

Aus dem Institut für Biochemie  
der Deutschen Sporthochschule Köln  
Geschäftsführender Leiter: Prof. Dr. Wilhelm Schänzer

# Quantitative Bestimmung von 19-Norsteroiden nach peroraler und sublingualer Applikation von Norandrostendion und Norandrostendiol

Eine klinische Studie zum Metabolismus  
von Nandrolon-Prohormonen

von der Deutschen Sporthochschule Köln  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Sportwissenschaft  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
Yvonne Schrader  
aus Köln

Köln 2007

Erster Referent:	Prof. Dr. W. Schänzer
Zweiter Referent:	Prof. Dr. M. Thevis
Vorsitzende des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. I. Hartmann-Tews
Tag der mündlichen Prüfung:	10.07.2007

Hierdurch versichere ich: Ich habe diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und technischen Hilfen angefertigt; sie hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen. Wörtlich übernommene Textstellen, auch Einzelsätze oder Teile davon, sind als Zitate kenntlich gemacht worden.  
Weiterhin erkläre ich, dass ich die ‚Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis‘ der Deutschen Sporthochschule Köln in der aktuellen Fassung eingehalten habe.

## DANK

mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schänzer für die interessante Aufgabenstellung und für die Unterstützung während dieser Arbeit.

Prof. Dr. Petra Platen danke ich für die Übernahme der ärztlichen Aufgaben während der Durchführung der klinischen Studie.

Besonders erwähnen möchte ich Dr. Hans Geyer und Prof. Dr. Mario Thevis, die mich mit hilfreicher Motivation und wissenschaftlichen Beistand jederzeit unterstützt haben.

Außerdem gilt mein Dank natürlich allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Biochemie für die gute Zusammenarbeit und die familienfreundliche Atmosphäre.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturbesprechung</b> .....	<b>3</b>
	<b>2.1 Testosteron</b> .....	<b>3</b>
	2.1.1 Chemische Struktur.....	3
	2.1.2 Physiologische Eigenschaften.....	4
	2.1.3 Biosynthese.....	6
	2.1.4 Metabolismus.....	8
	2.1.5 Anwendung von Testosteron als Arzneimittel.....	12
	<b>2.2 Nandrolon</b> .....	<b>14</b>
	2.2.1 Chemische Struktur.....	14
	2.2.2 Pharmakologische Eigenschaften.....	14
	2.2.3 Metabolismus.....	14
	2.2.4 Anwendung als Arzneimittel.....	16
	2.2.5 Nandrolon als Dopingsubstanz.....	19
	<b>2.3 Prohormone</b> .....	<b>21</b>
	2.3.1 Prohormone von Testosteron.....	22
	2.3.2 Prohormone von Nandrolon.....	22
	2.3.3 Applikationsarten.....	25
<b>3</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>28</b>
	<b>3.1 Steroide</b> .....	<b>28</b>
	3.1.1 Analyten.....	28
	3.1.2 Interne Standards.....	28
	3.1.3 Charakterisierung mittels GC/MS-Analyse.....	31
	<b>3.2 Prohormon-Präparate</b> .....	<b>31</b>
	3.2.1 Überprüfung mittels GC/MS-Analyse.....	31
	<b>3.3 Klinische Studie</b> .....	<b>33</b>
	3.3.1 Gesetzliche, ethische und administrative Regelungen.....	33
	3.3.2 Probanden.....	34
	3.3.3 Studiendesign.....	35
	<b>3.4 Probenaufbereitung</b> .....	<b>37</b>
	3.4.1 Reagenzien.....	37
	3.4.2 Aufarbeitung der Plasmaproben.....	37
	3.4.3 GC/MS-Bestimmung.....	40
	3.4.4 Quantifizierung der Analyten.....	41

<b>3.5 Validierung der analytischen Methode</b> .....	<b>42</b>
3.5.1 Arbeitsbereiche.....	44
3.5.2 Linearität .....	44
3.5.3 Nachweisgrenze .....	45
3.5.4 Bestimmungsgrenze.....	45
3.5.5 Richtigkeit und Präzision .....	45
3.5.6 Wiederfindung.....	46
<b>3.6 Pharmakokinetische Auswertung</b> .....	<b>47</b>
<b>3.7 Statistische Auswertung</b> .....	<b>47</b>
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1 Analytik der Referenzverbindungen</b> .....	<b>49</b>
<b>4.2 Überprüfung der Prohormon-Präparate</b> .....	<b>54</b>
<b>4.3 GC/MS-Bestimmung der Analyten nach Probenaufarbeitung</b> .....	<b>56</b>
<b>4.4 Validierung der analytischen Methode</b> .....	<b>59</b>
4.4.1 Linearität .....	59
4.4.2 Nachweisgrenze .....	61
4.4.3 Bestimmungsgrenze.....	62
4.4.4 Richtigkeit und Präzision .....	63
4.4.5 Wiederfindung.....	65
<b>4.5 Plasmakonzentrationen der untersuchten Norsteroidoide nach Applikation der Prohormon-Präparate</b> .....	<b>66</b>
4.5.1 Orale Applikation von 100 mg Norandrostendion.....	67
4.5.2 Sublinguale Applikation von 25 mg Norandrostendion .....	71
4.5.3 Orale Applikation von 100 mg Norandrostendiol.....	75
4.5.4 Sublinguale Applikation von 25 mg Norandrostendiol .....	80
<b>4.6 Betrachtung einer möglichen hormonellen Aktivität durch aktives Nandrolon</b> .....	<b>84</b>
<b>4.7 Pharmakokinetik und Statistik</b> .....	<b>86</b>
4.7.1 Vergleich zwischen oraler und sublingualer Applikation von Norandrostendion.....	90
4.7.2 Vergleich zwischen oraler und sublingualer Applikation von Norandrostendiol.....	90
<b>5 Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>92</b>
<b>6 Anhang</b> .....	<b>95</b>
<b>6.1 Tabellarische Auflistung aller Plasmakonzentrationen</b> .....	<b>95</b>
<b>6.2 Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>107</b>
<b>6.3 Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>110</b>
<b>6.4 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>112</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
α	alpha
AAS	anabol androgene Steroide
AMG	Arzneimittelgesetz
AR	Androgenrezeptor
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve ( <i>area under the curve</i> )
β	beta
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
$C_{max}$	Spitzenkonzentration im Plasma
CV	Variationskoeffizient
CYP	Cytochrom P450
Δ	delta-
Da	Dalton
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DSHES	Dietary Supplement Health and Education Act
E. coli	Escherichia coli
EI	Elektronenstoßionisation
eV	Elektronenvolt
FAD	US amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GC	Gas-Chromatograph
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	Stunden
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
<i>i. m.</i>	intramuskulär
IOC	Internationales Olympisches Komitee
IStd	Interner Standard
KOH	Kaliumhydroxid
Kps	Kapsel
LH	Luteinisierendes Hormon

LLOQ	Bestimmungsgrenze ( <i>lower limit of quantification</i> )
LOD	Nachweisgrenze ( <i>limit of detection</i> )
m/z	Masse/Ladung
M <sup>+</sup>	Molekülion
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometer
MSTFA	N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoroacetamid
MW	Mittelwert
M <sub>w</sub>	Molekulargewicht
NA	Norandrosteron
NaOH	Natriumhydroxid
ND	Norandrostendion
NDiol	Norandrostendiol
NE	Noretiocholanolon
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
ng	Nanogramm
NL	Nandrolon
NL <sub>unc</sub>	unkonjugiertes Nandrolon
nM	Nanomol
SD	Standardabweichung
SHBG	Sexualhormon bindendes Globulin
SIM	Selected Ion Monitoring
Subl	Sublingualtablette
t	Zeit
<i>t</i> <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
TBME	tertiär-Butylmethylether
<i>t</i> <sub>max</sub>	Zeitpunkt der Spitzenkonzentration im Plasma
TMS	Trimethylsilyl
TMSOH	Trimethylsilanol
V	Proband ( <i>volunteer</i> )
WADA	Welt Anti-Doping Agentur

## 1 Einleitung

Seit 1996 werden auf dem amerikanischen Nahrungsergänzungsmittelmarkt so genannte Prohormone verkauft. Prohormone stellen Hormon-Vorstufen dar, die – laut Werbeaussagen der Hersteller – durch Enzyme des menschlichen Stoffwechsels in ihre eigentliche Wirkform umgewandelt werden sollen. Zu den populärsten Vertretern zählen Prohormone des männlichen Sexualhormons Testosteron und des synthetischen Anabolikums Nandrolon. Sie werden vorwiegend von Sportlern mit dem Ziel des Kraftzuwachses und einer Steigerung der sportlichen Leistungsfähigkeit konsumiert. Da Prohormone in den USA als Nahrungsergänzungsmittel eingestuft werden, war das In-Verkehr-Bringen ohne wissenschaftliche Erkenntnisse über die Wirksamkeit und die Sicherheit dieser Präparate bis zum Inkrafttreten eines neuen Gesetzes im Jahr 2005 möglich.

Während dieser Zeit erfreuten sich die Nandrolon-Prohormone Norandrosteron (ND) und Norandrosteron-3- $\alpha$ -Diol (NDiol) besonderer Beliebtheit. Wissenschaftliche Daten über deren Verstoffwechslung existierten jedoch kaum. Mit Norandrosteron wurde lediglich ein Stoffwechselprodukt identifiziert, das nach Einnahme von ND mit dem Urin ausgeschieden wird (1). Die Anwesenheit von Norandrosteron im Urin von Sportlern diente in der Dopinganalytik bis dahin ausschließlich als Beweis für einen Nandrolon-Missbrauch. Anhand des analytischen Ergebnisses aus den Urinproben lässt sich seit dem nicht eindeutig sagen, ob Nandrolon selber oder dessen Prohormone konsumiert wurden. Da ND und NDiol bereits 1999 auf Dopingliste des Internationalen Olympischen Komitees (IOC) gesetzt wurden, gilt die Anwesenheit von Norandrosteron im Urin von Athleten – unter Berücksichtigung bestehender Grenzwerte – unabhängig von dem eingenommenen Hormon als ein Verstoß gegen das Dopingreglement.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, innerhalb einer klinischen Studie wissenschaftliche Daten über den *in vivo* Metabolismus von ND und NDiol zu erheben. Dabei wurden acht männlichen Probanden ND- und NDiol-haltige Nahrungsergänzungsmittel verabreicht. Das Hauptinteresse lag darin, anhand von Blutuntersuchungen das tatsächliche Ausmaß der Umwandlung der Prohormone zu pharmakologisch aktivem Nandrolon zu untersuchen. Im Gegensatz zu Urinuntersuchungen erlaubt die Blutanalyse die Identifizierung sowohl des

applizierten Prohormons als auch kurzlebiger Zwischenprodukte des Stoffwechsels, unter denen das interessierende Nandrolon vermutet wurde.

Des Weiteren sollten die Hauptmetaboliten Norandrosteron und Noretiocholanolon in einem Zeitraum von acht Stunden nach Prohormongabe quantifiziert werden. Um Erkenntnisse über den Einfluss der Arzneiform zu erlangen, wurden die Prohormone jeweils in Form von Kapseln und Sublingualtabletten verabreicht.

## 2 Literaturbesprechung

Im folgenden Kapitel soll anhand der Leitstruktur von Testosteron die Bedeutung von anabol androgenen Steroiden (AAS, Anabolika) im menschlichen Körper sowie der Metabolismus und die Anwendung als Arzneimittel dargestellt werden. Von besonderem Interesse ist die Vorstellung des synthetischen Steroids Nandrolon, das neben seiner Bedeutung als Arzneistoff große Beliebtheit zur unerlaubten Leistungssteigerung in der Sportlerszene erlangt hat. Um der Illegalität des Anabolika-Schwarzmarktes zu entgehen, wurden in den vergangenen Jahren so genannte Prohormone von Testosteron und Nandrolon auf den US amerikanischen Nahrungsergänzungsmittelmarkt eingeführt. Nachfolgend werden bisherige Kenntnisse zu diesen Produkten erläutert, die bis zum Jahre 2005 legal erhältlich waren und große Verbreitung gefunden hatten.

### 2.1 Testosteron

#### 2.1.1 Chemische Struktur

Testosteron zählt zur Wirkstoffgruppe der Steroide. Dieser Verbindungsklasse liegt das Vierringsystem Perhydrocyclopentanophenanthren zugrunde, das aus 17 Kohlenstoffatomen besteht ( $C_{17}$ ) und dessen Ringe mit A–D bezeichnet werden (Abbildung 1a). Testosteron leitet sich vom Androstan-Grundgerüst ab, das an  $C_{10}$  und  $C_{13}$  jeweils eine weitere Methylgruppe in beta-Position trägt, und somit, wie alle natürlichen Androgene, ein  $C_{19}$ -Steroid darstellt. Des Weiteren besitzt Testosteron eine 3-Keto-4-en-Struktur und eine  $17\beta$ -Hydroxyfunktion (Abbildung 1b).

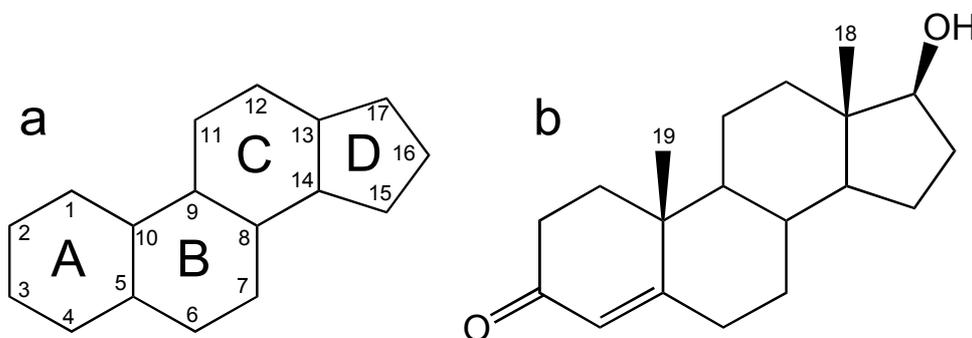


Abbildung 1: a: Perhydrocyclopentanophenanthren mit 17 Kohlenstoffatomen und den Ringen A–D; b: Strukturformel von Testosteron ( $M_w = 288$ )

### 2.1.2 Physiologische Eigenschaften

Androgene sind hauptverantwortlich für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der männlichen Geschlechtsmerkmale. Testosteron ist das wichtigste männliche Sexualhormon. Es wird beim Mann in den Leydigischen Zwischenzellen der Hoden gebildet (2). Die Androgenproduktion bei Mann und Frau erfolgt des Weiteren in der Zona reticularis der Nebennierenrinde und bei der Frau auch in den Theca- und Stromazellen während der proliferativen Phase des Menstruationszyklus. Während der Menopause ist das Ovar die wichtigste Androgenquelle der Frau (3).

Die tägliche Testosteron-Produktion beim geschlechtsreifen Mann beträgt zwischen 5 und 10 mg. Es wird zu 95% in den Hoden und nur zu 5% in der Nebennierenrinde gebildet (4). In einigen Erfolgsorganen, z. B. den äußeren Geschlechtsorganen und der Prostata – nicht jedoch in Muskulatur und Knochen – wird Testosteron durch Dihydrierung in  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. In diesen Geweben stellt DHT, das eine deutlich höhere Affinität zum Androgenrezeptor besitzt als Testosteron, die Wirkform dar (5, 6).

Testosteron ist maßgeblich an der Entwicklung der inneren und äußeren männlichen Genitalien beteiligt (Hoden, Nebenhoden, Penis, Prostata, Samenblase). Es reguliert – zusammen mit dem Follikelstimulierenden Hormon (FSH) – die Bildung von Samenzellen in den Samenkanälchen des Hodens (Spermatogenese) sowie deren Reifung im Nebenhoden (Spermiogenese). Als sekundäre Geschlechtsmerkmale unterliegen außerdem Kopf- und Körperbehaarung, Talgdrüsensekretion und Stimmtiefe dem Einfluss von Testosteron. Des Weiteren wird das Sexual- und Aggressionsverhalten geprägt (7). Diese Effekte repräsentieren die androgene Wirkkomponente des Testosterons. Darüber hinaus werden dem Testosteron folgende anabole Eigenschaften zugeschrieben: Vermehrung der Skelettmuskelmasse, die mit einer positiven Bilanz für Stickstoff sowie verschiedener Elektrolyte einhergeht, verstärkte Calcium-Aufnahme der Knochen, Stimulierung der Erythropoese, prozentuale Abnahme des Körperfettes und Kontrolle der Körperfettverteilung (8-11). Studien mit hypogonadalen Männern zeigen eine Zunahme der fettfreie Körpermasse (*lean body mass*, LBM) nach Substitution mit Testosteron in physiologischer Dosierung (12, 13). Bei eugonadalen Männern konnte durch supraphysiologische Dosen von Testosteron ebenfalls diese anabole Wirkung festgestellt werden (14).

Die Regulation der Testosteron-Sekretion wird durch das übergeordnete Hypothalamus-Hypophysen-System gesteuert, das die Verbindung zwischen dem Zentralen Nervensystem und dem Endokrinum darstellt. Dabei wird aus dem Hypothalamus pulsatil das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) abgegeben, welches im Hypophysenvorderlappen die Ausschüttung des Luteinisierenden Hormons (LH) und des FSH stimuliert. Dabei vermittelt LH eine vermehrte Testosteron-Produktion in den Leydig-Zwischenzellen, FSH stimuliert die Spermatogenese. Beide so genannten glandotropen Hormone und auch das Testosteron selber regulieren die GnRH-Sekretion über den Mechanismus der negativen Rückkopplung (11).

