

## Bestimmung des Ursprunges natürlicher Steroidhormone im Rind

Forschungsbericht über das EU-Projekt ISOSTER vom 24. Juli 2007

Der Einsatz von Hormonen in der Tiermast ist in der EU verboten. Trotzdem werden sie wegen ihrer Muskel aufbauenden und Wachstum fördernden Eigenschaften immer wieder illegal an Nutztiere in der Lebensmittelproduktion verabreicht. Eingesetzt werden sowohl körperfremde als auch körpereigene Hormone, die synthetisch hergestellt werden. Während der Einsatz körperfremder Hormone von den Kontrollbehörden schon lange nachgewiesen werden kann, war das für die Verabreichung synthetisch hergestellter, körpereigener Steroide bislang nicht möglich. Sie konnten nicht von den im Körper vorkommenden, chemisch identischen Hormonen unterschieden werden.

Die Lücke sollte das EU-Forschungsprojekt ISOSTER schließen, das auf Initiative und unter Koordination des BfR über vier Jahre durchgeführt wurde. Neun Partner aus Frankreich, Großbritannien, den Niederlanden und Deutschland beteiligten sich an dem Projekt. Sie kamen sowohl aus den Bereichen der Lebensmittel- als auch aus der Dopingkontrolle. Ein Verfahren, das auf der Isotopenmassenspektrometrie (IRMS) basiert und im Sportdoping bereits Anwendung findet, wurde für den Einsatz in der Lebensmittelkontrolle weiterentwickelt. Die Isotopenzusammensetzung synthetisch hergestellter Hormone unterscheidet sich von der im Körper gebildeter. Beide weisen ein unterschiedliches Verhältnis der Kohlenstoffisotope  $^{13}\text{C}$  und  $^{12}\text{C}$  auf, bei synthetisch hergestellten ist der Anteil an  $^{13}\text{C}$  niedriger. Die im Rahmen von ISOSTER entwickelte Methode eignet sich zum Nachweis verschiedener Steroide im Urin von Rindern und konnte erfolgreich in unterschiedlichen europäischen Laboratorien validiert werden.

### Einführung

Die Verwendung von Steroidhormonen zur Wachstumsförderung bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, ist seit 1988 in der EU verboten (Richtlinie 88/146/EWG). Dagegen ist in einigen Ländern, beispielsweise den Vereinigten Staaten und Kanada, das Mästen von Rindern unter Anwendung von synthetischen oder auch von endogenen Hormonen erlaubt. Die Überwachung des Verbotes in Tieren und Tierprodukten wird durch die Richtlinie 96/23/EC des Rates geregelt. Um das Verbot kontrollieren zu können, sind Methoden zum Nachweis dieser Substanzen und ihrer Rückstände notwendig.

Die illegale Anwendung synthetischer Steroide kann mit GC-MS oder LC-MS/MS Methoden routinemäßig nachgewiesen werden. Dagegen war der Nachweis einer Behandlung mit natürlichen Hormonen bislang nicht möglich, weil keine Methode zur Verfügung stand, die zwischen endogen produzierten und synthetisch hergestellten natürlichen Hormonen unterscheiden kann. Eine neue Herangehensweise ist der Einsatz der Gaschromatographie mit Isotopenmassenspektrometrie (GC-C-IRMS) zur Bestimmung der Herkunft endogener Hormone in Rindern. Die GC-C-IRMS-Methode macht sich die Verschiebung des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Isotopenverhältnisses in Metaboliten der verabreichten Hormone nach deren Verabreichung gegenüber dem unveränderten  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis in den Vorstufen dieser Hormone zu Nutze.

Werden natürliche Hormone verabreicht, wird in den meisten Fällen das Steroidprofil verändert, d.h. dass sich das Konzentrationsverhältnis der verschiedenen Steroide untereinander verändert. Die Änderung des Steroidprofils ist aber bei Rindern von vielen Faktoren abhängig, z.B. von der Rasse und Zucht, dem Geschlecht und Alter der Tiere, der Darreichungs-

form und Art des verabreichten Hormons. Ungewöhnliche und auffällige Steroidprofile wären ein Indiz für eine illegale Behandlung der Tiere, aber nicht ausreichend für den endgültigen Beweis einer Behandlung mit natürlichen Hormonen.

