. *Livestock Production Science* 2001;69,139-144.

Dieckmann KP, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *International Journal of Cancer* 1999;83:815-822.

Dixon SN, Russel KL. Radioimmunoassay of the anabolic agent zeranol. IV. The determination of zeranol concentrations in the edible tissues of cattle implanted with zeranol (Ralgro). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1986;9:94-100.

Duncan GW, Lyster SC, Hendrix JW, Clark JJ, Webster HD. Biologic effects of melengestrol acetate. *Fertility and Sterility* 1964;15:419-432.

European Commission. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary measures relating to Public Health, Assessment of potential risks to human health from hormone residues on bovine meat and meat products, 1999:

[http://europa.eu.int/comm/fod/fs/sc/scv/outcome\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/fod/fs/sc/scv/outcome_en.html).

Everett DJ, Perry CJ, Scott KA, Martin BW, Terry MK. Estrogenic potencies of resorcylic acid lactones and 17- $\beta$ -estradiol in female rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1987;20:435-443.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Residues of some veterinary drugs in animals and foods. *FAO Food and Nutrition Paper* 1987;41:38-47.

FAO. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. *FAO Food and Nutrition Paper* 1990;41/2:88-98.

FAO. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. *FAO Food and Nutrition Paper* 1998;41/10: <http://fao.org/docrep/w8338e/w8338e0e.htm>.

FAO/WHO (World Health Organization). Codex Alimentarius: Veterinary drug residues in food - maximum residue limits, FAOSTAT Database Collections 1999: [http://apps.fao.org/CodexSystem/vetdrugs/vetd\\_q-e.htm](http://apps.fao.org/CodexSystem/vetdrugs/vetd_q-e.htm).

FDA (U. S. Food and Drug Administration). Guideline No. 3: General principles for evaluating the safety of compounds used in food-producing animals, Part II: Guideline for toxicological testing, 1994: <http://www.fda.gov/cvm/guidance/guideline3pt2.html>.

Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich: BI-Wissenschaftsverlag 1992.

Fritsche S, Steinhart H. Occurrence of hormonally active compounds in food: a review. *European Food Research and Technology* 1999;209:153-179.

Gassner FX, Martin RP, Algeo WI. Hormone in der Tiermast. 6. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Kiel, 28. – 30.04.1959. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1960:151-194.

Gondos B, Renston RH, Conner LA. Ultrastructure of germ cells and Sertoli cells in the postnatal rabbit testis. *American Journal of Anatomy* 1973;136:427-439.

Gondos B, Renston RH, Goldstein DA. Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. *American Journal of Anatomy* 1976;145:167-181.

Gray LE Jr, Ostby J. Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus nonendocrine mechanisms. *Toxicology and Industrial Health* 1998;14:159-184.

Griffin D, Mader T. NebGuide - Beef Cattle Implant Update. Cooperative Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln, 1997: <http://www.ianr.unl.edu/pubs/Beef/g1324.htm>.

Hageleit M, Daxenberger A, Meyer HHD. A sensitive enzyme immunoassay (EIA) for the determination of melengestrol acetate (MGA) in adipose and muscle tissues. Food Additives and Contaminants 2001 (in Druck).

Hageleit M, Daxenberger A, Kraetzel WD, Kettler A, Meyer HHD. Dose-dependent effects of melengestrol acetate (MGA) on plasma levels of estradiol, progesterone and luteinizing hormone in cycling heifers and influences on oestrogen residues in edible tissues. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica 2000;108:847-854.

Henricks DM, Torrence AK. Endogenous estrogens in bovine tissues. Journal of Animal Science 1977;46:652-658.

Henricks DM, Brandt RT, Titgemeyer EC, Milton CT. Serum concentrations of trenbolone-17 $\beta$  and estradiol-17 $\beta$  and performance of heifers treated with trenbolone acetate, melengestrol acetate, or estradiol-17 $\beta$ . Journal of Animal Science 1997;75:2627-2633.