Der Transport der Androgenvorstufen und Androgene im Blut erfolgt durch die Bindung an verschiedene Proteine. Nur etwa 0,5–4% des zirkulierenden Testosterons liegen frei vor, ca. 30 % sind an Albumin gebunden. Die Summe des freien und des schwach an Albumin-gebundenen Testosterons stellt das bioverfügbare Testosteron dar (10). Das Sexualhormon bindende Globulin (SHBG) ist ein Glycoprotein, das verschiedene Sexualhormone wie Testosteron und DHT zu etwa 60 % bindet (15). Durch diese Komplexierungen wird sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die Metabolisierungsrate beeinflusst.

### *Wirkungsvermittlung*

Die Wirkung der Androgene ist weitestgehend an das Vorhandensein des Androgenrezeptors (AR) gebunden, der als Transkriptionsfaktor die Genexpression und die Proteinsynthese steuert (16). Der AR ist ein homodimerer nukleärer Rezeptor, den die Androgene durch Diffusion durch die Zell- und Kernmembran erreichen, und der in vielen verschiedenen Geweben nachweisbar ist (Prostata, Samenblase, externe Genitalien, Haut, Hoden, Knorpel, Talgdrüsen, Haarfollikel, Schweißdrüsen, Herzmuskel, Skelettmuskulatur, glatte Muskulatur, Nebennierenrinde, Leber, Gehirn). Diskutiert wird neben der genomischen auch die nicht-genomische Wirkungsvermittlung von Androgenen über eine Regulierung von Rezeptorproteinen, die im Cytoplasma oder Zellmembran-gebunden vorliegen. So werden z. B. Ionenkanäle moduliert und durch einen so verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Endothelzellen ein vasodilatatorischer Effekte erreicht (17). Nicht-genomische Steroidwirkungen sind schneller in der Wirkungsvermittlung (Sekunden bis Minuten), unabhängig von der RNA- und Proteinsynthese, haben keinen Einfluss auf den Zellkern und können aufgrund der unterschiedlichen steroidal Spezifität des Rezeptors nicht durch klassische Antagonisten blockiert werden (2).

### 2.1.3 Biosynthese

Die Biosynthese von Testosteron wird über einen Regelkreis vom Hypothalamus gesteuert. Die Bildung erfolgt durch ein komplexes kaskadenartiges System von Enzymen ausgehend vom Cholesterol (Abbildung 2), das entweder *de novo* aus Acetat synthetisiert wird oder aus der Nahrung stammt (2). Die an der Testosteron-Biosynthese beteiligten Enzyme lassen sich dabei in zwei Hauptgruppen einteilen: Hämproteine der Cytochrom P450-Familie (CYP) und Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD) (18). In den Mitochondrien der Leydig-Zellen wird in einem ersten Schritt durch das membrangebundene Enzym CYP11A (P450<sub>scc</sub>) die Abspaltung der Seitenkette an C<sub>20</sub> des Cholesterols katalysiert. Hydroxylierungen an C<sub>22</sub> und nachfolgend an C<sub>20</sub> führen zu 20,22-Dihydroxycholesterol, wobei nach Spaltung zwischen C<sub>22</sub> und C<sub>20</sub> das C<sub>21</sub>-Steroid Pregnenolon entsteht. Pregnenolon ist biologisch inaktiv. Die weitere Verstoffwechselung findet im glatten Endoplasmatischen Retikulum statt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Umsetzung von Pregnenolon zu Testosteron. In den humanen Testes dominiert der so genannte  $\Delta^5$ -Syntheseweg. Hier katalysiert CYP17 (P450<sub>c17</sub>) in einer zweistufigen Reaktion erst die Hydroxylierung von Pregnenolon zum intermediären 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron. Anschließend erfolgt die Spaltung der Bindung zwischen C<sub>17</sub>-C<sub>20</sub>, die die Entstehung des C<sub>19</sub>-Steroids Dehydroepiandrosteron (DHEA) zur Folge hat. Dieses 17-Ketosteroid wird durch die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17HSD) zum Androstendiol (Androst-5-en-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) umgesetzt (19). Möglich ist auch eine initiale Umsetzung von Pregnenolon durch die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -Isomerase (3 $\beta$ HSD). Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxysteroiden zu  $\Delta^4$ -3-Ketosteroiden (20). So werden mit dem so entstehende Progesteron im analogen  $\Delta^4$ -Syntheseweg die entsprechenden Zwischenstufen bis hin zum Testosteron durchlaufen. Des Weiteren können auch Intermediärprodukte des  $\Delta^4$ -Synthesewegs durch die 3 $\beta$ HSD umgesetzt und somit in diesen parallelen Syntheseweg eingeschleust werden.

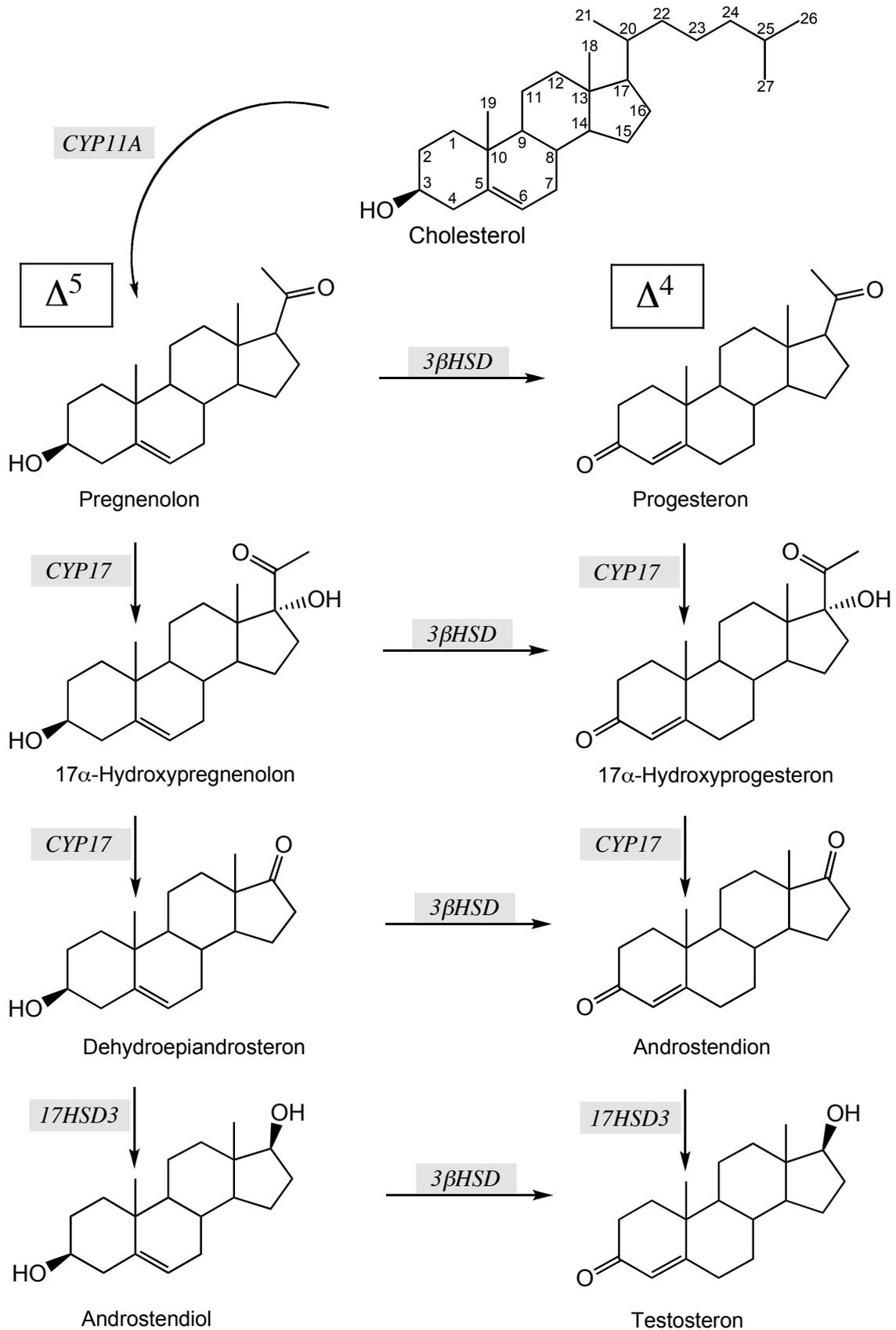


Abbildung 2: Biosynthese des Testosterons

### 2.1.4 Metabolismus

Unter Metabolismus versteht man alle chemischen Prozesse, die zu einer Änderung der chemischen Struktur von endogenen Verbindungen oder Arzneistoffen im Organismus führen, um deren Ausscheidung aus dem Körper zu ermöglichen bzw. zu verbessern. Besonders lipophile und unpolare Eigenschaften von Substanzen erschweren die Elimination über die Ausscheidungsorgane. Deshalb entstehen in so genannten Funktionalisierungsreaktionen (Phase-I-Reaktionen) durch Oxidationen, Reduktionen oder Hydroxylierungen Primärmetaboliten, die hydrophiler als die Muttersubstanz (engl. *parent compound*) sind. Prinzipiell können bereits diese Metaboliten weniger wirksam oder unwirksam sein; möglich sind jedoch auch Wirksamkeitssteigerungen oder das Auftreten von anderen Wirkungen im Vergleich zur Ausgangsverbindung. Des Weiteren gibt es Arzneistoffe, die erst durch Biotransformation in die eigentliche Wirkform überführt werden (Prinzip der Prodrugs). In Phase-II-Reaktionen finden Konjugationsreaktionen statt. Hier werden endogene polare Moleküle an die z. B. in Phase I funktionalisierten Gruppen kovalent gekoppelt. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um Glucuronidierungen, Sulfatierungen, Acetylierungen und Kopplungen mit Glutathion. Auch hier entstehen wieder Metaboliten, die hydrophiler als die Muttersubstanz bzw. deren Primärmetaboliten sind. Glucuronide und Sulfate zeigen eine besonders ausgeprägte Polarität, da sie bei physiologischen pH-Werten ionisiert vorliegen (21).

#### *Phase-I-Metabolismus von Testosteron*

Reaktionen im Phase-I-Metabolismus von Testosteron werden vorwiegend durch die Enzyme 5 $\alpha$ /5 $\beta$ -Reduktase, 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 $\alpha$ HSD) und 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (17HSD) katalysiert. Diese Umsetzungen finden hauptsächlich in der Leber statt. Die Reduktion der  $\Delta^4$ -Doppelbindung im A-Ring des Testosterons durch die 5 $\alpha$ - bzw. 5 $\beta$ -Reduktase führt zur Entstehung der Isomere 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) bzw. 5 $\beta$ -Dihydrotestosteron (5 $\beta$ -DHT). Diese Dihydrierung ist nicht reversibel. Das DHT bindet deutlich stärker an den Androgenrezeptor als Testosteron und stellt z. B. in der Prostata die eigentliche Wirkform dar. Im Anschluss an die Reduktion der  $\Delta^4$ -Doppelbindung folgt die Reduktion der 3-Keto-Struktur. Die 3 $\alpha$ HSD katalysiert dabei die Reaktion zu 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (5 $\alpha$ -Androstandiol) und 5 $\beta$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (5 $\beta$ -Androstandiol). Eine Umsetzung zu den 3 $\beta$ -Isomeren findet nur wenig (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) oder gar nicht

(5 $\beta$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) statt. Im D-Ring kommt es zu einer Oxidation der 17 $\beta$ -Hydroxyfunktion. Diese Reaktion wird durch die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (17HSD2) katalysiert. Die entstehenden Verbindungen 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on (Androsteron) und 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-on (Etiocholanolon) stellen die Hauptmetaboliten des Phase-I-Metabolismus von Testosteron dar (Abbildung 3) (22).

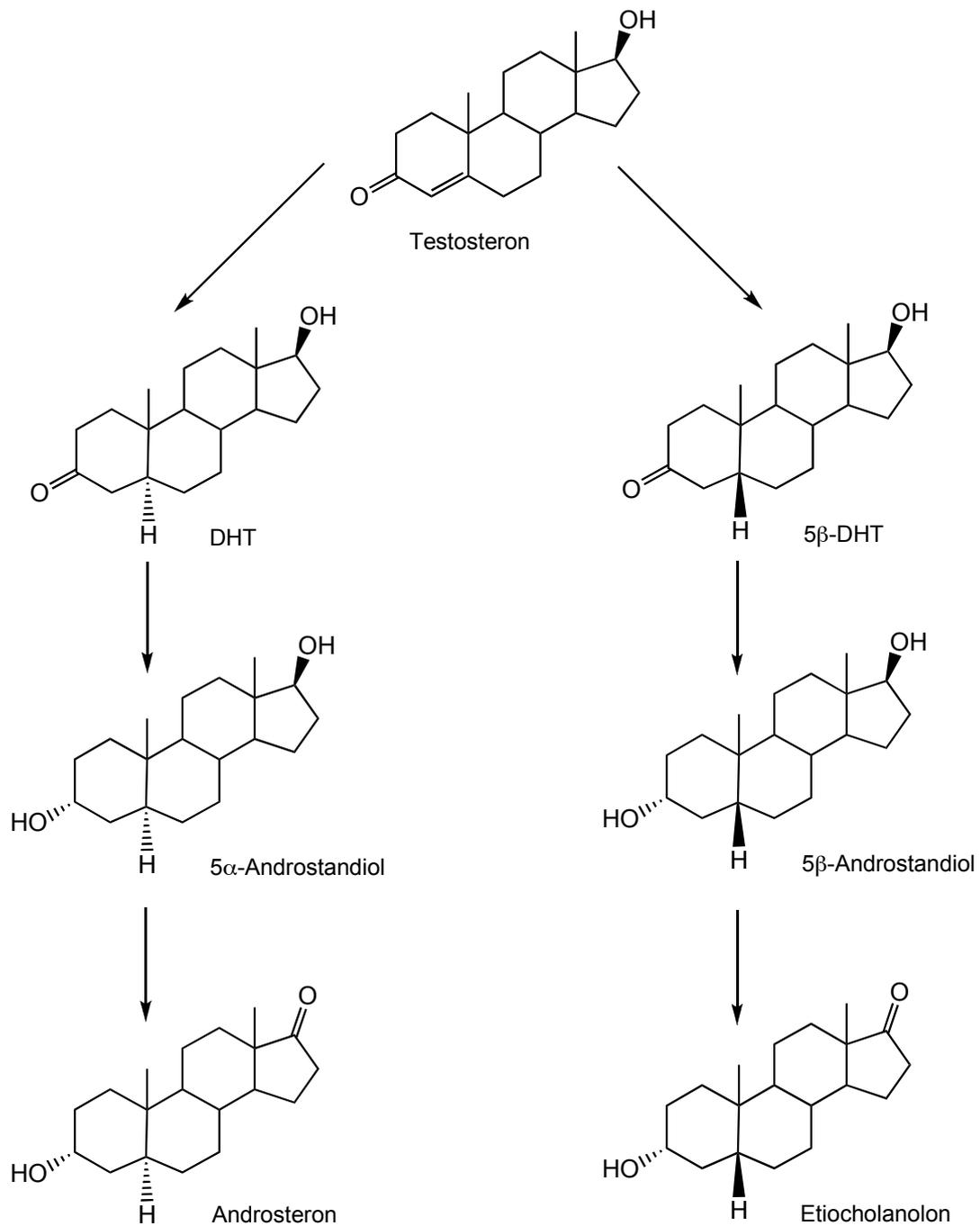


Abbildung 3: Metabolismus von Testosteron

Das Enzym 17HSD2 besitzt neben seiner primären oxidativen Aktivität auch reduktive Eigenschaften. So katalysiert es auch die Umsetzung der entstandenen 17-Ketofunktion zurück zur 17 $\beta$ -Hydroxystruktur (23, 18, 19). Dies macht somit auch die Umwandlung vom Testosteron zurück zum Androstendion möglich, das einem analogen Phase-I-Metabolismus im A-Ring unterliegt. Hauptmetaboliten sind ebenfalls Androsteron und Etiocholanolon. Durch den oxido-reduktiven Charakter der 17HSD2 kann es auf allen Ebenen des Phase-I-Metabolismus von Testosteron und Androstendion zu Übergängen kommen (Abbildung 4).