Mit der GC-C-IRMS- werden  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse von einzelnen Verbindungen bestimmt. Dieses Isotopenverhältnis ist hauptsächlich von der Nahrung abhängig, wobei sich die Verteilung des Isotopenverhältnisses in einem Organismus innerhalb enger Grenzen bewegt. Die technische Synthese körpereigener Hormone geht von Soja als Kohlenstoff-Quelle aus, was sich in einem für Sojaprodukte typischen  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis der Syntheseprodukte ausdrückt. Die synthetisch hergestellten Hormone verfügen somit über ein deutlich anderes  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis als die endogenen Hormone.

Die nach Verabreichung eines Hormons gemessenen Änderungen des Isotopenverhältnisses sind daher hauptsächlich von dem verabreichten Hormon abhängig. Zum Nachweis einer Hormonbehandlung wird das Isotopenverhältnis von zwei Verbindungen bestimmt, die des verabreichten Hormons oder seines Metaboliten und das einer Vorstufe. Während sich nach Verabreichung eines Hormons dessen Isotopenverhältnis oder das seiner Metabolite ändert, bleibt das Isotopenverhältnis seiner Vorstufen im Stoffwechsel unverändert. Diese Vorstufe wird auch als endogene Referenzsubstanz bezeichnet, da deren Isotopenverhältnis als Bezug zum verabreichten Hormon innerhalb einer Probe bestimmt wird.

Bestimmt man vor und nach Verabreichung eines synthetisch hergestellten Hormons das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis der Hormone in den Körpergeweben und -flüssigkeiten, wird sich das Isotopenverhältnis in Abhängigkeit von der Menge des verabreichten Hormons und der Menge des natürlicherweise im Tierkörper vorhandenen Hormons ändern. Um die für diese Methode geeigneten Substanzen erfassen zu können, ist die Kenntnis der biosynthetischen Stoffwechselwege von erheblicher Bedeutung.

Das Ziel des EU-Projektes ISOSTER, an dem unter Koordination des BfR neun Labore aus fünf Ländern beteiligt waren, war die Entwicklung von Methoden zum Nachweis einer Behandlung von Rindern mit natürlichen Hormonen. Im Projekt wurden Methoden für verschiedene Matrices entwickelt. Nach Überprüfung dieser Methoden auf ihre Anwendbarkeit wurde die für Rinderurin entwickelte Analysenmethode in einem Ringversuch validiert.

Längerfristiges Ziel des Projektes war es, den in der Lebensmittel-Überwachung tätigen Laboratorien eine Methode zur Verfügung zu stellen, welche den Nachweis der Verabreichung natürlicher Hormone als Wachstumsförderer ermöglicht. Für die Matrices Urin, Faeces, Muskel, Niere und Fett wurden im Projekt Methoden entwickelt. Die hohen Anforderungen der GC-C-IRMS-Methode an die Reinheit der Messlösungen erforderte eine gesonderte Entwicklung der Probenaufreinigungsverfahren für die verschiedenen Matrices.

Folgende Meilensteine mussten bei der Methodenentwicklung erreicht werden:

- Auswahl geeigneter Analyten  
Für jede Matrix sollte zumindest ein Metabolit und eine endogene Referenzsubstanz in ausreichender Konzentration ermittelt und für die zu entwickelnde Methode ausgewählt werden
- Aufreinigung und Konzentration der jeweiligen Analyten  
Die Aufreinigung der Analyten sollte bis zu einem hohen Reinheitsgrad erfolgen – die Analyten sollten in Form von Basislinien-getrennten Peaks in der GC-C-IRMS eluieren –, wobei das Aufarbeitsverfahren keine Isotopendiskriminierung hervorrufen durfte.

- Optimierung der Parameter für die GC-C-IRMS- für die jeweilige Matrix
- Produktion der Probenmaterialien von behandelten und von unbehandelten Tieren
- Überprüfung der Anwendbarkeit der GC-C-IRMS-Methode zur Unterscheidung von behandelten und unbehandelten Tieren.  
Hierzu wurden Versuche mit unbehandelten und mit Hormonen behandelten Tieren unterschiedlichen Alters, Geschlechtes und unterschiedlicher Fütterung, von denen Probenmaterial gewonnen und untersucht wurde, durchgeführt.