Henricks DM, Edwards RL, Champe KA, Gettys TW, Skelley GC Jr, Gimenez T. Trenbolone, estradiol-17 $\beta$  and estrone levels in plasma and tissues and live weight gains of heifers implanted with trenbolone acetate. Journal of Animal Science 1982;55:1048-1056.

Herr F, Revesz C, Manson AJ, Jewell JB. Biological properties of estrogen sulfates. In: Bernstein S, Solomon S, Hrsg. Chemical and Biological Aspects of Steroid Conjugation. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1970:368-408.

Hoechst Roussel Vet. Revalor<sup>®</sup> - Beef Consumption and Hormone Safety (Revision 3), 1999a: [http://www.hrvet-us.com/Agrivet/Revalor-home.nsf/htmlmedia/implant\\_information.html](http://www.hrvet-us.com/Agrivet/Revalor-home.nsf/htmlmedia/implant_information.html).

Hoechst Roussel Vet. Revalor<sup>®</sup> - Implanting Tips (Revision 2), 1999b: [http://www.hrvet-us.com/Agrivet/Revalor-home.nsf/htmlmedia/implant\\_information.html](http://www.hrvet-us.com/Agrivet/Revalor-home.nsf/htmlmedia/implant_information.html).

Hoffmann B, Oettel G. Radioimmunoassay for free and conjugated trienbolone and for trienbolone acetate in bovine tissue and plasma samples. Steroids 1976;27:509-523.

Hoffmann B, Rattenberger E. Testosterone concentrations in tissues from veal calves, bulls and heifers and in milk-samples. Journal of Animal Science 1977;46:635-641.

Hoffmann B, Schopper D, Karg H. Investigations on the occurrence of non-extractable residues of trienbolone acetate in cattle tissues in respect to their bioavailability and immunological reactivity. Food Additives and Contaminants 1984;1:253-259.

JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 52<sup>nd</sup> Meeting, 2 – 11 February 1999. Summary and conclusions. Rome, 1999.

Kennedy DG, Hewitt SA, McEvoy JDG, Currie JW, Cannavan A, Blynchflower WJ, Elliot CT. Zeranol is formed from *Fusarium spp.* toxins in cattle *in vivo*. Food Additives and Contaminants 1998;15:393-400.

Klein KO, Baron J, Colli MJ, McDonnell DP, Cutler GB Jr. Estrogen levels in childhood determined by a ultrasensitive recombinant cell bioassay. Journal of Clinical Investigation 1994;94:2475-2480.

Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JÅ. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . Endocrinology 1998;139:4252-4263.

Kushinsky S. Safety aspects related to hormonal residues. International Symposium on the Safety Evaluation of Animal Drug Residues. Berlin 1983:7. Zitiert in: Hoffmann B, Evers P. Anabolic Agents with Sex Hormone-Like activities: Problems of Residues. In: Rico AG, Hrsg. Drug Residues in Animals. New York: Academic Press 1986:111-146.

Lange IG, Daxenberger A, Meyer HHD. Hormone contents in peripheral tissues after correct and off-label use of growth promoting hormones in cattle: Effect of the implant preparations Finaplix-H<sup>®</sup>, Ralgro<sup>®</sup>, Synovex-H<sup>®</sup> and Synovex Plus<sup>®</sup>. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica 2001;109:53-65.

Lauderdale JW. Use of MGA<sup>®</sup> (melengestrol acetate). In: Meissonnier E, Mitchell-Vigneron J, Hrsg. Anabolics in Animal Production. Paris: Office International des Epizooties 1983:193-212.

Maume D, Deceuninck Y, Pouponneau K, Paris A, Le Bizec B, André F. Assessment of estradiol and its metabolites in meat. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica 2001;109:32-38.

Meyer HHD. Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica 2001;109:1-8.

Meyer HHD, Rapp M. Reversible binding of the anabolic steroid trenbolone to steroid receptors. Acta endocrinologica 1985;108,Suppl. 267:129.

Meyer HHD, Hoffmann S. Development of a sensitive microtitration plate enzyme-immunoassay for the anabolic steroid trenbolone. Food Additives and Contaminants 1987;4:149-160.