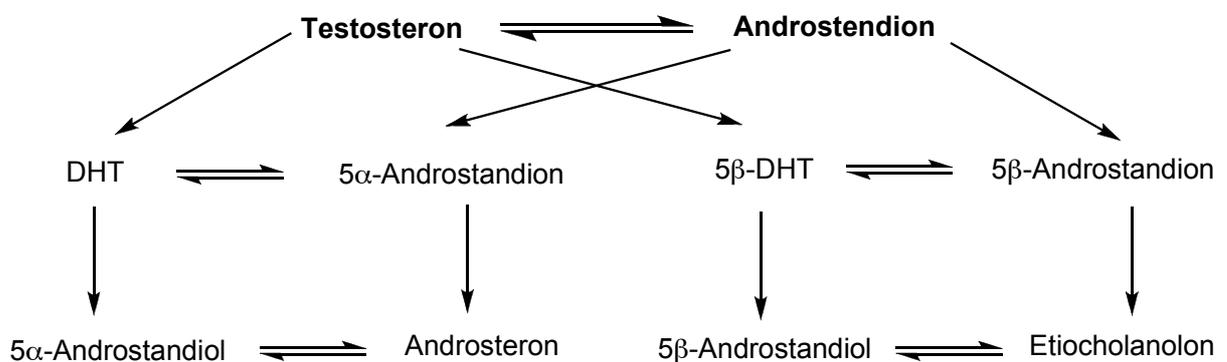


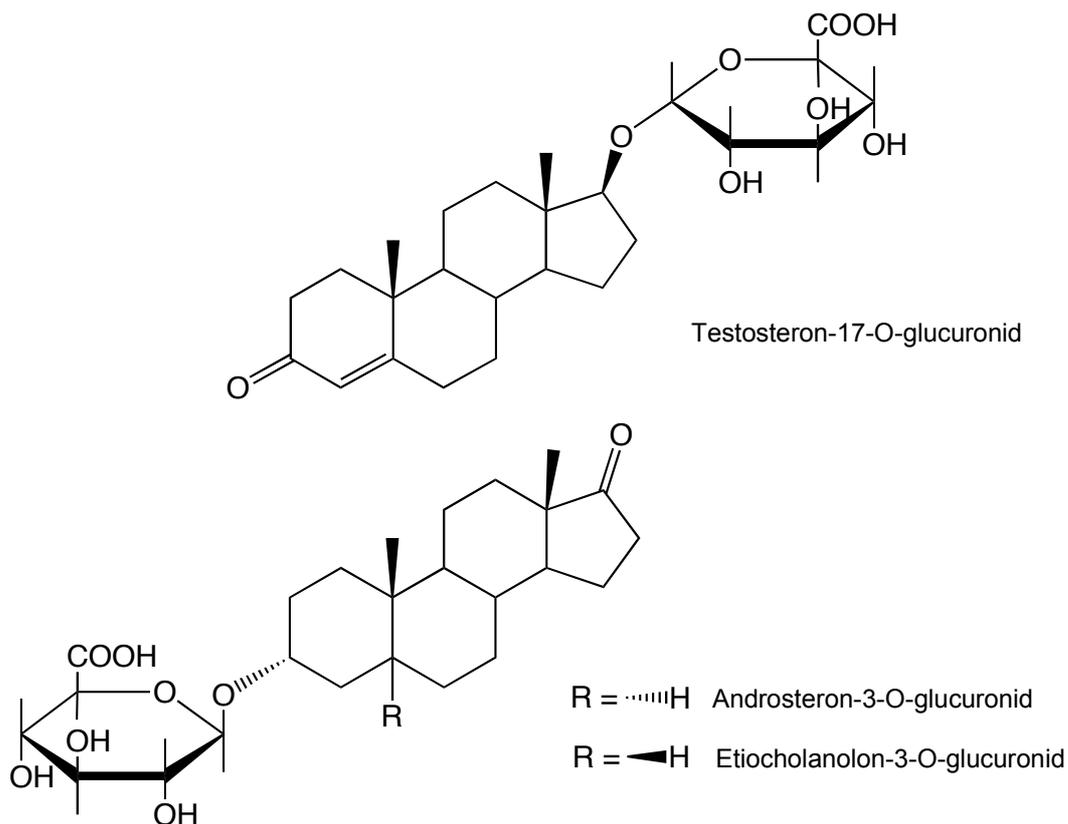
Abbildung 4: Metabolismus von Testosteron; (24), modifiziert

Neben der Umwandlung von bereits existierenden funktionellen Gruppen sind direkte Hydroxylierungen des Steroidgrundgerüsts an den Kohlenstoffen 6, 7, 15 oder 16 möglich (25). Des Weiteren kann es zu einer Umsetzung von Testosteron durch das Enzym Aromatase (CYP19, P450arom) kommen. Das dabei entstehende Estradiol besitzt einen aromatischen A-Ring und stellt das wichtigste weibliche Sexualhormon dar. Bei Männern wird etwas 0,3 % des Testosterons in Estradiol umgesetzt (10).

#### Phase II-Metabolismus von Testosteron

Die im Phase-II-Metabolismus stattfindenden Konjugationsreaktionen mit Testosteron sowie dessen Phase I-Metaboliten finden hauptsächlich an den alkoholischen Funktionen der Kohlenstoffe 3 und 17 statt. Testosteron selber wird an der sekundären 17 $\beta$ -Hydroxyfunktion des D-Rings glucuronidiert und erfährt in dieser Form auch noch weitere Verstoffwechslung (26). Bei Androsteron und Etiocholanolon kommt es zur Bildung von Androsteron- bzw. Etiocholanolon-3-O-glucuronid (Abbildung 5). Die Klasse der 3 $\alpha$ -O-Glucuronide stellt die

Hauptmetaboliten der anabolen androgenen Steroide dar (22). Als Donor fungiert jeweils das  $\alpha$ -Isomere der Uridindiphosphoglucuronsäure, so dass als Produkt grundsätzlich ein  $\beta$ -Glucuronid entsteht (27). Diese können bei der chemischen Aufbereitung durch saure Hydrolyse oder das enzymatisch, z. B. durch  $\beta$ -Glucuronidase (*E. coli*), gespalten werden. Möglich ist auch die Entstehung von Enolkonjugaten (z. B. Androstendion-3-Enolglucuronid), die im Urin schon bei pH 6,2 und 37 °C hydrolysieren (28). Neben Glucuronidierungen kommt es im Phase-II-Metabolismus von Steroiden auch zu Sulfatierungen von funktionellen Gruppen. Dies geschieht vor allem an Strukturen mit  $3\beta$ -Hydroxyfunktionen, die jedoch im Metabolismus von Testosteron nur in geringem Umfang vorkommen. Auch die sekundäre  $17\beta$ -Hydroxyfunktion bietet die Möglichkeit zur Sulfatierung (29). Insgesamt spielt die Sulfatierung jedoch eine untergeordnete Rolle (30).



**Abbildung 5: Strukturformeln von Phase II-Metaboliten des Testosterons: Testosteron-17-O-glucuronid und Androsteron- bzw. Etiocholanolon-3-O-glucuronid**

### 2.1.5 Anwendung von Testosteron als Arzneimittel

Entsprechend seines Wirkungsspektrums wird Testosteron in Form von verschreibungspflichtigen Arzneimitteln eingesetzt. Testosteron kommt z. B. zur Substitutionstherapie bei einer Hodenunterfunktion (Hypogonadismus) des Mannes zum Einsatz, die sich in Form von klimakterischen Beschwerden, Störung der Spermatogenese oder androgenmangelbedingter Osteoporose äußern kann. Weitere Indikationen sind: verzögerte Pubertät bei Knaben, Unterdrückung eines übermäßigen Längenwachstums bei Knaben und aplastische Anämie, sowie zur adjuvanten Therapie bei Brustkrebs-erkrankung oder Osteoporose-Behandlung postmenopausaler Frauen. Neben den bereits genannten Indikationsgebieten wird der positive Einfluss von Testosteron bei chronischen Erkrankungen untersucht, die mit Gewichtsabnahme und/oder körperliche Schwäche einhergehen. Beispiele hierfür sind Krebs, HIV/Aids, chronische Leber-, Nieren und Lungenerkrankungen sowie Zustände nach Operationen oder schweren Verbrennungen (31).

Als unerwünschte Wirkungen einer Testosteron-Therapie können Priapismus (Dauererektion), sexuelle Überstimulation, Natrium- und Wasserretention, Gynäkomastie, Magenverstimmungen, Durchfall, Hemmung von Gerinnungsfaktoren und Polyzythämie auftreten; bei Kindern und Jugendlichen auch Akne vulgaris. Bei Jungen vor der Geschlechtsreife kann es außerdem zu frühzeitigem Epiphysenschluss und Wachstumsstillstand und/oder vorzeitiger Geschlechtsreife kommen. Das Wachstum eines bestehenden Prostatatumors kann beschleunigt werden (32).

#### *Arzneiformen und Wirkstoffprofilierung*

Therapeutisch gesehen ist die perorale Anwendung von Testosteron, z. B. in Form von Tabletten, nur unzureichend. Durch rasche Metabolisierung in der Leber ist es nur wenig und kurzfristig wirksam. Durch Variation der Formulierung kann jedoch Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Testosteron-Präparaten genommen werden. So wurden in den vergangenen Jahren sublingual oder bukkal applizierbare Testosteron-Tabletten, subcutan injizierbare Testosteron-Mikrokapseln, Testosteron-Implantate, -Pflaster und -Gele entwickelt. Eine Verbesserung des Absorptionsverhaltens, verringerte Metabolisierung und höhere biologische Aktivität sind auch Ziele der chemischen Wirkstoffprofilierung von Testosteron. Durch Partialsynthese unter Veresterung der 17-ständigen  $\beta$ -Hydroxy-Gruppe wurde Testosteron-undecanoat entwickelt, das peroral in Kapselform verabreicht wird und eine längere Wirk-

dauer erzielt. Perorale Bioverfügbarkeit wurde auch durch  $17\alpha$ -Methylierung von Testosteron erreicht. Jedoch erwiesen sich alle 17-alkylierten Androgene als hepatotoxisch und diese Präparate wurden – zumindest in Deutschland – aus dem Handel genommen. Testosteronpropionat und Testosteronenantat sind für die parenterale Verabreichung geeignet. Dadurch kann die Magen-Darm-Passage und damit der First-pass Effekt umgangen und durch Veresterung mit langkettigen Fettsäuren die Wirkungsdauer verlängert werden.

### *Synthetische AAS*

Während bei Substitutionstherapien das volle Wirkungsspektrum des Testosterons erwünscht ist, wird bei der Behandlung von katabolen Zuständen ausschließlich die anabole Wirkkomponente benötigt. So ist es seit den dreißiger Jahren Ziel der Wirkstoffprofilierung von Testosteron, dieses Molekül chemisch so zu verändern, dass die androgene Wirkkomponente zugunsten der anabolen zurückgedrängt wird. Wenn das bis heute auch nicht hundertprozentig gelungen ist, so wurden doch eine Vielzahl von Steroiden entwickelt, deren anabole Wirkung im Vergleich zum Testosteron deutlich stärker ausgeprägt ist. Beispiele für diese so genannten Anabolika sind Nandrolon, Metenolon, Clostebol, Oxandrolon und Stanozolol. Die beiden letztgenannten Wirkstoffe zeigten aufgrund der 17-Methyl-Struktur hepatotoxische Eigenschaften.

### *SARMS*

Einen neuen Ansatz in der Entwicklung von Arzneistoffen, deren Wirkungen vom Testosteron abgeleitet werden, zeigen die *Selektiven Androgenrezeptor-Modulatoren* (SARMS). Es handelt sich hierbei um nichtsteroidale AR-Liganden mit Gewebe spezifischen agonistischer und/oder antagonistischer Aktivität. So wurden u. a. Substanzen synthetisiert, die zum einen als vollwertiger Agonist in anabolen Geweben wirken (z. B. Muskulatur und Knochen), andererseits aber nur als partiell agonistische Eigenschaften in androgen-abhängigen Geweben zeigen (z. B. Prostata). Diese Entwicklung stammt ursprünglich von den AR-Antagonisten Flutamid und Bicalutamid abgeleiteten Arylpropionamiden ab. Als weitere Wirkstoffklassen sind bicyclische Hydantoine, Chinoline und Tetrahydro-Chinoline in der klinischen Entwicklung (33, 34).

## 2.2 Nandrolon

### 2.2.1 Chemische Struktur

Mit dem Ziel der Verschiebung des anabol/androgenen-Wirkverhältnisses hin zu stärkeren anabolen Eigenschaften wurden eine Reihe synthetische AAS entwickelt. Das Anabolikum Nandrolon (17 $\beta$ -Hydroxyestr-4-en-3-on, Abbildung 6) wurde erstmals 1950 von Birch synthetisiert (35). Im Vergleich zum Testosteron fehlt die Methylgruppe an C<sub>19</sub>, woraus sich auch die Bezeichnung 19-Nortestosteron ableitet. Das 18 Kohlenstoffatom-haltige Grundgerüst trägt den Trivialnamen Estran.

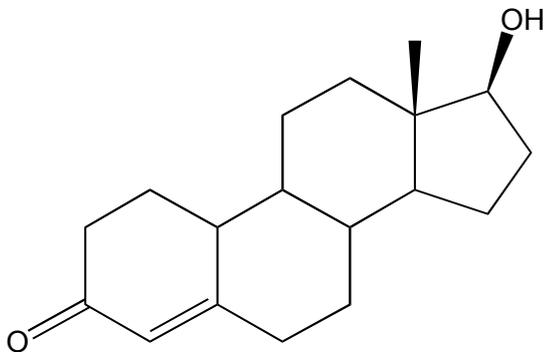


Abbildung 6: Strukturformel von Nandrolon ( $M_w = 274$ )

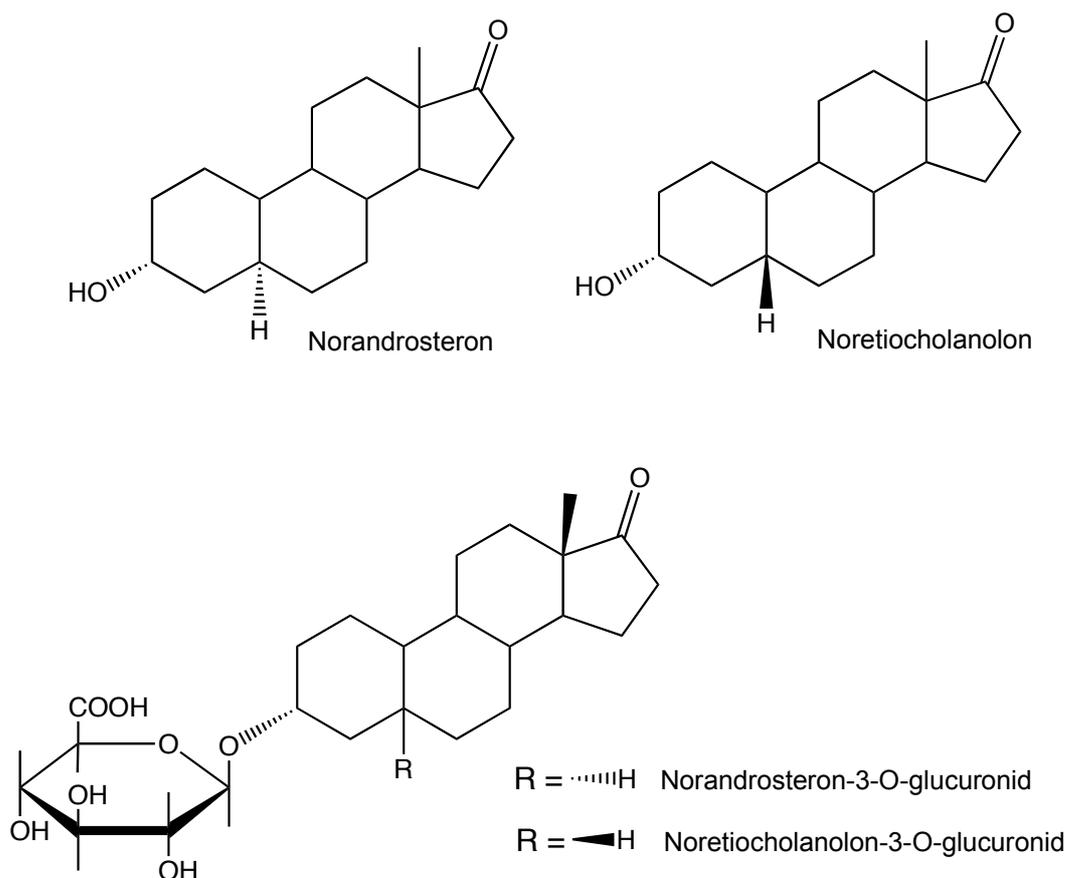
### 2.2.2 Pharmakologische Eigenschaften

Das Anabolikum Nandrolon zeigt im Vergleich zu Testosteron eine stärkere myotrope Aktivität sowie höhere Affinität zum Androgen-Rezeptor. In Rattenexperimenten wies Nandrolon zweimal stärkere anabole Aktivität und gleichzeitig eine fünffach geringere androgene Potenz auf (36). Außerdem zeigt der DHT-analoge Metabolit 5 $\alpha$ -Dihydronandrolon eine deutlich niedrigere Affinität als DHT zum AR (5, 6), so dass auch hierdurch vermittelte unerwünschte Wirkungen reduziert werden können.

### 2.2.3 Metabolismus

Engel et al. bestimmten 1957 erstmals die urinären Nandrolon-Metaboliten Norandrosteron (3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -estran-17-on; NA) und Noretiocholanolon (3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -

estran-17-on; NE), nachdem an Brustkrebs erkrankte Frauen mit Nandrolon-Injektionen behandelt wurden (37). Die Strukturformeln der Verbindungen, die durch Hydrierung der Doppelbindung und Reduktion der 3-Ketofunktion im A-Ring sowie der Oxidation der 17 $\beta$ -Hydroxyfunktion im D-Ring entstehen, sind in Abbildung 7 dargestellt. Sie stellen die analogen Verbindungen zu den Hauptmetaboliten des Testosterons Androsteron bzw. Etiocholanolon dar, zu denen sie sich nur durch das Fehlen der 19-Methylgruppe unterscheiden. Durch die strukturelle Ähnlichkeit erfolgt die Umsetzung von Nandrolon im Phase I-Metabolismus durch dieselben Enzyme, durch die auch Testosteron metabolisiert wird. Des Weiteren wurde ein 3 $\beta$ -Hydroxy-Isomer identifiziert (3 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -estran-17-one), das als 3 $\beta$ -Sulfat im Urin ausgeschieden wird (22). Nandrolon sowie die Hauptmetaboliten NA und NE werden hauptsächlich als Glucuronid-Konjugate ausgeschieden (38). Die Kopplungsreaktion findet beim Nandrolon an der 17 $\beta$ -Hydroxy-Funktion statt, die Umsetzung von NA und NE erfolgt zu 3-O-Glucuroniden (39).