### **Entwicklung, Einsatz und Validierung der GC-C-IRMS-Methode zum Nachweis des Ursprungs von Hormonen im Urin von Rindern**

GC-C-IRMS-Methoden zum Nachweis einer Anwendung natürlicher Hormone werden bei Dopingkontrollen im Sport eingesetzt. Eine direkte Übertragung der in der Dopingkontrolle angewendeten Methoden auf die Untersuchung der entsprechenden Matrices beim Rind ist nicht möglich, da sich der Metabolismus der Steroide und auch die Eigenschaften der Matrices beim Menschen deutlich von denen des Rindes unterscheiden. Daneben setzt die Etablierung eines Analysenverfahrens in der offiziellen Lebensmittelüberwachung voraus, dass dieses Verfahren spezielle Kriterien gemäß den EU-Vorschriften erfüllt.

Für die Methodenentwicklung wurden in einem ersten Schritt geeignete Analyten für die GC-C-IRMS-Analyse im Urin von Rindern ausgewählt. Hierzu wurden quantitative Steroidbestimmungen wie auch erste noch ungesicherte Isotopenmessungen von Steroiden in Urinproben von behandelten und unbehandelten Tieren durchgeführt.

Aus diesen Versuchen wurden für die Methodenentwicklung folgende Analyten ausgewählt:

- Etiocholanolone
- DHEA
- 5-Androstene-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol
- 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol
- Epi-Testosteron
- Epi-Androsteron
- 17 $\alpha$ -Estradiol

Eine vorläufige GC-C-IRMS-Methode wurde im Labor eines Projektteilnehmers entwickelt. Bei Einführung dieser Methode in weiteren Laboratorien trat jedoch eine Vielzahl von Schwierigkeiten auf. Hierzu gehörten die Aufreinigung der Extrakte, die niedrige Wiederfindungsrate einiger Analyten, die unvollständige oder zersetzende Hydrolyse der Steroidkonjugate und Probleme bei der Reinigung mit HPLC. Bei den GC-C-IRMS-Messungen wurden Schwierigkeiten bei der für die Gaschromatographie notwendigen Derivatisierung und bei der Basislinientrennung der Analyten beobachtet.

Grundlegende Änderungen in der Probenvorbereitung, bei der Hydrolyse der Steroidkonjugate, der flüssig-flüssig Extraktion, der HPLC-Aufreinigung und der Derivatisierung der Steroide wurden systematisch erarbeitet und in die Methode aufgenommen.

Die endgültige Methode enthält mehrere flüssig-flüssig Extraktionen, die Trennung der Analyten in eine Androgen-, Estrogen- und Androgen-Sulphat-Fraktion, die Hydrolyse der Glucuronid- und Sulphatkonjugate, verschiedene Festphasenextraktionen und zwei HPLC-Aufreinigungsschritte. Vor der gaschromatographischen Trennung werden die Steroide acetyliert. Alle Extrakte müssen zur Überprüfung ihrer Reinheit und zur sicheren Identifizierung

der Analyten mit GC/MS gemessen werden, bevor mittels der GC-C-IRMS- das Isotopenverhältnis der Steroide bestimmt wird.

Die entwickelte Methode wurde in einer zweistufigen Methodvalidierungsstudie gemäß der von der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) herausgegebenen Empfehlungen validiert:

Mehrere europäische Laboratorien, die entweder im Bereich der Dopingkontrolle oder als Behörden in der Lebensmittelüberwachung tätig sind, nahmen an einem Workshop, in dem die Methode vorgestellt wurde, teil. Anschließend wurde nach einem vorher festgelegten Protokoll ein Vorversuch durchgeführt, in dem die Teilnehmer die Methode in ihren Laboren etablierten, eine Kontrollprobe und eine Probe eines behandelten Tieres mit GC-MS und GC-C-IRMS analysierten. Die Auswertung dieses Vorversuches und die Empfehlungen der Ringversuchsteilnehmer führten zu einer letzten Änderung der Methode.