Meyer HHD, Rapp M, Landwehr A. Analytische Erfassung und Bewertung natürlicher Steroidöstrogene im eßbaren Gewebe und in Galle unbehandelter und mit dem Östradiolpräparat "Compudose" behandelter Mastkälber. Archiv für Lebensmittelhygiene 1984a;36:5-8.

Meyer HHD, Landwehr M, Schopper D, Karg H. Application of Synovex-H in veal calves: steroid release and residues. Food Additives and Contaminants 1984b;1:261-275.

Meyer HHD, Rohleder M, Streich WJ, Göltenboth R, Ochs A. Sexualsteroidprofile und Ovaraktivitäten des Pandaweichens Yan Yan im Berliner Zoo. Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift 1997;119:143-147.

Meyer K, Usleber E, Dietrich R, Märtlbauer E, Bauer J. Zearalenone metabolites in bovine bile. Archiv für Lebensmittelhygiene 2001 (eingereicht).

Neumann F. Pharmacological and endocrinological studies on anabolic agents. Anabolic Agents in Animal Production 1975:253-264.

O'Keefe M. Tissues levels of the anabolic agents, trenbolone and zeranol, determined by radioimmunoassay. Proceedings of the Symposium on the Analysis of Steroids, Szeged, Hungary 1984:225-229.

Paris A, Rao, D. Biosynthesis of estradiol-17 $\beta$  fatty acyl esters by microsomes derived from bovine liver and adrenals. Journal of Steroid Biochemistry 1989;33:465-472.

Paris A, Dolo L, Debrauwer L, Rao D. Analysis of [<sup>3</sup>H]estradiol-17beta metabolites in calf perirenal fat. Analyst 1994;119:2623-2626.

Pottier J, Busigny M, Grandadam JA. Plasma kinetics, excretion in milk and tissue levels in the cow following implantation of trenbolone acetate<sup>®</sup>. Journal of Animal Science 1975;41:962-968.

Pottier J, Cousty C, Heitzman RJ, Reynolds IP. Differences in the biotransformation of a 17 $\beta$ -hydroxylated steroid, trenbolone acetate, in rat and cow. Xenobiotica 1981;11:489-500.

Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Origin of germ cell cancer: biological and clinical significance of testicular carcinoma in situ. The Endocrinologist 2000;10:335-340.

Rapp M, Meyer HHD. Analysis of hormone contaminations in milk replacers by high-performance liquid chromatography and immunoassay. Journal of Chromatography Biomedical Applications 1989;489:187-189.

Richardson KE, Hagler WM Jr, Mirocha CJ. Production of zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol, and  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalanol by *Fusarium spp.* in rice culture. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1985;33:862-866.

Ryan JJ, Hoffmann B. Trenbolone acetate: experiences with bound residues in cattle tissues. Journal of the Association of Official Analytical Chemists International 1978;61:1274-1279.

Sauerwein H, Meyer HHD: Androgen and estrogen receptors in bovine skeletal muscle: relation to steroid induced allometric muscle growth. Journal of Animal Science 1989;67:206-212.

Sauerwein H, Meyer HHD, Schams D. Divergent effects of estrogens on the somatotrophic axis in male and female calves. *Journal of Reproduction and Development* 1992;38:271-278.

Schiffer B, Daxenberger A, Meyer K, Meyer HHD. The fate of trenbolone acetate and melengestrol acetate after application as growth promotants in cattle. *Environmental Health Perspectives* 2001 (eingereicht).

Schnorr B. *Embryologie der Haustiere*. Stuttgart: Enke 1989.

Scippo ML, Gaspar P, Degand G, Brose F, Maghuin-Rogister G, Delahaut P, Willemart JP. Control of the illegal administration of natural steroid hormones in urine and tissues of veal calves and in plasma of bulls. *Analytica Chimica Acta* 1993;275:57-74.

Seifert M, Haindl S, Hock B. Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens. *Analytica Chimica Acta* 1999;386:191-199.

Skakkebæk NE, Veeramachaneni DNR, Rajpert-De Meyts E. Persönliche Mitteilung.

Skakkebæk NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Müller J. Carcinoma in situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumors except spermatocytoma. *International Journal of Andrology* 1987;10:19-28.