**Abbildung 7: Nandrolon wird in Phase I zu Norandrosteron und Noretiocholanolon metabolisiert (oben,  $M_w = 276$ ) und als dessen 3-O-Glucuronide im Urin ausgeschieden (unten,  $M_w = 452$ )**

### 2.2.4 Anwendung als Arzneimittel

In Deutschland befanden sich seit den siebziger Jahren vor allem zwei verschreibungspflichtige Nandrolon-haltige Arzneimittel auf dem Markt. Es handelte sich dabei um das von der Firma Upjohn GmbH vertriebene Anadur<sup>®</sup>, das Nandrolon-3-(4-hexoxyphenyl)propionat enthielt. Dieses wurde bis zum Jahre 2000 zur Behandlung von chronisch konsumierenden Erkrankungen, Rekonvaleszenz, Kachexie, Osteoporoseschmerzen und katabole Stoffwechsellagen eingesetzt. Seit 1969 wurde das wohl bekannteste Nandrolon-Präparat Deca-Durabolin<sup>®</sup> (Nandrolondecanoat) von der Firma Organon in Deutschland vertrieben. Bis in die 90er Jahre hinein wurde auch dieses Produkt für Osteoporose, Tumorkachexie und alle Zustandsbilder eingesetzt, bei denen eine eiweißaufbauende Wirkung wünschenswert gewesen ist. Dazu wurden alle 3-4 Wochen 25-50 mg Nandrolondecanoat intramuskulär injiziert. Als unerwünschte Wirkungen können Spermatogenesehemmung und Prostatavergrößerung bei Männern, Virilisierungserscheinungen (vermehrter Haarwuchs, irreversible Stimmvertiefung) und Amenorrhoe bei Frauen sowie vorzeitige Pubertätszeichen und beschleunigte Knochenreifung bei Kindern auftreten. Außerdem kann es unter Nandrolon-Behandlungen zu Beeinträchtigung der Leberfunktion und des Lipidstoffwechsels sowie zu geringen Wasser- und Salzretentionen kommen (40).

Die zugelassenen Indikationen waren während dieser Zeit also weitläufig gefasst. Jedoch wurden im Zuge des Nachzulassungsverfahrens, das in der ersten pharmazeutischen EU-Richtlinie (65/65/EWG) geregelt und im Jahr 1976 in Deutschland in nationales Recht umgesetzt wurde, strengere Anforderungen an die behördliche Zulassung geknüpft. Bis dahin in das Spezialitätenregister nach dem Arzneimittelgesetz (AMG) von 1967 eingetragene so genannte Alt-Arzneimittel mussten während einer Übergangsfrist neben der vorhandenen Registrierung jetzt auch eine Überprüfung der Wirksamkeit, Unbedenklichkeit und der pharmazeutischen Qualität nachweisen. Diese Übergangsfrist dauerte letztlich bis Ende 2005 an. Viele Firmen verzichteten im Laufe dieser Zeit auf bestimmte Indikationen oder ganze Zulassungen von Medikamenten, da entweder der Aufwand neuer wissenschaftlicher Studien nicht wirtschaftlich oder die pharmakologische Wirkung darin nicht ausreichend belegbar gewesen wäre. So kommt es, dass das auf dem deutschen Markt vertriebene Nandrolon-Präparat Deca-Durabolin<sup>®</sup> seit 2001 nur noch für die Indikation *Osteoporose bei postmenopausalen Frauen* vertrieben wurde.

Für diese Indikation stehen allerdings weitaus zweckmäßigere Präparate auf dem Arzneimittelmarkt zur Verfügung, so dass sich die Herstellerfirma aus wirtschaftlichen Gründen Ende des Jahres 2005 zur Einstellung der Produktion und zum Abverkauf der vorhandenen Deca-Durabolin<sup>®</sup>-Bestände entschlossen hat. Seitdem steht auf dem deutschen Arzneimittelmarkt kein synthetisches AAS mehr zur Verfügung.

Auch weiterhin wird jedoch die anabole Wirksamkeit von Nandrolon untersucht. Studien der letzten Jahre befassen sich unter anderem mit der Behandlung von tumorbedingter oder HIV-assoziiertes Kachexie (41, 42). Eine Zulassung für letztere Indikation besteht zurzeit in den USA. Eine zusätzlich mögliche Steigerung der Erythropoese soll beim Einsatz von Nandrolon-Präparaten als adjuvante Therapie bei renaler Anämie (43, 44) und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (45) genutzt werden. Ein völlig anderes Einsatzgebiet erfährt Nandrolon bei der Erprobung als *Verhütungsmittel für Männer*. Bei dieser Anwendung wird der negative Feedback-Mechanismus, der durch die androgene Wirkkomponente des Nandrolons vermittelt werden kann, ausgenutzt. Es kommt zu einem Ausbleiben der GnRH-Ausschüttung im Hypothalamus und nachfolgend der hypophysären Gonadotropine. Die so entstehende Suppression der LH-vermittelten endogenen Testosteron-Produktion sowie die Unterbindung der FSH-vermittelten Spermatogenese führen zu einer Beeinträchtigung der männlichen Zeugungsfähigkeit (46, 47).

#### *Arzneiform und Pharmakokinetik*

Die Anwendung von Nandrolon als Arzneimittel erfolgt in der Regel als langkettiger Ester, der in öliger Lösung vorliegt und intramuskulär (*i. m.*) verabreicht wird. Dieses entspricht einer Depot-Formulierung: Die Nandrolon-Ester diffundieren in die Blutbahn und werden durch Enzyme (Esterasen) gespalten. Im Gegensatz zu Testosteron ist die Bindungsaffinität von Nandrolon zu SHBG sehr gering (48, 49). Bei Untersuchungen verschiedener Dosierungen von Nandrolondecanoat erfolgte die Freisetzung des Esters aus dem intramuskulären Depot in den Blutkreislauf gemäß einer Kinetik 1. Ordnung und einer Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von etwa einer Woche. Für die kombinierten Prozesse von Hydrolyse, Verteilung und Elimination betrug  $t_{1/2} = 4,3$  h. Betrachtet man die Hydrolyse alleine, so ergab sich eine Halbwertszeit im Plasma von maximal einer Stunde (50). Bagchus et al. veröffentlichten 2005 pharmakokinetische Kenndaten zu Nandrolondecanoat, das sie in drei verschiedenen Dosierungen (50, 100, 150 mg) gesunden, männlichen Probanden *i. m.* injizierten (51).

In Abbildung 8 sind die resultierenden Konzentrations-Zeit-Verläufe der mittleren Nandrolon-Serumkonzentrationen dargestellt. Die mittleren maximalen Plasmakonzentrationen lagen zwischen 2,1–4,7 ng/ml. Dabei konnten nach Applikation von 150 mg Nandrolon-decanoat die Hauptmetaboliten Norandrosteron und Noretiocholanolon bis zu 180 Tage im Urin nachgewiesen werden. Eine wöchentliche Verabreichung von 200 mg Nandrolon-3-(4-hexophyphenyl)propionat über einen Zeitraum von zehn Wochen resultierte in einer maximalen Nandrolon-Konzentration von 5,5 ng/ml im Plasma (52).

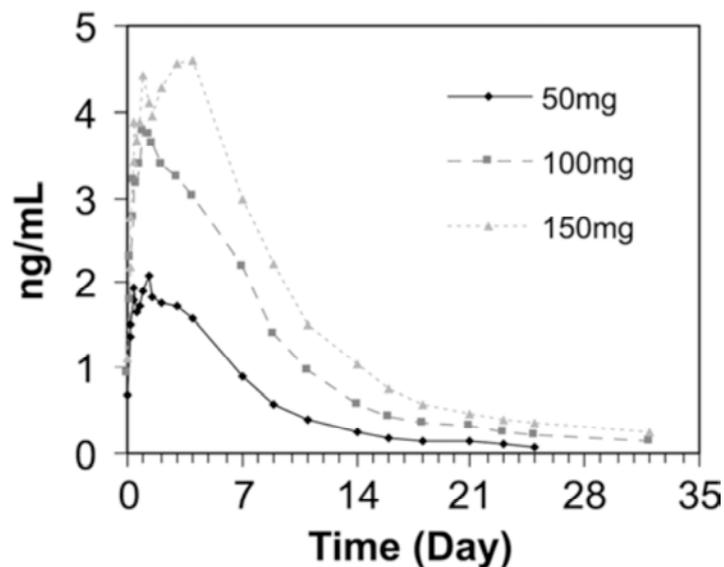


Abbildung 8: Plasmaspiegelverläufe von Nandrolon nach einmaliger *i. m.* Injektion von 50, 100 bzw. 150 mg Nandrolondecanoat (51)

Minto et al. zeigten die Abhängigkeit der resultierenden Wirkspiegel und der Wirkdauer von der Art des Esters, der Applikationsstelle und des Volumens des Lösungsmittels (53). Als indirekten Marker für die (androgene) Wirkung des Nandrolons bestimmten sie die Suppression des endogenen Testosterons. Als supprimiert galt dabei eine Testosteron-Konzentration im Plasma unter 10 nM, die je nach Formulierung und Injektionsstelle zwischen sechs und siebzehn Tagen nach Nandrolon-Applikation anhielt. Die korrespondierenden Nandrolon-Konzentrationen lagen zu diesen Zeitpunkten zwischen 4-5 nM (ca. 1,1–1,3 ng/ml; Abbildung 8). Sanken die Nandrolon-Spiegel weiter ab, konnte die Suppression der endogenen Testosteron-Produktion nicht mehr aufrechterhalten werden. In einer Studie zur Unterdrückung der männlichen Zeugungsfähigkeit wurde als Grenzwert eine Plasmakonzentration von 1 nM Nandrolon (0,3 ng/ml) ermittelt, ab dem – nach erfolgter Suppression – wieder ein signifikanter Anstieg der Testosteron-Konzentrationen zu verzeichnen war (52).

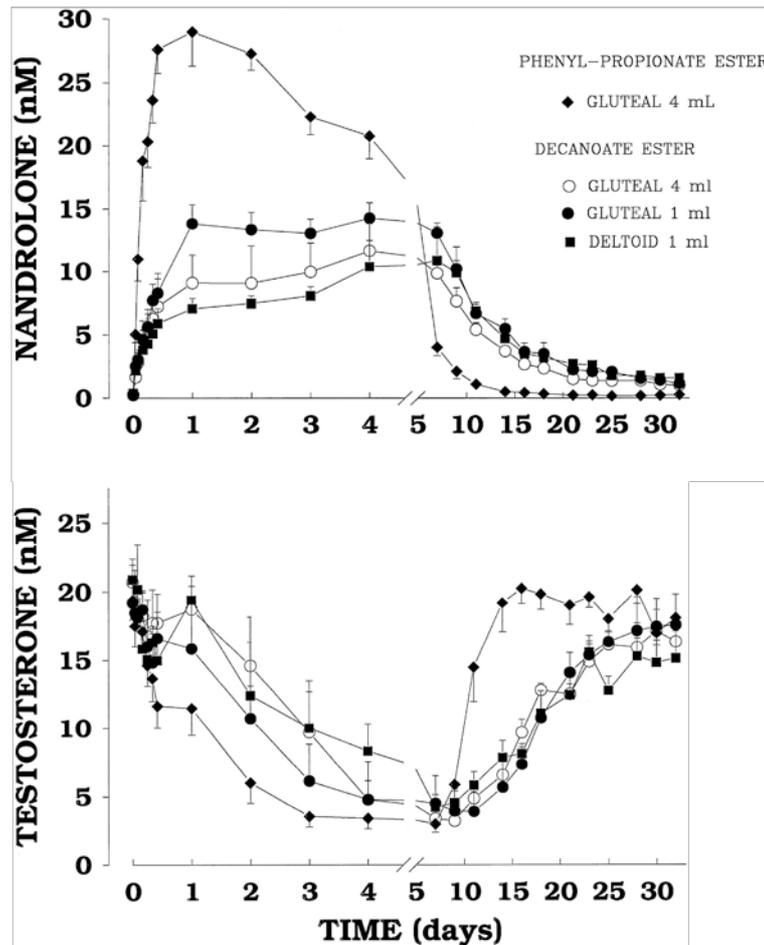
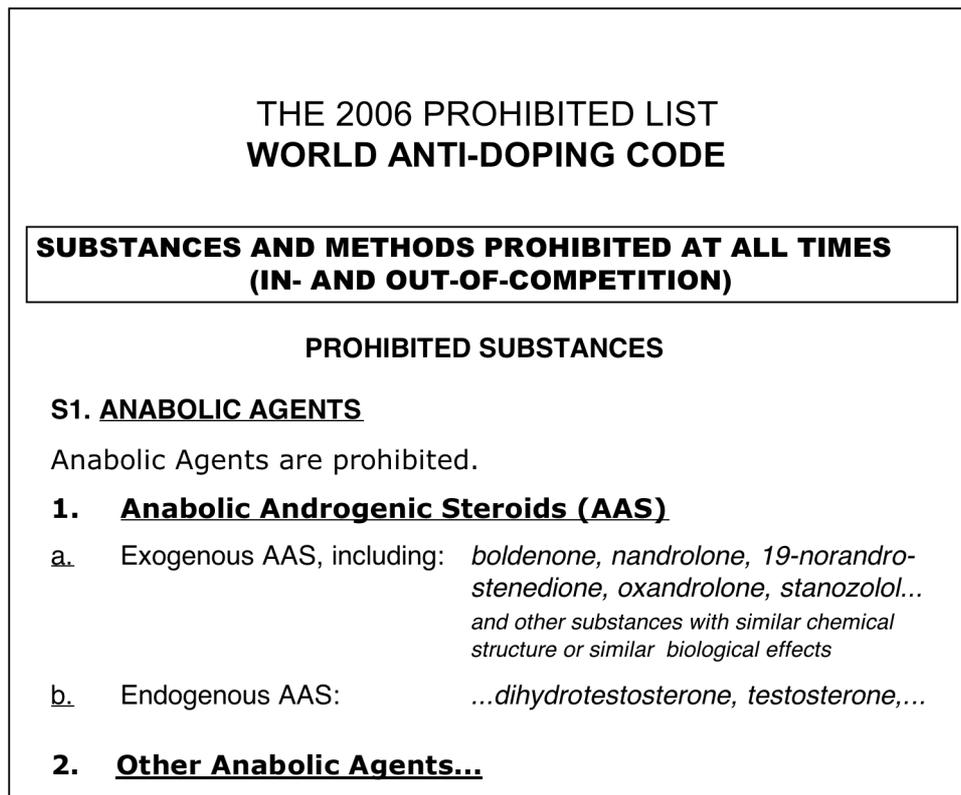


Abbildung 9: Plasmaspiegelverläufe von Nandrolon (oben) und Testosteron (unten) nach glutealer Injektion von 100 mg Nandrolonphenylpropionat in 4 ml Arachisöl (Erdnussöl) (◆) oder glutealer Injektion von 100 mg Nandrolondecanoat in 4 ml (○) bzw. 1 ml (●) Arachisöl oder nach deltoider Injektion von 100 mg Nandrolondecanoat in 1 ml Arachisöl (■)(53).

### 2.2.5 Nandrolon als Dopingsubstanz

Neben der Anwendung als Arzneimittel fanden AAS früh Beachtung als Mittel zur Leistungssteigerung im Sport (54). Sie wurden mit dem Ziel des Muskelmasse- und Kraftzuwachses vor allem im Kraftsportbereich eingesetzt, was ab 1974 zu einem Verbot von Anabolika durch das Internationale Olympische Komitee (IOC) führte. Die heute gültige Dopingliste der Welt Anti-Doping Agentur (WADA) unterscheidet unter Punkt *S1. Anabole Wirkstoffe* zwischen exogenen AAS, zu denen das synthetisch hergestellte Nandrolon zählt, und den endogenen AAS (z. B. Testosteron, DHT; Abbildung 10) (55). Die Anwendung von anabolen Wirkstoffen ist nicht nur im Wettkampf, sondern auch im Training verboten.



**Abbildung 10: Auszug aus der Dopingliste 2006 der Welt Anti-Doping Agentur (WADA), modifiziert**

Der Nachweis eines Dopingvergehens erfolgt in der Regel durch eine Urinuntersuchung. Da Nandrolon einem intensiven Stoffwechsel im menschlichen Körper unterliegt, werden die Dopingproben in diesem Fall nicht auf den verbotenen Wirkstoff selber untersucht. Die Beweisführung eines Nandrolon-Missbrauchs führt über die Identifizierung des urinären Hauptmetaboliten Norandrosteron (56-58). Die Formulierung als Depot-Präparat macht es dabei möglich, dass die Nandrolon-Metaboliten bis zu einem halben Jahr nach intramuskulärer Injektion des Decanoats nachweisbar bleiben (51). Laut des WADA-Berichts zur Dopingstatistik des Jahres 2004 summierte sich die Anzahl an Dopingvergehen, die mit dem Missbrauch von Nandrolon zusammenhängen, auf 339 Fälle. Dies entspricht einem Anteil von etwa 10 % der insgesamt aufgedeckten Dopingvergehen in jenem Jahr (59).

Aber nicht nur die vorsätzliche Anwendung von Nandrolon-Präparaten kann zu nachweisbaren Spuren von Norandrosteron im Urin führen. Es muss auch berücksichtigt werden, dass eine körpereigene Nandrolonproduktion möglich ist (60), so dass erst ein Vorhandensein von Norandrosteron im männlicher und weiblicher Athleten jenseits eines Schwellenwerts von 2 ng/ml als Doping bezeichnet wird (61). Außerdem wurden im Jahr 2005 Forschungsergebnisse veröffentlicht, in denen die Demethylierung von endogenem Androsteron zu

Norandrosteron in so genannten *aktiven* Urinproben nachgewiesen werden konnten (62). Die ab 1998 auf dem US-amerikanischen Nahrungsergänzungsmittelmarkt eingeführten Prohormone Norandrostendion und Norandrostendiol werden – wie Nandrolon – ebenfalls zu Norandrosteron und Noretiocholanolon metabolisiert, woraus ebenfalls ein positives Testergebnis resultieren kann (1, 63, 64). Sogar produktionstechnisch bedingte, geringste Verunreinigungen von anderen Nahrungsergänzungsmitteln mit diesen Prohormonen können zu Norandrosteron-Konzentrationen im Urin führen, die über dem festgelegten Grenzwerten liegen (65, 66).