Im Hauptversuch analysierten neun Laboratorien fünf unterschiedliche Proben im Rahmen einer Doppelblindstudie.

Die Auswertung der Daten ergab, dass die von den verschiedenen Laboratorien gemessenen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für DHEA und 5-Androstene- $3\beta, 17\alpha$ -diol als endogene Referenzsubstanzen und Etiocholanolon,  $5\alpha$ -Androstan- $3\beta, 17\alpha$ -diol und  $17\alpha$ -Estradiol als Metabolite vergleichbar und zuverlässig sind.

Damit wurde eine robuste Methode zur Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}$  Werte natürlicher Steroide im Urin von Rindern mit der GC-C-IRMS- entwickelt und validiert.

### **Identifizierung und Quantifizierung der Ziel-Analyten für Muskel, Fett, Niere und Faeces sowie Entwicklung einer GC-C-IRMS-Methode**

Neben der Entwicklung einer Methode zur Bestimmung natürlicher Steroide im Urin wurden Methoden für weitere Matrices entwickelt, um das Spektrum in der Lebensmittelüberwachung zu erweitern. Für Importkontrollen bietet sich die Untersuchung von Muskelgewebe an, während für die Kontrolle in den Schlachthöfen die Matrices Muskel, Niere und Fett erhältlich sind. Für Kontrollen an lebenden Tieren im Stall steht außer Urin auch Faeces zur Verfügung. Um diese Matrices mit der GC-C-IRMS- untersuchen zu können, mussten auch hier umfangreiche Verfahren für die Probenaufreinigung entwickelt werden. Dabei wurden außerordentlich reine und hoch konzentrierte Extrakte gewonnen.

Bezüglich dieser Matrices sind Kenntnisse über den Einfluss einer Verabreichung von natürlichen Hormonen auf das Steroidprofil ebenfalls erforderlich.

Zuerst wurden die Steroide in den verschiedenen Geweben quantifiziert. Muskel- und Nierenproben von behandelten als auch unbehandelten Tieren wurden analysiert. In beiden Geweben konnte kein Steroid in der für die GC-C-IRMS- notwendigen Konzentration nachgewiesen werden.

Die Messergebnisse von Nierenfettproben, die unbehandelten und hormonbehandelten Tieren entnommen waren, zeigten, dass nur Cholesterol und in einigen Proben auch Pregnenolon und Progesteron in ausreichender Konzentration und zudem getrennt von Matrixbestandteilen nachgewiesen werden kann. Im Falle ausreichender Konzentrationen der Analyten stimmten die gemessenen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in den Fettproben sowohl bei Tieren, die mit Mais als

auch mit Gras gefüttert wurden, mit den ermittelten Ergebnissen aus den Urinproben überein.

In den Faecesproben von Rindern ermöglichte die hierfür entwickelte Methode verlässliche und wiederholbare GC-C-IRMS-Messungen ohne Isotopendiskriminierung von Etiocholanolon, DHEA, Progesteron, 17 $\alpha$ -Estradiol und epi-Androsteron. Quantitative Messungen in Proben von unbehandelten und hormonbehandelten Tieren zeigten, dass die Verabreichung von 17 $\beta$ -Estradiol zu einer deutlichen Zunahme der Konzentration seiner Metabolite führte, während die Ergebnisse nach Verabreichung von Progesteron und Testosteron nicht so eindeutig waren.

Da die Konzentrationen der meisten Steroide in allen Geweben für die Analyse mit der GC-C-IRMS- sehr niedrig waren, wurde der Einsatz hoher Mengen Probenmaterial bei entsprechender Aufreinigung ausgetestet. Für eine Ausgangsmenge von 400 g Muskel und 200 g Faeces wurden abgeänderte Methoden entwickelt.

Im Muskel, dem 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Steroidstandard zugesetzt wurde, konnte ohne Isotopendiskriminierung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert mit dieser Methode gemessen werden. Messungen der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von  $\beta$ -Testosteron und 17 $\beta$ -Estradiol in verschiedenen Muskelproben von behandelten und unbehandelten Tieren mit Analytkonzentrationen unter 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sind möglich. Doch ein wesentliches Hindernis wurde sowohl bei Muskel- als auch bei Faecesproben nicht überwunden: die immer noch zu geringe Konzentration aller Steroide, die als endogene Referenzsubstanzen in Frage kommen.