Smith JL, Wilson LL, Swanson DL. Implant sequence effects in intact male Holstein veal calves: live and slaughter traits. *Journal of Animal Science* 1999;77:3125-3132.

Sonnenschein C, Soto AM. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1998;65:143-150.

Spindler KD. *Vergleichende Endokrinologie*. Stuttgart, New York: Thieme 1997.

Spranger B, Metzler M. Disposition of 17 $\beta$ -trenbolone in humans. *Journal of Chromatography Biomedical Applications* 1991;564:485-492.

Tsukamoto K. The metabolism and conjugation of estrogens in the human fetus. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 1984;60:1091-1111.

Van der Wal P, Berende PLM. Effect of anabolic agents on food producing animals. In: Meissonnier E, Mitchell-Vigneron J, Hrsg. *Anabolics in Animal Production*. Paris: Office International des Epizooties 1983:73-115.

Vazquez-Alcantara MA, Menjivar M, Garcia GA, Diaz-Zagoya JC, Garza-Flores J. Long-acting estrogenic responses of estradiol fatty acid esters. *Journal of Steroid Biochemistry* 1989;33:1111-1118.

Veeramachaneni DNR. Deteriorating trends in male reproduction: idiopathic or environmental? *Animal Reproduction Science* 2000;60-61:121-130.

Veeramachaneni DNR, Sawyer HR. Carcinoma in situ and seminoma in equine testis. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 1998;106:183-186.

Veeramachaneni DNR, Vandewoude S. Interstitial cell tumor and germ cell tumor with carcinoma in situ in rabbit testes. *International Journal of Andrology* 1999;22:97-101.

WHO (World Health Organization). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. *WHO Food Additives Series* 1988;23:73-151.

WHO. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. *WHO Food Additives Series* 1990;25:101-109.

WTO (World Trade Organization). EC measures concerning meat and meat products (hormones). Report of the appellate body 16 January 1998;AB-1997-4: § 187: [http://www.wto.org/english/tratop\\_e/dispu\\_e/distab\\_e.htm](http://www.wto.org/english/tratop_e/dispu_e/distab_e.htm).

## DANKSAGUNG

Prof. Dr. Heinrich H. D. Meyer ermöglichte mir mit der Stellung des Themas die Durchführung der Dissertation. Ihm wie auch Dr. Andreas Daxenberger danke ich für die guten Arbeitsbedingungen, ihre fachlichen Ratschläge und die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Melanie Hageleit, Christine Fochtmann, Dr. Wolf-Dieter Krätzl sowie allen Mitarbeitern der Versuchsstationen Veitshof und Thalhausen, des Hofes der Familie Heigel in Schweitenkirchen wie auch des EU-Schlachthofes der Bayerischen Landesanstalt für Tierzucht Grub sei Dank für ihr Engagement und ihren nicht unerheblichen Anteil am Gelingen der Tierversuche.

Bei Dr. D. N. Rao Veeramachaneni und seinen Mitarbeitern vom Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory der Colorado State University, Fort Collins möchte ich mich für die Durchführung des Kaninchenversuches, die Bereitstellung der Proben und die fachlichen Hilfestellungen bedanken. In diesem Zusammenhang geht auch ein Dank an Dr. Ewa Rajpert-De Meyts vom Department of Growth and Reproduction des Rigshospitalet, Kopenhagen für die gute Kooperation im Rahmen der Studie zur *in utero*-Exposition.

Dr. Karsten Meyer vom Lehrstuhl für Tierhygiene der TU München-Weihenstephan danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der GC-MS-Analysen.

Ein besonderer Dank gebührt auch Inge Celler für ihre Geduld und tatkräftige Mithilfe sowie Waltraud Schmid und Dr. Frank Weber, die durch die Vermittlung ihres methodischen Wissens grundlegenden Anteil am Entstehen dieser Arbeit haben.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Projektes EU B6-7920/98/000008 aus Mitteln der Europäischen Union finanziert.