### 2.3 Prohormone

Als Prohormone werden Vorläufersubstanzen (engl.: *precursor*) von Hormonen bezeichnet. Zu besonderer Popularität gelangten in den letzten Jahren die Prohormone von Testosteron und Nandrolon. Diese wurden in den USA über mehrere Jahre legal als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben. Grundlage dazu bot der *Dietary Supplement Health and Education Act* (DSHEA) (67), der 1994 unter Präsident Clinton verabschiedet wurde. Dieses Gesetz sollte den Verbraucherzugang zu unbedenklichen Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) erleichtern. Demnach dürfen in NEM neben essentiellen Nährstoffen wie Vitaminen, Mineralstoffen und Aminosäuren auch Pflanzenkräuter und „ähnliche nährstoffartige“ Substanzen wie Enzyme und tierischen Drüsen-(Extrakte) enthalten sein. Erst das Inkrafttreten des *Anabolic Steroid Control Act of 2004* (68) im Januar 2005 führte zu einer Restriktion des Prohormon-Handels. Dieses Gesetz stufte die Testosteron- und Nandrolon-Vorläufer als zu überwachende Substanzen (*controlled substances*) ein und verbot somit jeglichen freien Handel. In Deutschland galten Prohormone zu keiner Zeit als Nahrungsergänzungsmittel, da die rechtliche Situation durch das hiesige Lebens- und Arzneimittelgesetz abweicht. Prohormon-Präparate werden aufgrund ihrer Zweckbestimmung (durch Aufmachung der Packung oder durch Werbeaussagen) oder aufgrund ihrer (möglichen) pharmakologischen Wirkung als Arzneimittel eingestuft. Als diese bedürften sie in Deutschland einer Zulassung, für die unter anderem Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit nachgewiesen werden muss. Die Vermarktung von Prohormonen in Deutschland ist demnach illegal. Trotzdem war es über viele Jahre leicht möglich, Prohormone über Internetanbieter aus den USA zu beziehen.

### 2.3.1 Prohormone von Testosteron

Unter dem wenig restriktiven DSHEA wurden 1996/1997 mit DHEA, Androstendion und Androstendiol die ersten Prohormone auf dem amerikanischen Nahrungsergänzungsmittelmarkt eingeführt. Diese synthetisch hergestellten Steroide kommen natürlicherweise auch als Zwischenstufen bei der Testosteron-Biosynthese vor (siehe 2.1.3). Hersteller propagierten, dass diese Prohormone nach Einnahme ebenfalls enzymatisch in Testosteron umgesetzt werden. Diese so genannten Testosteron-Booster wurden als Anti-Aging-Mittel bzw. als legaler Steroid-Ersatz zum Muskelaufbau beworben. Studien hinsichtlich dieser möglichen metabolischen Umwandlung kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die orale Verabreichungen von Androstendion und Androstendiol an gesunde Männer in Einzeldosen (50–300 mg) oder über Behandlungszeiträumen von drei Monaten resultierte in einem – wenn überhaupt – geringen, dosisabhängigem Anstieg der Testosteron-Konzentration im Plasma (69-72). Teilweise könnten erhöhte Testosteronwerte jedoch unentdeckt geblieben sein, da erste Blutproben z. B. erst drei Stunden nach Prohormon-Applikation genommen wurden (73). Verschiedene Studien zeigten weiterhin, dass die Einnahme von Testosteron-Prohormonen im Vergleich zu Placebo keine positiven Trainingseffekte bezüglich der fettfreien Körpermasse und eines Kraftzuwachses bietet (74-76, 72). Im Gegensatz dazu konnte ein deutlicher Anstieg der Testosteron-Werte bei Frauen festgestellt werden, denen Androstendion verabreicht wurde (77, 78). Hinsichtlich des urinären Steroidprofils führte die Einnahme von Testosteron-Prohormonen zu einer Erhöhung der Androsteron-, Etiocholanolon- sowie Testosteron- und (im geringen Ausmaß) Epitestosteron-Konzentrationen (1).

### 2.3.2 Prohormone von Nandrolon

Seit 1998 wurden die analogen synthetischen Norsterioide Norandrostendion (Estr-4-en-3,17-dion; NDion) und Norandrostendiol ( $\Delta^4$ -Isomer: Estr-4-en-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol bzw.  $\Delta^5$ -Isomer: Estr-5-en-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol; NDiol bzw. 5-NDiol) ebenfalls als NEM angeboten. Sie wurden damit beworben, nach Einnahme durch körpereigene Enzyme, die in den menschlichen Steroid-Metabolismus involviert sind, in das bekannte Anabolikum Nandrolon umgewandelt zu werden. Dazu notwendig wären Reduktionen bzw. Oxidationen an den Kohlenstoff 3 und 17 zu einer 3-Keto-4-en-/17 $\beta$ -OH-Struktur durch verschiedene Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Deren Potential wurde in Kapitel 2.1.3 bzw. 2.1.4 beschrieben.

Zielgruppe für den Absatz dieser Produkte waren wiederum Sportler – insbesondere aus dem Kraftsportbereich – die mit Hilfe dieser Substanzen angeblich den Muskelaufbau forcieren konnten. Wissenschaftliche Studien zu diesen propagierten Wirkungen gab es zu diesem Zeitpunkt nicht. Im Jahr 1999 wurde von Uralets et al. die erste Ausscheidungsstudie mit Prohormonen, die als Nahrungsergänzungsmittel vermarktet wurden, veröffentlicht (1). Innerhalb dieser Studie wurden sechs männlichen Probanden u. a. jeweils eine Einzeldosis Norandrostendion (50 mg) verabreicht. Für bis zu zehn Tage konnten im Urin der Probanden die aus dem Nandrolon-Metabolismus bekannten Hauptmetaboliten Norandrosteron und Noretiocholanolon nachgewiesen werden. Dabei wurden in den ersten Urinproben nach Applikation Norandrosteron-Konzentrationen bis zu 100.000 ng/ml erreicht. Weiterhin wurden geringe Mengen an Nandrolon, Norepitestosteron und des verabreichten Norandrostendion im Urin festgestellt. Colker et al. befassten sich 2001 ebenfalls mit dem Metabolismus der Nandrolon-Prohormone (63). In ihrer Studie resultierte die Einnahme eines Kombinationspräparates aus Norandrostendion und Norandrostendiol in einem positiven Urintest auf Nandrolon. Es wurde jedoch nicht explizit beschrieben, dass dieser Test auf dem Nachweis von NA bzw. NE beruhte. Auch Tseng et al. untersuchten 2005 die urinären Metaboliten nach oraler Verabreichung von Einzeldosen verschiedener Nandrolon-Prohormone (darunter Norandrostendion und Norandrostendiol) sowie Nandrolon selber (64). Auch hier wurden wiederum Norandrosteron und Noretiocholanolon als Hauptmetaboliten sowohl des Anabolikums Nandrolon als auch von dessen Prohormonen identifiziert. Keine der durchgeführten Studien untersuchte die nach Einnahme von Nandrolon-Prohormonen auftretenden Plasmaspiegel der entsprechenden Norsteroiden, so dass bisher keine Aussage hinsichtlich akut resultierender Nandrolon-Konzentrationen gemacht werden konnte.

Van Gammeren et al. untersuchten den Einfluss einer achtwöchigen Einnahme von Norandrostendion und Norandrostendiol auf die körperliche Konstitution und die sportliche Leistungsfähigkeit bei trainierten Männern (79, 80). In zwei Studien wurden dabei jeweils Kombinationspräparate, die NDion und NDiol enthielten, verwendet. Die tägliche Gesamtdosis der oral verabreichten Prohormone betrug 156 bzw. 344 mg. In keiner der beiden Untersuchungen wurde eine signifikante Änderung der beobachteten Parameter festgestellt.

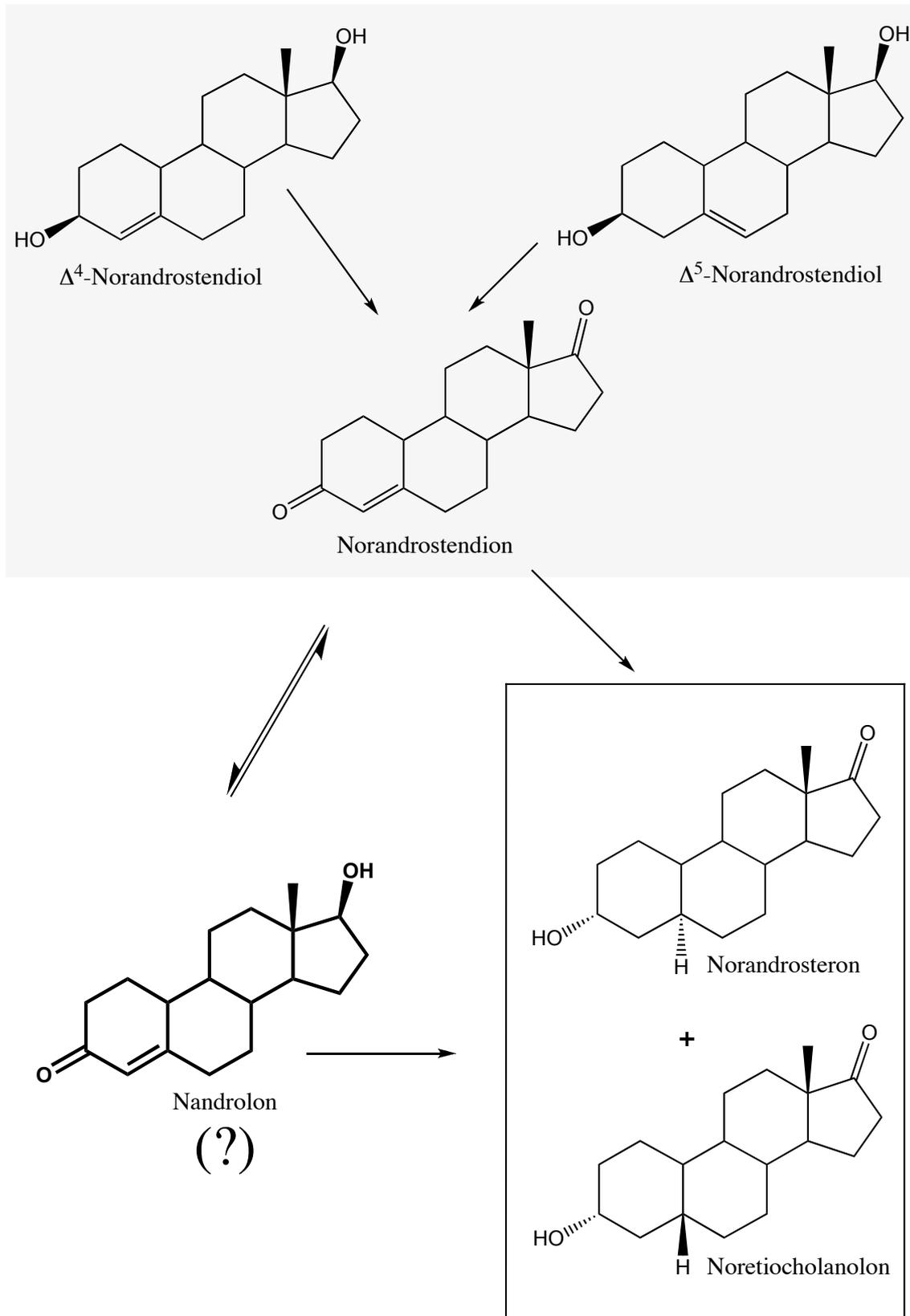


Abbildung 11: Die Nandrolon-Prohormone Norandrostendion (NDion;  $M_w = 272$ ),  $\Delta^4$ -Norandrostendiol (NDiol;  $M_w = 276$ ) und  $\Delta^5$ -Norandrostendiol (5-NDiol;  $M_w = 276$ ) werden zu Norandrosteron und Noretiocholanolon metabolisiert – die intermediäre Bildung von Nandrolon wurde bisher nicht bestätigt

### *Doping mit Nandrolon-Prohormonen*

Durch die chemische und pharmakologische Verwandtschaft zum Anabolikum Nandrolon wurden Norandrostendion und ( $\Delta^4/\Delta^5$ -) Norandrostendiol 1999 vom damals zuständigen Internationalen Olympischen Komitee (IOC) in die Liste der verbotenen Substanzen aufgenommen. Der Beweis des Missbrauchs wird – wie beim Nandrolon auch – über den Nachweis des Hauptmetaboliten Norandrosteron im Urin der Athleten geführt. Dabei kann aufgrund des Analyseergebnisses nicht eindeutig auf das applizierte Norsteroid zurück geschlossen werden, so dass nicht zwischen einer Einnahme von Prohormon-Präparaten und Nandrolon-Injektionen unterschieden werden kann. Es kommt lediglich zu verschiedenen Ausscheidungskinetiken von Norandrosteron. So erreichte die urinäre NA-Konzentration nach oraler Einnahme von 50 mg Norandrostendion Werte bis 100.000 ng/ml, die Nachweisbarkeit insgesamt lag bei maximal 10 Tagen (1). Eine intramuskuläre Injektion von 50 mg Nandrolondecanoat führte durch die Depotformulierung zu maximalen NA-Konzentration von etwa 46-899 ng/ml am Tag nach der Verabreichung und noch bis zu 40 ng/ml nach 33 Tagen. Nach Injektion von 150 mg Nandrolondecanoat konnte Norandrosteron sogar noch nach 180 Tagen im Urin der Probanden nachgewiesen werden (51).

Durch mangelnde Hygiene in Betrieben zur Herstellung von Nahrungsergänzungsmitteln passiert es auch, dass Spuren von Nandrolon-Prohormonen in herkömmliche Produkte wie Vitamin- oder Mineralstoff-Präparate verschleppt werden. Bereits sehr geringe Verunreinigungen mit Norandrostendion oder Norandrostendiol können zum Auftreten von Norandrosteron im Urin führen und so einem positiven Dopingtest verursachen (65, 66, 81, 82).

### **2.3.3 Applikationsarten**

Als Resorption wird die Aufnahme eines Arzneistoffes vom Applikationsort in die Blutbahn bezeichnet. Sie beruht auf den physikalischen Prozessen der Diffusion und der Verteilung und wird durch geringe Molekülgröße, Lipophilie des Arzneistoffes und starke Durchblutung sowie gute Permeabilitätsverhältnisse an der Applikationsstelle begünstigt.

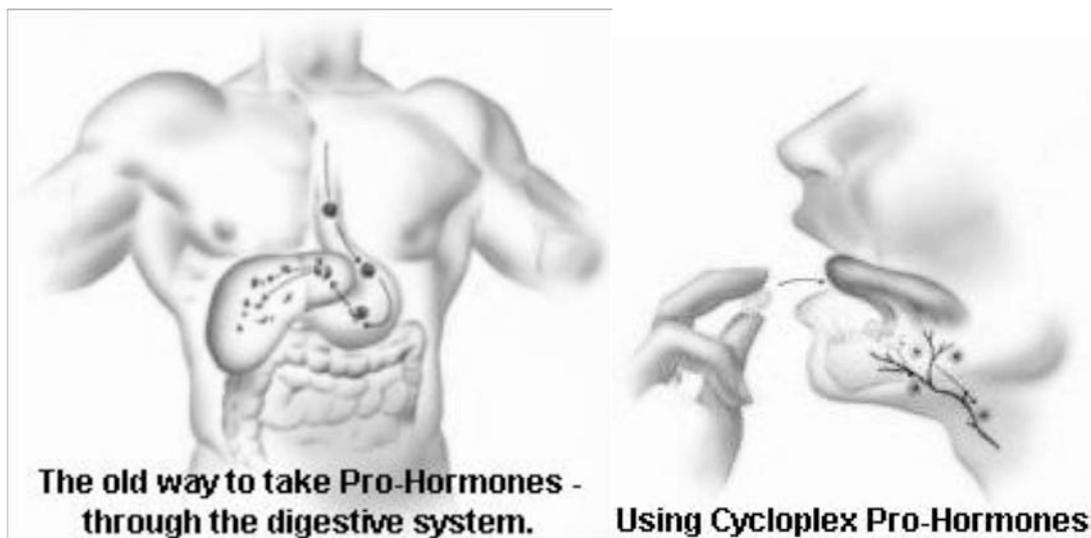
### *Orale Applikation*

Größtenteils werden die Prohormone des amerikanischen Nahrungsergänzungsmittel-Marktes in Form von Kapseln oder Tablette angeboten, die dann mit etwas Flüssigkeit herunter geschluckt werden. Diese Applikationsform wird als (per)oral bezeichnet. Nach gastrointestinaler Resorption gelangen die Substanzen über den Pfortaderkreislauf zur Leber, in der bereits erste Metabolisierungsreaktionen und sogar Eliminierungsprozesse stattfinden können, bevor sie nach Herz- und Lungepassage den systemischen Kreislauf erreichen. Die präsystemische Elimination in der Leber vermindert den Anteil der Arzneimittel, der unverändert den systemischen Kreislauf erreichen und seine Wirkung entfalten kann. Dieser so genannte First-pass Effekt ist bei den Steroidhormonen sehr ausgeprägt und war Anstoß für diverse Versuche der Wirkstoffprofilierung. Möglicherweise ist diese Applikationsform für Prohormone daher ungeeignet, um benötigte Wirkkonzentrationen zu erzielen.