Bei Nieren ist die Aufbereitung größerer Probenmengen keine Option, da das Gewicht einer Niere beim Rind, je nach Alter und Geschlecht der Tiere, nur zwischen 300 und 700 g liegt.

Die Konzentrationen in den verschiedenen Gewebeproben erwiesen sich für die entwickelten Methoden trotz hoher eingesetzter Probenmengen als zu niedrig, um den Anforderungen der GC-C-IRMS- zu entsprechen. Im Falle von Muskel und Faeces konnte keine endogene Referenzsubstanz, und im Fall von Fett kein Metabolit mit ausreichender Konzentration nachgewiesen werden.

Zum Nachweis einer Verabreichung von natürlichen Hormonen wurde außerdem ein statistischer Ansatz überprüft, der eventuell für Screening-Zwecke angewendet werden könnte: Die Konzentrationsprofile von mehr als 20 endogenen Steroiden in sowohl behandelten als auch unbehandelten Nieren- und Muskelproben wurden bestimmt und mittels multivariater Analyse ausgewertet. Diese Vorgehensweise wurde ausgewählt, um Veränderungen des Steroidprofils, die durch die Verabreichung von Steroidhormonen verursacht werden können, zu entdecken und mögliche Kriterien zu etablieren. Die Ergebnisse waren viel versprechend, aber weit mehr Daten sind erforderlich, um eine endgültige Abschätzung dieser Vorgehensweise als Screening-Methode vornehmen zu können.

### **Optimierung der GC-C-IRMS-Parameter**

Für GC-C-IRMS-Messungen ist die Optimierung aller Geräte-Parameter der instrumentellen Anlage, einschließlich des Injektors und der GC-Bedingungen, unerlässlich. Bei Projektbeginn war als Ziel für die Mindestnachweismenge der endogenen Steroide die Messbarkeit von 10 ng Analyt/Injektion vereinbart worden.

Aus diesem Grund wurden verschiedene Injektoren (z.B. split-/splitless Injektor, deRos Injektor und PTV) und verschiedene Säulen unter verschiedenen Bedingungen geprüft. In Zu-

sammenarbeit mit den Geräteherstellern wurden in allen Laboratorien technische Verbesserungen an den IRMS-Geräten vorgenommen. Damit die entwickelte Methode nicht nur in hoch spezialisierten Laboratorien durchgeführt werden kann, sind die für die endgültige Methode gewählten Geräteausstattungen und -parameter ein Kompromiss zwischen optimalen Bedingungen und der in den meisten Laboratorien vorhandenen Standardausstattung.

Die zum Ziel gesetzte Empfindlichkeit von 10 ng Analyt/Injektion wurde mit guter Präzision und Wiederholbarkeit in allen Laboren erreicht.

Durch eine weitere Optimierung der GC-C-IRMS-Parameter unter Anwendung aller technischen Möglichkeiten kann die Empfindlichkeit der Analyse noch erhöht werden.

Hierzu gehören:

- Der Einsatz von PTV-Injektoren, die das Einspritzen von großen Volumina ermöglichen. Hierdurch würde die Menge des Analyten pro Injektion erhöht werden. Nachteil ist, dass auch der Anteil der Matrixbestandteile erhöht würde.
- Weitere Optimierung der Chromatographie

Die notwendige Reinheit der eingespritzten Extrakte ist der limitierende Faktor bei der Analyse mit GC-C-IRMS-.

### **Kenntnisse über den Einfluss der Fütterung und Hormonbehandlung auf die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse der natürlichen Hormone bei Rindern**

Das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis biosynthetisch erzeugter Moleküle ist abhängig von dem  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis in der Nahrung. Dieses wird durch die in der Nahrung vorkommenden Pflanzen und deren jeweiligen Photosynthesewegen zur Synthese von organischen Verbindungen aus Kohlendioxid bestimmt. Pflanzen mit einem  $\text{C}_3$ -Photosyntheseweg zeigen charakteristische Unterschiede beim  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis zu den Pflanzen mit einem  $\text{C}_4$ -Photosyntheseweg. Daher ist das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis der endogenen Hormone im Tier von der Fütterung abhängig. Diese besteht meistens aus einer Mischung von  $\text{C}_3$ - (z.B. Gras) und  $\text{C}_4$ - (z.B. Mais) Pflanzen.