---

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Geburtsdatum 04.01.1974  
Geburtsort Kronach  
Familienstand ledig

### Ausbildung

1980 – 1984 Grundschule in Kronach  
1984 – 1993 Ausbildung am mathematisch-naturwissenschaftlichen  
Zweig des Kaspar-Zeuß-Gymnasiums Kronach  
1993 Allgemeine Hochschulreife  
Aufnahme in die Wittelsbacher Jubiläumsstiftung  
1993 – 1998 Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-  
Maximilians-Universität München  
1995 Vorexamen  
1997 Zweimonatiges Praktikum an der Bundesanstalt für  
Fleischforschung Kulmbach  
1998 1. Staatsexamen  
1998 – 2001 Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte am Institut für  
Physiologie, TU München-Weihenstephan

---

## PUBLIKATIONEN

### *Originalarbeiten*

Daxenberger A, **Lange IG**, Meyer K, Meyer HHD. Detection of anabolic residues in misplaced implantation sites in cattle. *Journal of AOAC International* 2000;83:809-819.

Daxenberger A, Hageleit M, Kraetzi WD, **Lange IG**, Claus R, Le Bizec B, Meyer HHD. Suppression of androstendione in entire male pigs by anabolic preparations. *Livestock Production Science* 2001;69:139-144.

**Lange IG**, Daxenberger A, Meyer HHD. Hormone contents in peripheral tissues after correct and off-label use of growth promoting hormones in cattle: Effect of the implant preparations Finaplix-H<sup>®</sup>, Ralgro<sup>®</sup>, Synovex-H<sup>®</sup> and Synovex Plus<sup>®</sup>. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2001;109:53-65.

**Lange IG**, Daxenberger A, Meyer HHD. Studies on the immune response of *Lama glama* and on the applicability of its antibodies in immunological tests. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001 (angenommen).

Okuda K, Uenoyama Y, Berisha B, **Lange IG**, Taniguchi H, Kobayashi Shinya, Kobayashi Shu-ichi, Miyamoto A, Schams D. Estradiol-17 $\beta$  as an intraluteal regulator in bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction* 2001 (in Vorbereitung).

Pfaffl M, **Lange IG**, Daxenberger A, Meyer HHD. Influence of an estrogen treatment on the tissue specific expression pattern of estrogen receptor (ER) $\alpha$  and ER $\beta$ : Quantification of ER $\alpha$  and ER $\beta$  mRNA with real-time RT-PCR. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2001;109:345-355.

### **Tagungsbeiträge**

Daxenberger A, **Lange IG**, Meyer K, Meyer HHD. Licensed anabolic preparations in countries outside the EU: hormone residues in off-label injection sites and in eargrounds after multiple application. In: van Ginkel LA, Ruiters A, Hrsg. EuroResidue IV: conference on residues of veterinary drugs in food. Bilthoven: National Institute of Public Health and the Environment (RIVM) 2000:339-343.

Daxenberger A, Hageleit M, **Lange IG**, Claus R, Meyer HHD. Unterdrückung des Geruchstoffes von Ebern durch anabole Steroide. In: Proceedings der 14. Tagung der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, München, 03. – 04.04.2000:V18.

**Lange IG**, Daxenberger A, Meyer HHD. Screening of trenbolone-17 $\beta$  in milk samples after application of trenbolone acetate to a cull cow. In: van Ginkel LA, Ruiters A, Hrsg. EuroResidue IV: conference on residues of veterinary drugs in food. Bilthoven: National Institute of Public Health and the Environment (RIVM) 2000:713-717.

**Lange IG**, Daxenberger A, Meyer HHD. Hormone contents in peripheral tissues after off-label use of the implant preparations Finaplix-H, Ralgro, Synovex-H and Synovex Plus. In: Proceedings of the RH Workshop „Hormones and endocrine disruptors in food and water: possible impact on human health“. Rigshospitalet, Copenhagen University Hospital, 27. – 30.05.2000:41.

Pfaffl MW, **Lange IG**, Daxenberger A, Meyer HHD. Influence of zeranol treatment on the tissue specific co-expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in various tissues: Quantification of ER-alpha and ER-beta mRNA with a real-time RT-PCR. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes 2000;108,Suppl. 1:176.