### *Sublinguale Applikation*

Prohormon-Präparate der neueren Generation werden in Form von Sublingualtabletten angeboten. Diese Tabletten werden unter die Zunge gelegt, um sie dort zergehen zu lassen. Die in diesem Bereich außerordentlich gut durchblutete Schleimhaut erlaubt eine rasche Resorption lipophiler, undissoziiert vorliegender Substanzen durch die orale Mukosa in den systemischen Kreislauf. Es kommt zu einem schnellen Wirkungseintritt, da die Substanzen nicht über den Pfortaderkreislauf abtransportiert werden und die erste Leberpassage – und somit auch der First-pass Effekt – umgangen wird. Studien mit sublingual verabreichtem Testosteron zeigten im Vergleich zur oralen Applikation bemerkenswerte Ergebnisse hinsichtlich erzielter Plasmakonzentrationen (83). Aufgrund der erhöhten Bioverfügbarkeit von geeigneten Wirkstoffen können diese in sublingualen Arzneiformen geringer dosiert werden. Ebenso konnten Brown et al. mit der sublingualen Anwendung des Testosteron-Prohormons Androstendiol signifikante Anstiege der Plasmakonzentrationen von Androstendion, freiem Testosteron, Gesamt-Testosteron und Estradiol erzielen (84). Diverse neue synthetische Prohormone, die zurzeit noch legal auf dem amerikanischen Nahrungsergänzungsmittel-Markt erhältlich sind, werden auch als mukoadhäsive Plättchen angeboten. Diese werden mit Speichel befeuchtet, innen an die Backentasche geklebt und geben auf diesem Weg den Wirkstoff direkt an die Mundschleimhaut ab (bukcale Applikation).

Diese Formulierungen zur sublingualen und bukkalen Applikation enthalten als Hilfsstoff Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin, das im Sinne einer Wirt-Gast-Beziehung einen Komplex mit den Prohormonen eingeht. Cyclodextrine fungieren als Transportmittel, indem sie die lipophilen Steroide im wässrigen Medium zu der relativ lipophilen Membran der Mundschleimhaut bringen. Dort können die Wirkstoffmoleküle direkt – ohne selbst hydratisiert zu werden – die Membran penetrieren (85).



**Abbildung 12:** Veranschaulichung der Prohormon-Aufnahme über den Gastro-Intestinal-Trakt (orale Applikation, links) bzw. über die Mundschleimhaut (sublinguale und bukkale Applikation); Quelle: [http://www.netrition.com/cycloplex\\_page.html](http://www.netrition.com/cycloplex_page.html)

Um tatsächlich Kenntnis darüber zu erlangen, ob und in welchen Mengen die Bildung von Nandrolon aus der Einnahme von Nandrolon-Prohormonen resultiert, wurde eine klinische Studie mit verschiedenen Prohormon-Präparaten durchgeführt. In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit werden die Studienorganisation dieser unter das Arzneimittelgesetz fallenden klinischen Prüfung beschrieben und die experimentellen Methoden vorgestellt, mit denen die Produkte selber und die Blutproben der Probanden untersucht wurden. Schließlich werden die Ergebnisse der Ausscheidungsversuche mit vier verschiedenen Prohormon-Präparaten, die von acht Probanden in einem cross-over Design eingenommen wurden, vorgestellt.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Steroide

Für die Entwicklung der analytischen Methode wurden die Steroide Norandrostendion, die isomeren  $\Delta^4$ - und  $\Delta^5$ -Norandrostendiol, Nandrolon, Norandrosteron und Noretiocholanolon benutzt (im Folgenden als Analyten bezeichnet). Als interne Standards wurden die deuterierten Steroide  $d_3$ -Nandrolon ( $d_3$ -NL),  $d_3$ -Norandrostendiol ( $d_3$ -NDiol) und  $d_3$ -Noretiocholanolon ( $d_3$ -NE) eingesetzt.

#### 3.1.1 Analyten

Die Referenzverbindungen von Nandrolon, Norandrostendion und  $\Delta^5$ -Norandrostendiol wurden käuflich erworben. Die Norsteroide  $\Delta^4$ -Norandrostendiol, Norandrosteron und Noretiocholanolon entstammen früheren Projekten in unserem Labor, in denen sie nach gängigen Verfahren (86, 87) synthetisiert wurden. In Tabelle 1 sind die chemischen Bezeichnungen, die verwendeten Abkürzungen, die Molekulargewichte ( $M_W$ ), die Quellen sowie die entsprechenden Strukturformeln wiedergegeben.

#### 3.1.2 Interne Standards

Zur Ermöglichung und Optimierung der quantitativen Auswertung wurde mit deuterierten internen Standards gearbeitet (IStds, Tabelle 2). Das  $d_3$ -NE wurde von der Firma LCG Promochem erworben. Das dreifach deuterierte Nandrolon entstammt einer Eigensynthese aus unserem Labor. Durch Reduktion wurde für diese Studie daraus  $d_3$ -NDiol gewonnen. Dazu wurden 5 mg  $d_3$ -NL in 10 ml Ethanol (80 %) angelöst, mit 1 mg  $\text{NaBH}_4$  (1,5 M Überschuss) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  angelöst und gegen 20 ml *tert.*-Butylmethylether ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde abgenommen und eingengt.

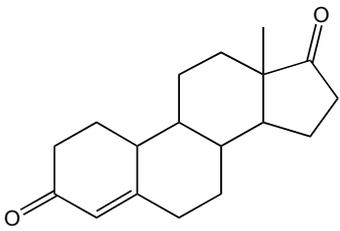
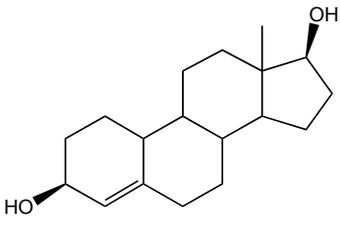
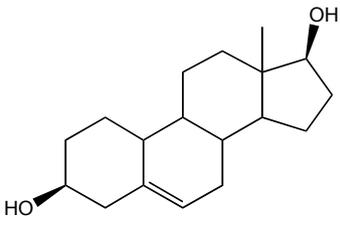
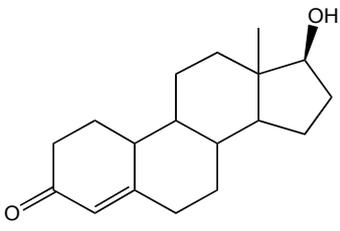
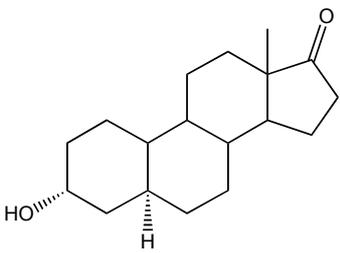
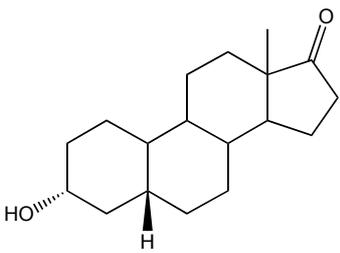
Referenzverbindungen	Abk.	$M_w$	Quelle/ (Reinheitsgrad)	Strukturformel
<b>Norandrostendion</b> (Estr-4-en-3,17-dion)	ND	272	Steraloids, London, GB	
<b><math>\Delta^4</math>-Norandrostendiol</b> (Estr-4-en-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol)	NDiol	276	Eigensynthese (95%)	
<b><math>\Delta^5</math>-Norandrostendiol</b> (Estr-5-en-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol)	$\Delta^5$ -NDiol	276	Steraloids, London, GB	
<b>Nandrolon</b> (Nortestosteron, 17 $\beta$ -Hydroxyestr-4-en-3-on)	NL	274	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (> 99%)	
<b>Norandrosteron</b> (3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -estran-17-on)	NA	276	Eigensynthese (> 97%)	
<b>Noretiocholanolon</b> (3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -estran-17-on)	NE	276	Eigensynthese (> 97%)	

Tabelle 1: Analyten

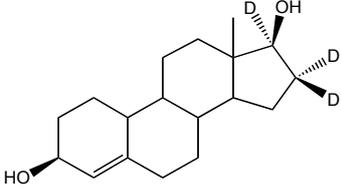
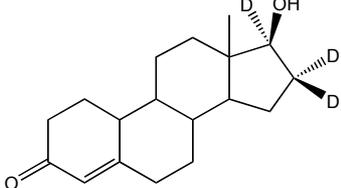
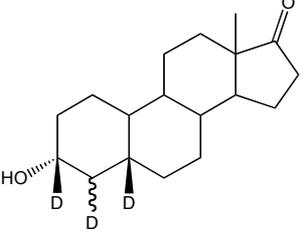
<i>Interner Standard</i>	<i>Abk.</i>	<i>M<sub>W</sub></i>	<i>Quelle/ (Reinheitsgrad)</i>	<i>Strukturformel</i>
<b>d<sub>3</sub>-Norandrosterdiol</b> (16,16,17- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> -Estr-4-en-3β,17β-diol)	d <sub>3</sub> -NDiol	279	Eigensynthese (3β/3α-Isomere: 75/25; m/m)	
<b>d<sub>3</sub>-Nandrolon</b> (d <sub>3</sub> -Nortestosteron, 16,16,17- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> -17β-Hydroxyestr-4-en-3-one)	d <sub>3</sub> -NL	277	Eigensynthese (96 %)	
<b>d<sub>3</sub>-Noretiocholanolon</b> (3,4,5- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> -3α-Hydroxy-5β-estran-17-on)	d <sub>3</sub> -NE	279	LCG Promochem, Wesel (98%)	

Tabelle 2: Interne Standards

### 3.1.3 Charakterisierung mittels GC/MS-Analyse

Zur gaschromatographischen/massenspektrometrischen Charakterisierung wurden alle Verbindungen als bis-Trimethylsilyl-Derivate vermessen. Dazu wurden jeweils 100 ppm-Standardlösungen der Steroide (Lösungsmittel: Methanol) hergestellt. Davon wurden 100  $\mu\text{l}$  zur Trockne eingedampft und mit 100  $\mu\text{l}$  Derivatisierungsreagenz bestehend aus *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA), Ammoniumiodid ( $\text{NH}_4\text{I}$ ) und Ethanthiol [1000:2:3 (m:v:m)] bei 60 °C für 15 Minuten umgesetzt. Hierbei werden alle freien Hydroxygruppen und – durch das *in situ* entstehende Trimethylsilylsilan unter Enolisierung – die Ketofunktionen derivatisiert.

GC/MS-Parameter: Agilent HP 6890/5973-System; Säule: HP-5MS, 17 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ ; Trägergas: Helium, 0,8 ml/min, Constant Flow-Modus; Temperaturprogramm: 140 °C 10°C/min auf 320 °C, 3  $\mu\text{l}$  Injektionsvolumen, Splitverhältnis 15:1, MS: EI-Scan-Modus, Scanbereich 40–800 Da

## 3.2 Prohormon-Präparate

Für diese klinische Studie wurden über verschiedene amerikanische Internetanbieter Norandrostendion- sowie  $\Delta^4$ - und  $\Delta^5$ -Norandrostendiol-haltige Nahrungsergänzungsmittel bestellt, die in Tabelle 3 vorgestellt werden. Wenn möglich, wurden neben Produkten, die Kapseln enthielten, auch Präparate zur sublingualen Applikation erworben.

### 3.2.1 Überprüfung mittels GC/MS-Analyse

Zur Überprüfung von Identität und Reinheit wurden qualitative Analysen aller Produkte mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie durchgeführt. Dazu wurde jeweils eine Kapsel bzw. Sublingualtablette mit 10 ml Methanol extrahiert. Von den erhaltenen methanolischen Lösungen wurde jeweils eine 1:100-Verdünnung hergestellt. Diese wurden analog den Referenzverbindungen analysiert (siehe 3.1.3) und anhand der auftretenden Retentionszeiten und Massenspektren mit diesen verglichen.

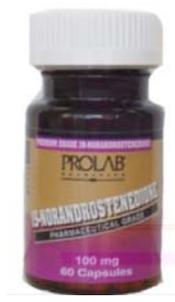
<i>Prohormon/ Präparat</i>	<i>Formulierung</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Dosierung/ Einheit</i>	<i>Abbildung</i>
<b>Norandrostendion</b> <i>19-NORANDROSTENEDIONE</i>  Charge: N019902001 Prolab Nutrition 11 Britton Drive, Bloomfield, CT, USA	Kapseln	60	100 mg	
<b>Norandrostendion</b> <i>NORCYCLODIONE</i>  Charge: SN138 SportsOne Wallingford, CT 06492, USA	Sublingual- tabletten	60	25 mg	
<b><math>\Delta^4</math>-Norandrostendiol</b> <i>NORANDRODIOL</i>  Charge: – SportsOne Wallingford, CT 06492, USA	Kapseln	60	100 mg	
<b><math>\Delta^4</math>-Norandrostendiol</b> <i>CYCLO-NORDIOL</i>  Charge: – SportsOne Wallingford, CT 06492, USA	Sublingual- tabletten	60	25 mg	
<b><math>\Delta^5</math>-Norandrostendiol</b> <i>NorDiol 5</i>  Charge: 2141 SportsOne Wallingford, CT 06492, USA	Kapseln	60	50 mg	

Tabelle 3: Prohormon-Präparate

### 3.3 Klinische Studie

#### 3.3.1 Gesetzliche, ethische und administrative Regelungen

Norandrostendion- und Norandrostendiol-haltige Produkte sind in Deutschland nicht verkehrsfähig. Sie werden hier nicht als Nahrungsergänzungsmittel eingestuft, sondern haben aufgrund ihrer Zweckbestimmung und der hormonellen Struktur den Status nicht zugelassener Arzneimittel und unterliegen somit dem Arzneimittelgesetz (Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln vom 24.8.1976, AMG). Ausscheidungsversuche mit Prohormonen gelten demnach als klinische Prüfung von Arzneimitteln, die nach AMG § 4, Absatz 23, "... jede am Menschen durchgeführte Untersuchung, die dazu bestimmt ist, klinische oder pharmakologische Wirkungen von Arzneimitteln zu erforschen oder nachzuweisen oder Nebenwirkungen festzustellen oder die Resorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Ausscheidung zu untersuchen, mit dem Ziel, sich von der Unbedenklichkeit oder Wirksamkeit der Arzneimittel zu überzeugen..." ist. Der sechste Abschnitt des AMG (§§ 40–42) befasst sich mit dem Schutz des Menschen bei der klinischen Prüfung und wurde im vollen Umfang bei dieser Prohormon-Studie berücksichtigt. Des Weiteren wurde im Sinne der Deklaration von Helsinki die ethischen Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen sowie geltende Datenschutzbestimmungen eingehalten.

Obwohl Nandrolon-Prohormone über Jahre hinweg in den USA als Nahrungsergänzungsmittel von vielen Menschen eingenommen wurden, wurde diese Studie von der zuständigen Ethik-Kommission als *Phase I* („First in Man“) der klinischen Prüfung eingestuft, da es sich rechtlich um die erstmalige Anwendung dieses nicht zugelassenen Arzneimittels am Menschen handelte. Als Leiter der klinischen Prüfung fungierte Dr. Marcel Reiser von der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln. Die Aufgaben der Prüffärztin wurden von Frau Dr. Petra Platen vom Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln übernommen. Für die Studie wurden ein Prüfplan, eine Probandeninformation und Einverständniserklärungen entworfen sowie eine Probandenversicherung abgeschlossen. Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln hat den Antrag auf Studiendurchführung zustimmend bewertet. Die Durchführung der Studie wurde sowohl bei der örtlichen Gesundheitsbehörde als auch beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM, Bonn) als Bundesoberbehörde angezeigt.

### 3.3.2 Probanden

An der Studie nahmen acht männliche Probanden aus dem Umfeld der Deutschen Sporthochschule Köln teil. Sie wurden von der Prüfarztin auf ihre Eignung und den positiven Gesundheitszustand untersucht. Zur weiteren Kontrolle wurden Blut- und Urinuntersuchungen vorgenommen (siehe Ein- und Ausschlusskriterien). Die Studienteilnehmer wurden ausführlich anhand der erstellten Probandeninformation über die geplante klinische Studie sowie die Versicherungs- und Datenschutzbestimmungen informiert. Alle Probanden mussten eine schriftliche Einverständniserklärung unterschreiben. Der Rücktritt von der Studienteilnahme war zu jeder Zeit auch ohne Angabe von Gründen möglich.

Die für die klinische Studie aufgenommenen Probanden (V1–V8) waren zu Studienbeginn zwischen 25–51 Jahre alt ( $32,8 \pm 7,5$ ) und wiesen ein Körpergewicht von 67–99 kg ( $81,6 \pm 10,7$ ) auf. Folgende Ein- und Ausschlusskriterien wurden von ihnen erfüllt:

#### *Einschlusskriterien*

- Gesunde, freiwillige männliche Probanden im Alter zwischen 18 und 50 Jahren
- Unauffällige körperliche Untersuchung durch den Prüfarzt (RR, Puls, Temperatur)
- Unauffällige Anamnese
- Unauffälliges Labor  
(Parameter: Na, K, Cl, Glu, Albumin, Eiweiß, Kreatinin, Harnstoff, GOT, GTP, CK, P.-Amylase, Bilirubin, AP, LDH; BSG, kleines Blutbild, Differenzialblutbild)
- Probanden, die bereit und in der Lage sind, an allen Untersuchungen teilzunehmen
- Schriftliche Einverständniserklärung des Probanden

#### *Ausschlusskriterien*

- Missbrauch anaboler androgener Steroide (Screening auf Urinmetaboliten)
- Missbrauch sonstiger Medikamente oder Alkohol-Missbrauch
- Nieren- oder Leberinsuffizienz
- Zustand nach Prostata- oder Mammakarzinom
- Verdacht auf oder manifeste Tumorerkrankung

### 3.3.3 Studiendesign

In einer offenen, monozentrisch angelegten klinischen Studie der Phase I wurden den Probanden jeweils die in Tabelle 4 aufgeführte Einzeldosen der verschiedenen Prohormon-Präparate verabreicht. Die Einnahme der Kapseln erfolgte durch Schlucken mit etwas Wasser. Die Sublingualtabletten wurden zehn Minuten unter der Zunge belassen und nicht aufgelöste Reste anschließend geschluckt. Die Probanden waren zum Zeitpunkt der Prohormon-Applikation und während der folgenden zwei Stunden nüchtern.