Um eine bessere Kenntnis über den Einfluss der Fütterung auf das Isotopenverhältnis und über die Verschiebung des Isotopenverhältnisses während einer Umstellung der Futterzusammensetzung zu erhalten, wurden Tiere unter strenger Kontrolle des Isotopenverhältnisses des Futters aufgezogen. Durch diese Versuche sollten die  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse der endogenen Steroide und ihre natürlichen Schwankungen unter verschiedenen Futterbedingungen bestimmt werden.

Werden synthetisch hergestellte natürliche Steroide, die aus einer Kohlenstoffquelle (Soja, eine  $\text{C}_3$ -Pflanze) produziert werden, verabreicht, ändert sich das Isotopenverhältnis im Organismus.

Ein erster Tierversuch mit 13 Rindern unterschiedlichen Geschlechts und Alters wurde durchgeführt. Der Einfluss von zwei verschiedenen Fütterungen und der Injektion von Hormonen auf das Isotopenverhältnis wurde untersucht. Die Steroide im Urin wurden quantifiziert und die Isotopenverhältnisse mit der GC-C-IRMS-Methode bestimmt.

Die Analyse der gesammelten Urinproben von unbehandelten Tieren ergab eine gute Übereinstimmung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der endogenen Referenzsubstanz DHEA mit dem Metaboliten

Etiocholanolon, auch zwischen den Laboratorien. Epi-Testosteron ist wegen seiner sehr niedrigen Konzentrationen selbst bei hormonbehandelten Tieren als Ziel-Analyt ungeeignet. Weitere zum Nachweis der Testosteronbehandlung ausgewählte Analyten, sowohl die Vorstufen als auch die Metabolite, wurden im Urin aller Rinder in ausreichender Konzentration nachgewiesen. Der für den Nachweis der Behandlung mit  $17\beta$ -Estradiol ausgewählte Analyt  $17\alpha$ -Estradiol konnte bei unbehandelten Tieren in Spuren nur bei einigen erwachsenen Kühen nachgewiesen werden. In ausreichender Form liegt  $17\alpha$ -Estradiol erst nach einer Behandlung vor.

Futter hatte einen starken Einfluss auf die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte aller Analyten, während die Differenz zwischen den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten der endogenen Referenzsubstanz und des Metaboliten durch das Futter oder Geschlecht der Tiere nicht beeinflusst wurde. Nach Hormongabe wurde die Differenz zwischen den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten der endogenen Referenzsubstanz und der Metabolite sowohl bei Fütterung mit Mais als auch mit Gras signifikant größer. Die Unterschiede bei maisgefütterten Tieren und Tieren mit einer geringen endogenen Hormonproduktion sind deutlicher.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde ein zweiter Tierversuch geplant und durchgeführt.

Von 50 unbehandelten Tieren unterschiedlichen Alters, männlichen und teilweise trächtigen weiblichen Tieren wurde der Urin an zwei Zeitpunkten gesammelt. Auch diese Tiere wurden unterschiedlich gefüttert. Die Proben wurden mit der entwickelten GC-C-IRMS-Methode gemessen.

Zehn junge weibliche Tiere, hauptsächlich mit Gras gefüttert, und sieben männliche Tiere, hauptsächlich mit Mais gefüttert, wurden sowohl mit Testosteron als auch mit  $17\beta$ -Estradiol behandelt. Urinproben wurden von diesen Tieren zwischen 4 und 21 Tagen nach Behandlung an vier Zeitpunkten gesammelt und deren  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte gemessen.

Die Ergebnisse dieses Versuches waren entsprechend den gewählten Versuchsbedingungen weniger ausgeprägt als die des Vorversuchs. In allen Tieren des Vorversuchs konnte die Behandlung mit Hilfe der GC-C-IRMS-Methode nachgewiesen werden. Hier waren die Differenzen zwischen den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten der endogenen Referenzsubstanzen und den Metaboliten bei den behandelten Tieren signifikant von den unbehandelten Tieren zu unterscheiden.