<i>Versuch</i>	<i>Prohormon</i>	<i>Produkt</i>	<i>Dosis</i>
1	Norandrostendion	<i>19-Norandrostenedione</i>	100 mg (1 Kapsel)
2	Norandrostendion	<i>NorCycloDione</i>	25 mg (1 Sublingualtablette)
3	$\Delta^4$ -Norandrostendiol	<i>Norandrodiol</i>	100 mg (1 Kapsel)
4	$\Delta^4$ -Norandrostendiol	<i>CycloNorDiol</i>	25 mg (1 Sublingualtablette)
5*	$\Delta^5$ -Norandrostendiol	<i>NorDiol 5</i>	100 mg (2 Kapseln)

**Tabelle 4: Liste der Prüfpräparate und der verabreichten Dosierungen**

\*Laut Ergebniss der Qualitätsüberprüfung (siehe Kapitel 4.2) enthielt das Produkt *NorDiol 5* nicht das deklarierte  $\Delta^5$ -Norandrostendiol, sondern 5-Androstendiol und wurde deshalb den Probanden nicht verabreicht.

*Blutproben*

Vor den Prohormon-Applikationen wurde den Probanden mit einer Braunüle ein venöser Dauerzugang gelegt, der komfortable Blutabnahme vor sowie bis acht Stunden nach Einnahme zu festgelegten Zeitpunkten ermöglichte (Tabelle 5). Am nächsten Tag ( $t = 24$  h) wurde eine weitere Blutprobe entnommen. Es wurden jeweils 10 ml Vollblut in mit  $K_2$ -EDTA bestückte Blutröhrchen entnommen und diese sofort zentrifugiert. Das so von den Blutzellen separierte Plasma wurde abgenommen und bis zur Analyse bei  $-20$  °C tief gefroren. Die Versuche fanden in einem Abstand von mindestens zwei Wochen statt, um die nötige Auswaschphase zu gewährleisten.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
$t$	0'	10'	20'	30'	45'	60'	90'	2 h	3 h	4 h	6 h	8 h	24 h

**Tabelle 5: Zeitpunkte der Blutabnahmen nach Prohormon-Applikation**

*Urinproben*

Vor sowie im Zeitraum von vierzehn Tagen nach den Prohormon-Applikationen wurden von den Probanden nach in Tabelle 5 aufgeführtem Schema Urinproben gesammelt. Dazu wurde das jeweilige Gesamtvolumen notiert und je ca. 50 ml Urin abgenommen und bei  $-20$  °C eingefroren. Die Analyse dieser Proben war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

$t$ [Tag]	Urinproben
0	1 Probe vor Prohormon-Applikation
1–4	jeder Urin wird gesammelt
5–8	Morgenurin
10, 12, 14	Morgenurin

**Tabelle 6: Sammelschema für Urinproben**

## 3.4 Probenaufbereitung

### 3.4.1 Reagenzien

Von der Firma Merck KGaA (Darmstadt) wurden Kaliumhydroxyd (KOH; p.a.), Natriumhydroxyd (NaOH; p.a.) und Natrium-dihydrogenphosphat-Monohydrat bezogen. Des Weiteren wurde  $\beta$ -Glucuronidase von *Escherichia coli* (Roche Diagnostics, Mannheim) benutzt. Als Lösungsmittel wurden Methanol und *tert.*-Butylmethylether (TBME), die vor Gebrauch destilliert wurden, sowie n-Pentan ( $\geq 99\%$ , K&M, St. Augustin) eingesetzt. Das Derivatisierungsreagenz MSTFA stammte von der Chemischen Fabrik Carl Bucher (Waldstetten) und wurde ebenfalls vor Gebrauch destilliert. Ammoniumiodid ( $\text{NH}_4\text{I}$ ) und Ethanthiol ( $> 97\%$ ) wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

### 3.4.2 Aufarbeitung der Plasmaproben

#### *Bestimmung der Gesamtfractionen der Norsteroiden*

Zur Gesamtfraction zählen sowohl die unkonjugiert im Plasma vorliegenden („*freien*“) Norsteroiden als auch die an Glucuronsäure gekoppelten (*konjugierten*) Verbindungen. Es wurden jeweils 0,5 ml der Plasmaproben zur Aufarbeitung herangezogen, die mit 20  $\mu\text{l}$  der IStd-Mischung (IStd-Mix:  $\text{d}_3\text{-NL}$ : 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\text{d}_3\text{-NDiol}$ : 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\text{d}_3\text{-NE}$ : 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzt wurden. Die enzymatische Hydrolyse der Konjugate fand nach Zugabe von 0,5 ml Phosphatpuffer (0,2 M; pH 7) und 50  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Glucuronidase während Erwärmung auf 50 °C für 60 Minuten statt. Anschließend erfolgte die Einstellung der Probe auf pH 12 mit 0,5 ml wässriger KOH (0,5 M) und die erste Flüssig-flüssig-Extraktion (*liquid-liquid extraction*, LLE) mit 6 ml TBME. Die Probe wurde dabei für 15 Minuten geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10 min, 1200 g). Die organische Phase wurde in ein neues Reagenzglas überführt und zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde in 1 ml NaOH (0,01 M) aufgenommen und in einer zweiten LLE mit 5 ml n-Pentan extrahiert. Nach erneutem Schütteln und Zentrifugieren wurde erneut die organische Phase abgenommen und diese mit 2 ml einer Methanol/Wasser-Mischung (95:5; v:v) reextrahiert (15 min schütteln). Nach anschließendem Zentrifugieren wurde die n-Pentan-Phase verworfen und die verbleibende methanolische Lösung zur Trockne eingedampft. Abschließend wurden die Analyten mit 50  $\mu\text{l}$  einer Mischung aus MSTFA/ $\text{NH}_4\text{I}$ /Ethanthiol [1000:2:3 (v:m:v)] während 15 Minuten bei 60 °C derivatisiert.

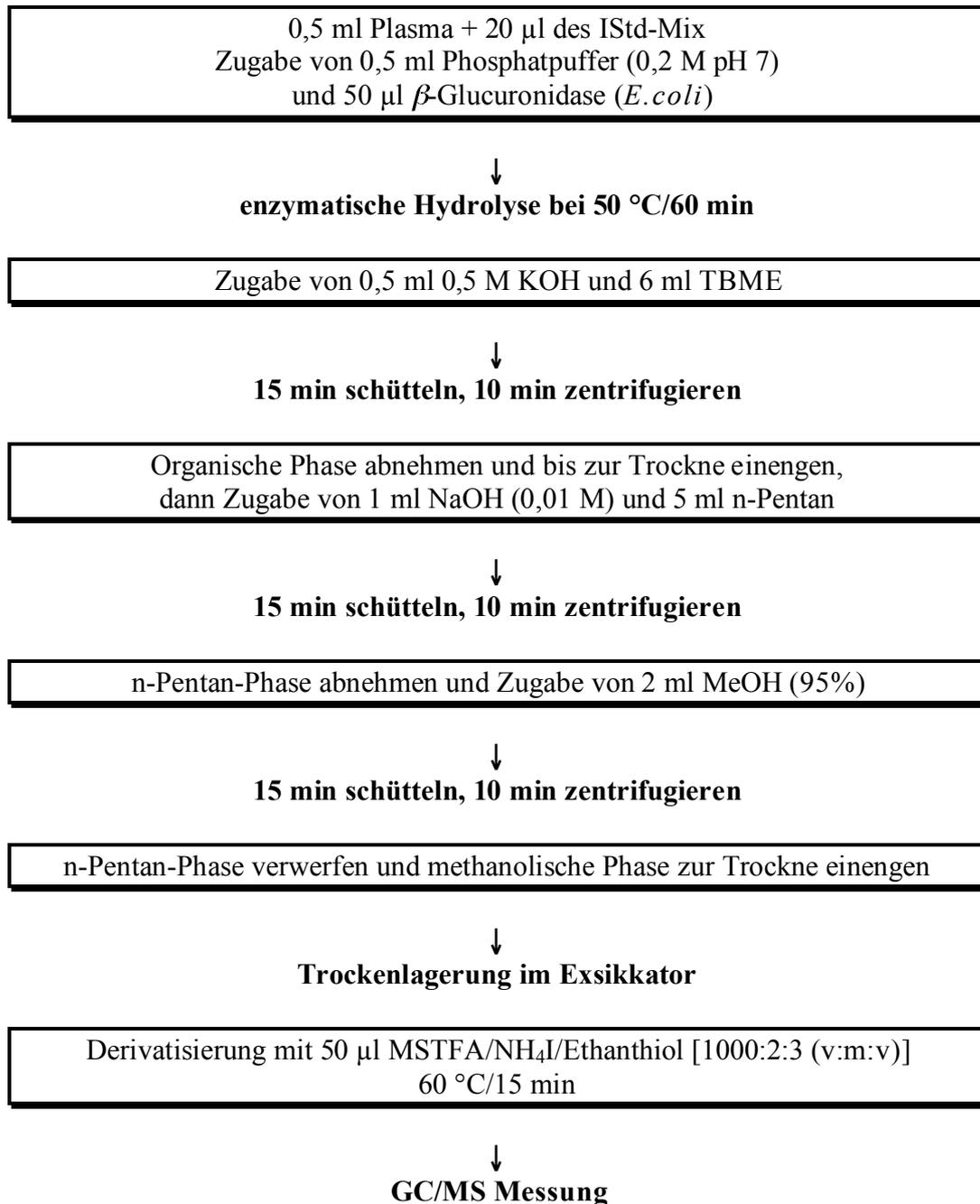
AufarbeitungsschemaGesamtfraktion der Norsteroiden im Plasma

Abbildung 13: Aufarbeitungsschema für die Gesamtfraktion der Norsteroiden im Plasma

*Bestimmung von unkonjugiert vorliegendem Nandrolon*

Die Aufarbeitung der Plasmaproben zur Bestimmung des unkonjugiert vorliegenden („freien“) Nandrolons ( $NL_{unc}$ ) verlief analog der Prozedur für die Gesamtfraktion, jedoch unter Auslassung der enzymatischen Hydrolyse:

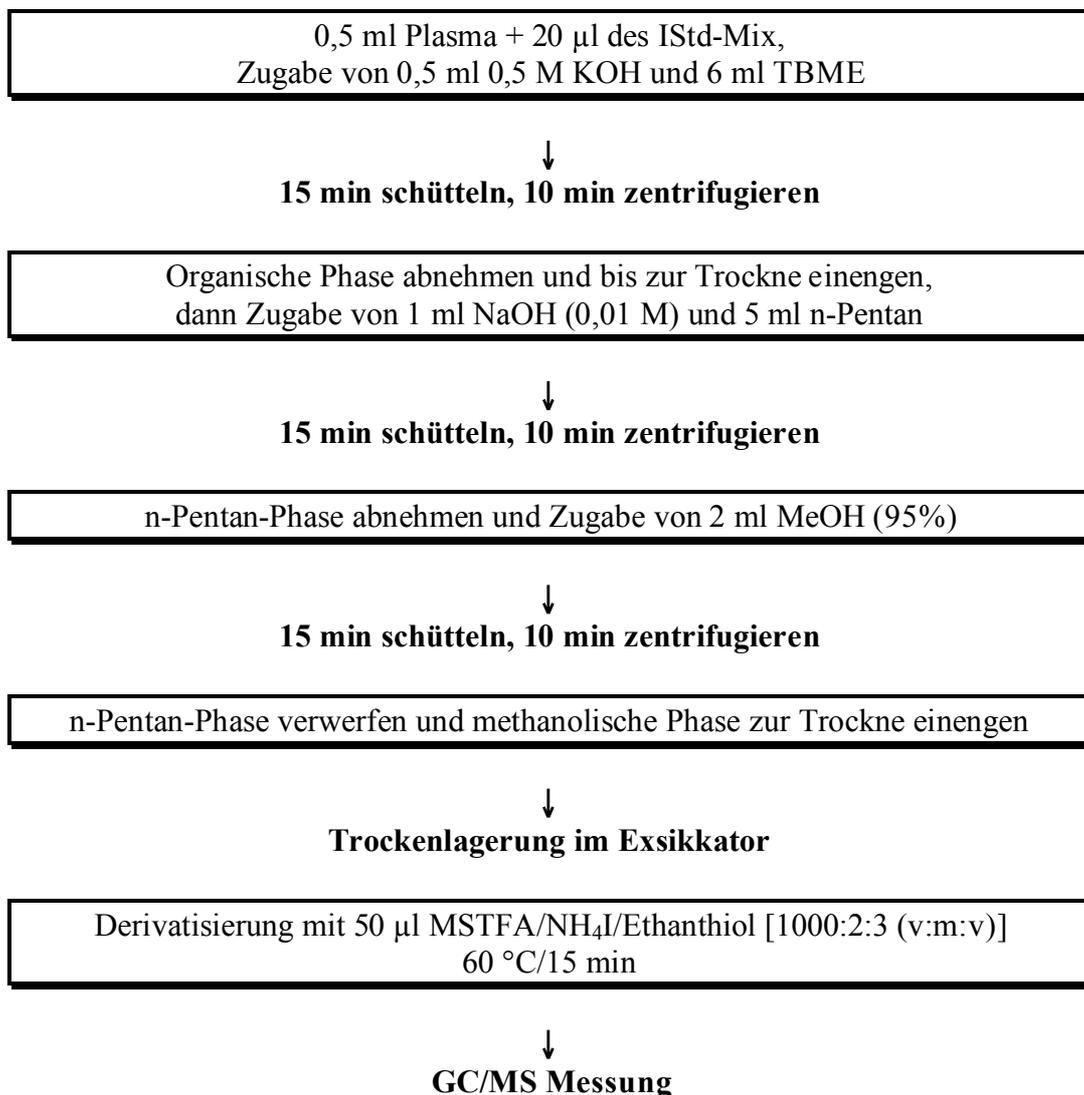
AufarbeitungsschemaFreie Fraktion der Norsteroiden im Plasma

Abbildung 14: Aufarbeitungsschema für die freie Fraktion der Norsteroiden im Plasma

### 3.4.3 GC/MS-Bestimmung

Zur Analyse der aufgearbeiteten Plasmaproben wurde ein GC/MS-System mit Quadrupoldetektor der Firma Agilent mit folgenden Parametern verwendet:

Gas-Chromatograph:	HP 6890
Massenselektiver Detektor:	HP 5973
Injektionsvolumen:	2 $\mu$ l (splitless)
Injektortemperatur:	300 °C
Trärgas:	Helium, 1 ml/min (Constant Flow-Modus)
Trennsäule:	HP-5 MS; 17 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m
Temperaturprogramm:	100 °C – 40 °C/min – 190 °C – 5 °C/min – 240 °C – 40 °C/min– 320 °C, 3 min
Interface-Temperatur:	300 °C
Ionisierung:	EI (70 eV)
Aufnahmemodus:	SIM

Folgende Tabelle gibt die im SIM-Modus aufgezeichneten charakteristischen Ionen der bei der Messung als bis-TMS-Derivate vorliegenden Norsterioide wieder. Die fett dargestellten Werte stellen die jeweils intensivsten Ionen dar, die dann zur Quantifizierung herangezogen wurden.

<i>Norsteroid</i>	<i>m/z</i>	
ND	401	<b>416</b>
NDiol	405	<b>420</b>
NL	403	<b>418</b>
NA	<b>405</b>	420
NE	<b>405</b>	420
d <sub>3</sub> -NDiol	408	<b>423</b>
d <sub>3</sub> -NL	406	<b>421</b>
d <sub>3</sub> -NE	<b>408</b>	423

**Tabelle 7: Charakteristische Fragmentionen der Analyten und IStd**

### 3.4.4 Quantifizierung der Analyten

Die Zuordnung der nach GC/MS-Messung erhaltenen Peaks zu den entsprechenden Analyten erfolgte anhand der Retentionszeiten und der Massenspektren. Für die Quantifizierung wurde das indirekte Kalibrierverfahren genutzt. Dabei wurde die Signalgröße aus den Peakflächen des Analyten und des zugehörigen IStds berechnet (Abbildung 15a)). Die Peakflächen der deuterierten IStds wurden durch Abzug der Isotopensignale der korrespondierenden Analyten korrigiert (Abbildung 15b)).

$$\text{a) Signalgröße} = \frac{A_{\text{Analyt}}}{A_{\text{IStd}}} \qquad \text{b) Signalgröße} = \frac{A_{\text{NL}}}{A_{\text{d}_3\text{-NL}} - (A_{\text{NL}} * 0,03)}$$

**Abbildung 15: Berechnung der Signalgröße a) allgemein, b) mit Flächenkorrektur am Beispiel von NL, wobei die Fläche des deuterierten IStds um ca. 3% des Nandrolonsignals (entspricht Isotop auf  $m/z$  421) korrigiert wird.**

Dieser Quotient wurde anhand einer durch Mehrpunktkalibrierung erhaltenen Regressionsfunktion in die entsprechende Konzentrationsgröße umgerechnet. Innerhalb jeder Probeensequenz wurden Kalibrierproben mit sechs verschiedenen Konzentrationen der Analyten mit aufgearbeitet und vermessen (Konzentrationen siehe Kapitel 3.5.2).

### 3.5 Validierung der analytischen Methode

Die Validierung der analytischen Methode hinsichtlich Linearität, Quantifizierungsgrenze, Richtigkeit, Genauigkeit und Wiederfindung erfolgte anhand der *FDA Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation* (88).

Aufgrund der Ergebnisse der Qualitätsüberprüfung des Produktes *NorDiol 5* (siehe Kapitel 4.2) wurde den Probanden kein  $\Delta^5$ -Norandrostendiol-haltiges Präparat verabreicht und die Methode wurde folglich nicht bezüglich  $\Delta^5$ -NDiol validiert.

In Tabelle 8 sind die Konzentrationen der Standardlösungen dargestellt, die für die Validierung eingesetzt wurden. Da in methanolischen Standardlösungen Stabilitätsprobleme bei Steroiden mit einer 3-Keto-4-en-Struktur auftraten, wurden alle Standardlösungen mit Acetonitril hergestellt.