## Zusammenfassung

Die Anwendbarkeit der GC-C-IRMS-Methode zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse einzelner Substanzen in biologischen Matrices wurde im Projekt demonstriert.

Die entwickelte GC-C-IRMS-Methode zur Messung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Steroiden in Rinderurin ist robust und wurde erfolgreich in einer Methodvalidierungsstudie mit unterschiedlichen Laboratorien in Europa validiert. Differenzen der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte verschiedener Steroide im Urin von Rindern können zuverlässig bestimmt werden.

Der Urin von unbehandelten und mit Steroidhormonen behandelten Rindern wurde untersucht. Die bei Behandlung von Rindern mit endogenen Steroidhormonen auftretenden Verschiebungen der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Steroid-Metaboliten im Vergleich zu einem unveränderten  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der endogenen Referenzsubstanz wurden ausgewertet. Größere Differenzen zwi-

schen den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des verabreichten Hormons und seiner Metabolite und den endogenen Referenzsubstanzen sind ein Hinweis auf eine Behandlung dieser Tiere mit Hormonen.

Bei anderen Matrixproben als Urin war die nachgewiesene Konzentration der untersuchten Steroide für eine Analyse mit der GC-C-IRMS- bei weitem zu niedrig. Auch der Einsatz größerer Probenmengen konnte dieses Problem nicht lösen. Deswegen wurde die Konzentration einer Vielzahl von endogenen Steroiden in Niere und Muskel, die sowohl von behandelten als auch von unbehandelten Tieren gewonnen wurden, mit GC-MS/MS bestimmt und mittels multivariater Analyse statistisch ausgewertet. Hierbei zeigte sich, dass behandelte Tiere in einigen Parametern von unbehandelten unterschieden werden können. Weitere Daten sind notwendig, um zu entscheiden, ob dieser Ansatz als Screening-Methode zum Nachweis einer Behandlung von Rindern geeignet ist und der Lebensmittelüberwachung zur Verfügung gestellt werden kann.

Um die entwickelte Methode für den Nachweis einer Anwendung von endogenen Steroidhormonen in der Rinderhaltung routinemäßig einsetzen zu können, sind weitere Untersuchungen wünschenswert:

- Erforschung der genauen Wege des Stoffwechsels der Steroide bei Rindern in Abhängigkeit vom Alter, der Zucht, dem Geschlecht und der Behandlung
- Untersuchungen zur möglichen biologischen Isotopendiskriminierung während des Metabolismus
- Einbeziehung weiterer Steroide und anderer Gewebe in die Methode
- Verbesserung der GC-C-IRMS-Gerätebedingungen zur Steigerung der Empfindlichkeit sowie die Injektion größerer Probenvolumina

## Literatur

BfR, Pressemitteilung vom 20.07.2007 „Doping“ im Stall deutlich erschwert,  
<http://www.bfr.bund.de/cd/9715>

BgVV, EU-Forschungsprojekt: Determination of the Origin of Hormones in Cattle by Isotope Ratio Mass Spectrometry – ISOSTER, 2002,  
[http://www.bfr.bund.de/cm/220/forschung\\_eu\\_hormons\\_cattle.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/220/forschung_eu_hormons_cattle.pdf)

Buisson,C.; Hebestreit,M.; Weigert,A.P.; Heinrich,K.; Fry,H.; Flenker,U.; Banneke,S.; Prevost,S.; Andre,F.; Schaenzer,W.; Houghton,E.; Le Bizec,B., Application of stable carbon isotope analysis to the detection of 17 beta-estradiol administration to cattle, *Journal of Chromatography A*, 1093, 69-80, 2005

Hebestreit,M.; Flenker,U.; Buisson,C.; Andre,F.; Le Bizec,B.; Fry,H.; Lang,M.; Preiß-Weigert,A.; Heinrich,K.; Hird,S.; Schanzer,W., Application of stable carbon isotope analysis to the detection of testosterone administration to cattle, *J Agric Food Chem* 54, 2850-2858, 2006