<i>Analyt</i>	<i>Konzentration in <math>\mu\text{g/ml}</math></i>				
ND	0,002	0,01	0,1	1,0	-
NDiol	0,002	0,01	0,1	-	-
NL	0,002	0,01	0,1	1,0	-
NA	0,002	0,01	0,1	1,0	10
NE	0,002	0,01	0,1	1,0	10

**Tabelle 8: Konzentrationen der Standardlösungen der Analyten und IStds**

Die Methode wurde für alle Analyten der Gesamtfraktion sowie für das unkonjugiert vorliegenden Nandrolon (NL<sub>unc</sub>) validiert, dessen Bestimmung eine variierte Probenaufarbeitung zu Grunde liegt und daher im Folgenden jeweils gesondert aufgeführt wird.

Zur Ermöglichung und Optimierung der quantitativen Auswertung wurde mit deuterierten internen Standards gearbeitet, die den Plasmaproben vor Beginn der Aufarbeitung zugegeben und zur Berechnung folgender Analyten genutzt wurden:

<i>IStd</i>	<i>Konzentration in den Plasmaproben:</i>	<i>Quantifizierung von:</i>
d <sub>3</sub> -NDiol	5 ng/ml	NDiol
d <sub>3</sub> -NL	4 ng/ml	NL, ND
d <sub>3</sub> -NE	40 ng/ml	NA, NE

**Tabelle 9: Konzentrationen und korrespondierende Analyten der deuterierten internen Standards**

### 3.5.1 Arbeitsbereiche

Nach ersten Vorversuchen wurden die entsprechenden Arbeitsbereiche für alle Analyten festgelegt. Sie können Tabelle 10 entnommen werden.

### 3.5.2 Linearität

Die Linearitäten über den entsprechenden Arbeitsbereichen wurden anhand von Kalibrierkurven überprüft, die die Beziehungen zwischen den Messsignalen und bekannten Konzentrationen der Analyten aufzeigen. Dazu wurde Plasmablank mit sechs verschiedenen Konzentrationen der Analyten und 20 µl der IStd-Mischung versetzt („gespiked“), aufgearbeitet und gemessen (jeweils Doppelproben). Es wurden die Quotienten der aus den GC/MS-Chromatogrammen erhaltenen Flächenwerte für Analyt und entsprechendem IStd gebildet und diese gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Nach iterativer Anpassung verschiedener linearer Modelle bis maximal 2. Ordnung und varianzanalytischem Vergleich (ANOVA, Software *R*) wurde jeweils das passendste Modell ausgesucht. Wenn möglich, wurde auf den y-Achsenabschnitt verzichtet. Die berechneten Konzentrationen sollten nicht mehr als 15 % von den Nominalwerten abweichen (max. 20 % bei der niedrigsten Konzentration).

<i>Analyt</i>	<i>Arbeitsbereich</i>	<i>Konzentration (ng/ml)</i>					
ND	0,5–80 ng/ml	0,5	5	20	40	60	80
NDiol	0,5–10 ng/ml	0,5	2	4	6	8	10
NL	0,5–80 ng/ml	0,5	5	20	40	60	80
NA	5–2000 ng/ml	5	200	500	1000	1500	2000
NE	5–2000 ng/ml	5	200	500	1000	1500	2000
NL <sub>unc</sub>	0,5–5 ng/ml	0,5	1	2	3	4	5

**Tabelle 10: Arbeitsbereiche und Konzentrationen der Analyten zur Überprüfung der Linearität**

### 3.5.3 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) wurde anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses (SRV) ermittelt. Dazu wurden Plasmablanks mit verschiedenen Konzentrationen der Analyten gespiked (0,1 ng/ml; 0,2 ng/ml; 0,3 ng/ml; 0,5 ng/ml), aufgearbeitet und mit der beschriebenen GC/MS-Methode gemessen. Als Nachweisgrenze wurde diejenige Analytmenge angesehen, bei der ein SRV der entsprechenden Ionenspur  $\geq 3$  erhalten wurde.

### 3.5.4 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste quantifizierbare Menge eines Analyten. Sie wird auch mit LLOQ (*Lower limit of Quantification*) bezeichnet. Diese Konzentration stellt die untere Begrenzung des Arbeitsbereiches eines Analyten dar und muss mit einer Richtigkeit von 80–120 % und einer Präzision von maximal 20 % bestimmt werden können. Die Bestimmungsgrenzen aller Analyten wurden innerhalb der Überprüfung von Richtigkeit und Präzision jeweils mit fünf geforderten Proben bestätigt.

### 3.5.5 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit ist die systematische Abweichung eines ermittelten Wertes von einem als richtig angesehenen Wert. Die Richtigkeit wird anhand wiederholter Analysen von Proben bestimmt, deren Gehalt an Analyten bekannt ist. Die Präzision einer analytischen Methode beschreibt die zufällige Abweichung von Messwerten um einen Mittelwert.

Je nach Größe des Arbeitsbereiches wurden dazu für die zu bestimmenden Substanzen zwei bis drei Konzentrationen ausgewählt, wobei die niedrigste Konzentration an der Quantifizierungsgrenze lag. Pro Konzentration wurden jeweils fünf Bestimmungen durchgeführt. Als Akzeptanzkriterium für die Richtigkeit gilt eine maximale Abweichung des Mittelwerts von 15 % von dem als richtig angesehenen Wert (bzw. 20 % an der Quantifizierungsgrenze). Die Bestimmung der Präzision erfolgt über die Berechnung der Variationskoeffizienten (CV) für die jeweiligen Konzentrationen, der 15 % (bzw. 20 % an der Quantifizierungsgrenze) nicht übersteigen sollte.

### 3.5.6 Wiederfindung

Die Wiederfindung der Analyten wurde je nach Größe des Arbeitsbereiches anhand von ein oder zwei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Dafür wurden jeweils fünf Plasmablanks mit den in Tabelle 11 aufgeführten Konzentrationen gespiked (W1-W5) und mit weiteren fünf – unbelassenen – Plasmablanks (W6-W10) nach dem entsprechenden Aufarbeitungsschema aufgearbeitet. Nach dem letzten Extraktionsschritt und vor dem Trocknen der methanolischen Phase wurde den Proben W1-W5 der bis dahin fehlende IStd zugegeben, die Proben W6-W10 wurden mit den Analyten und dem IStd gespiked. Nach dem anschließenden Trocknungsschritt, der Derivatisierung und GC/MS-Messung wurden die Mittelwerte (MW) der Flächenwerte der jeweiligen Analyten ( $X_A$ ) und IStds ( $X_{IStd}$ ) ermittelt und die Wiederfindung wie folgt berechnet:

$$\text{Wiederfindung} = \frac{\text{MW} (X_A / X_{IStd})_{W1-W5}}{\text{MW} (X_A / X_{IStd})_{W6-W10}} \times 100$$

<i>Analyt</i>	<i>Konzentrationen (ng/ml)</i>	
ND	5	50
NDiol	5	-
NL	5	50
NA	10	500
NE	10	500
NL <sub>unc</sub>	2,5	-

**Tabelle 11: Konzentrationen der Analyten zur Überprüfung der Wiederfindung**

### 3.6 Pharmakokinetische Auswertung

Die pharmakokinetische Analyse der Konzentrations-Zeit-Verläufe der Wirkstoffe und der bestimmten Metaboliten im Plasma wurde anhand der Zielgrößen  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  und AUC durchgeführt:

- $C_{max}$ : gemessene Spitzenkonzentration im Plasma
- $t_{max}$ : Zeitpunkt der Spitzenkonzentration im Plasma
- AUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the curve*)

Die pharmakokinetischen Kenngrößen  $C_{max}$  und  $t_{max}$  für die Variablen ND, NDiol, NL, NA, NE und  $NL_{unc}$  wurden direkt aus den Messwerten (ohne Kurvenanpassung) bestimmt. Dabei lässt sich aus den  $C_{max}$ -Werten die Intensität der zu erwartenden pharmakodynamischen Effekte von Arzneistoffen abschätzen, die Plasmaspiegelmaximalzeiten erlauben Rückschlüsse auf die Geschwindigkeitskomponente der Bioverfügbarkeit. Die Berechnung der AUC als Maß für den resorbierten Wirkstoffanteil erfolgte anhand von Aufaddition von Trapezsegmenten (Trapezregel, Software: BIAS. for Windows).

### 3.7 Statistische Auswertung

Als statistische Kennwerte wurde der arithmetische MW als Maß der zentralen Tendenz verwendet. Er beschreibt die Summe der singulären Messwerte ( $x_1-x_n$ ), geteilt durch deren Anzahl ( $n$ ). Als Streuungsmaßzahl wurde die Standardabweichung (SD) berechnet, die sich aus der Quadratwurzel der Varianz ergibt. Die Varianz einer Verteilung ist definiert als Summe der quadrierten Abweichungen aller Messwerte vom arithmetischen Mittelwert, dividiert durch die Anzahl aller Messwerte.

Um zu ermitteln, ob die unterschiedlichen Formulierungen von Kapsel (Kps) bzw. Sublingualtablette (Subl) Einfluss auf die pharmakokinetischen Kenngrößen  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  und AUC der Variablen ND, NDiol, NL, NA, NE, und  $NL_{unc}$  haben, wurden diese jeweils innerhalb der entsprechenden Behandlungsgruppen ND oder NDiol verglichen. Die pharmakokinetischen Kenngrößen  $C_{max}$  und AUC wurden für alle Variablen anhand des Kolmogorov-

---

Smirnov-Tests auf Normalverteilung überprüft und mit Hilfe des gepaarten t-Tests verglichen. Für die Auswertung der nicht einer Normalverteilung unterliegenden  $t_{max}$ -Werte wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben herangezogen. Alle Tests erfolgten zum Signifikanzniveau von 5 %. Da es sich bei dieser Untersuchung um Signifikanztests bezüglich mehrerer voneinander abhängiger Zielvariablen der gleichen Stichprobe handelt, wurde eine  $\alpha$ -Adjustierung nach Bonferroni vorgenommen (89). Hierbei wird das angestrebte multiple Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  eingehalten, wenn die einzelnen Test zu  $\alpha = 0,05/k$  ( $k = \text{Anzahl der Variablen}$ ) durchgeführt werden. Pro Prohormon-Studie wurde entweder ND oder NDiol sowie NL, NA, NE, und NL<sub>unc</sub> in den Plasmaproben bestimmt, so dass es sich jeweils um fünf abhängige Variablen handelt. Die Entscheidung für signifikant unterschiedliche Verhalten wird somit erst ab  $p < 0,01$  getroffen. Die Berechnungen wurden mit der Software *R* (90) und *Excel 2004* durchgeführt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Analytik der Referenzverbindungen

Im Folgenden sind die EI-Massenspektren der Analyten und IStds aufgeführt, die als bis-TMS-Derivate vermessen wurden. Die Spektren wurden in 3 Abbildungen zusammengefasst, die jeweils den/die Analyten und den zu dessen/deren Quantifizierung genutzten IStd beinhalten.

Abbildung 16 a)–c) zeigt die Massenspektren der bis-TMS-Derivate von ND, NL und dem IStd  $d_3$ -NL. Die entsprechenden Molekülonen ( $M^+$ ) sind bei  $m/z$  416, 418 bzw. 421 vorzufinden. Dabei ist der Wert von  $d_3$ -NL durch das Vorhandensein von drei Deuteriumatomen im Vergleich zu NL um 3 Da erhöht. Jeweils ein charakteristisches Fragmention entsteht durch die Elimination eines Methylradikals zu  $M^+-15$ . Da die Molekülonen bedingt durch das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem recht stabil sind, kommt es nur zu einer geringen Ausbeute weiterer charakteristischer Fragmentionen.

Die Molekülonen von NDiol und  $\Delta^5$ -NDiol liegen bei  $m/z$  420 und für den dreifach deuterierten IStd  $d_3$ -NDiol entsprechend bei  $m/z$  423 (Abbildung 17 a)–c)). Die Massenspektren der Diol-Verbindungen zeigen deutliche Fragmentierungsvorgänge. So treten charakteristische Fragmentionen bei  $m/z$  405 bzw. 408,  $m/z$  330 bzw. 333 und  $m/z$  315 bzw. 318 auf. Diese – und weitere dieser Folge – erklären sich durch Elimination eines Methylradikals (-15 Da) und Trimethylsilanolgruppen (TMSOH, -90 Da). Während bei den  $\Delta^4$ -Verbindungen der Basispeak durch das Molekülon repräsentiert wird, zeigt sich beim  $\Delta^5$ -NDiol der Basispeak bei  $m/z$  330 ( $M^+-90$ ). Ein typisches Fragmention für sowohl 3- als auch 17-hydroxylierte Steroide zeigt sich bei  $m/z$  129. Dabei resultiert analog für das  $d_3$ -NDiol das aus dem D-Ring stammende Fragmention  $m/z$  131, welches jedoch nur noch zwei Deuteriumatome beinhaltet (91). Das Fragmention  $m/z$  142 entstammt dem undeuterierten A-Ring und ist somit unverändert in den Massenspektren der drei Verbindungen erkennbar.

Abbildung 18 a)–c) zeigt die Massenspektren der bis-TMS-Derivate von NA, NE und dem IStd d<sub>3</sub>-NE. Die Molekülionen liegen bei  $m/z$  420 bzw. 423. Die entsprechenden Basispeaks ergeben sich jeweils aus der Abspaltung eines Methylradikals zu  $M^+ - 15$ . Charakteristische Fragmentationen entstehen weiterhin durch konsekutive Elimination von Trimethylsilanolgruppen (jeweils - 90 Da). Das aus dem C/D-Ring stammende Fragmentation bei  $m/z$  169 repräsentiert ein diagnostisches Zerfallsprodukt, das bei TMS-Derivaten von 17-Keto-Steroiden auftritt (91) und demnach unverändert im Massenspektrum des d<sub>3</sub>-NE-bis-TMS vorkommt.

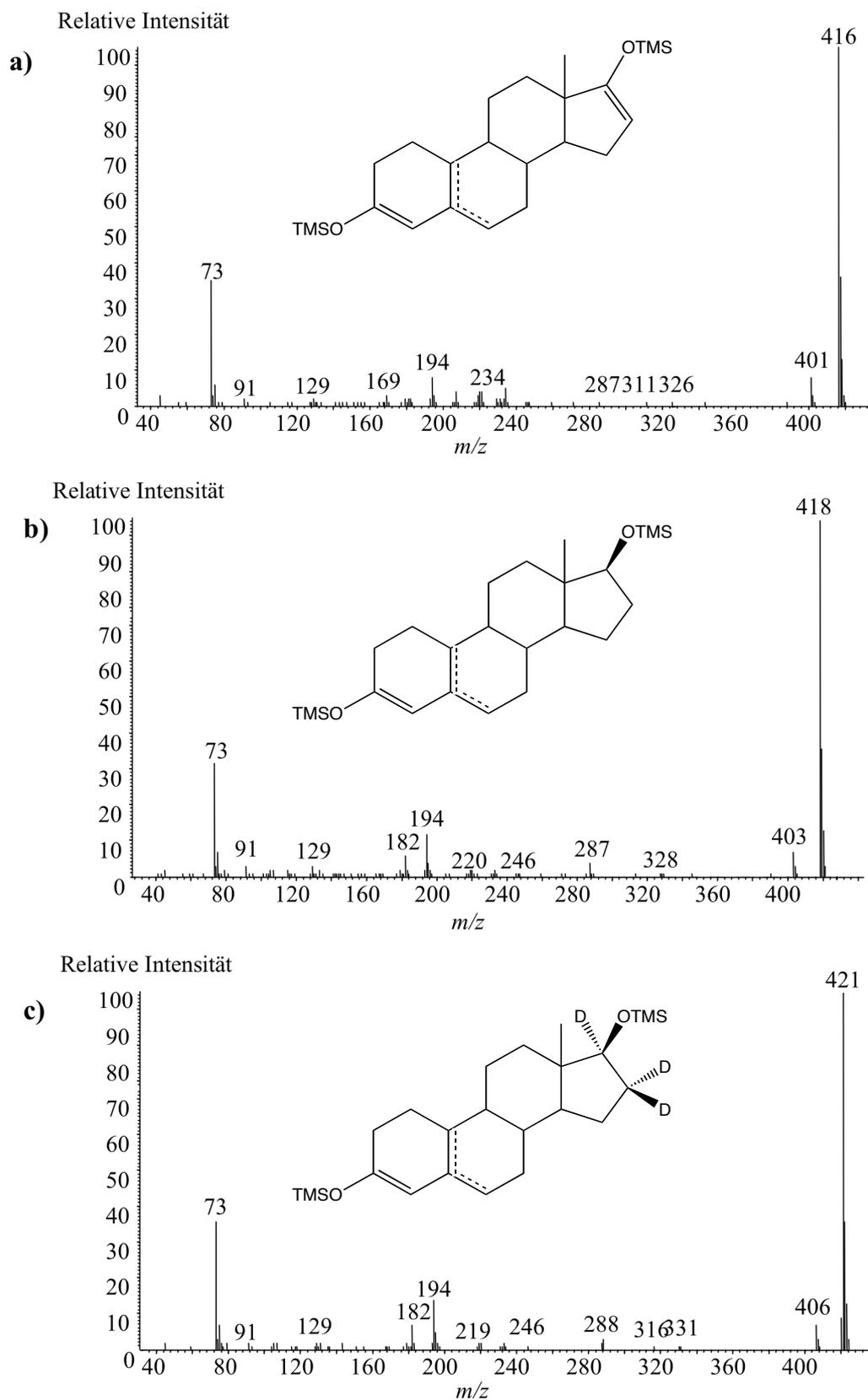


Abbildung 16: EI-Massenspektren der bis-TMS-Derivate von a) Norandrostendion ( $M_W = 416$ ), b) Nandrolon ( $M_W = 418$ ) und dem ISTD  $d_3$ -Nandrolon ( $M_W = 421$ )

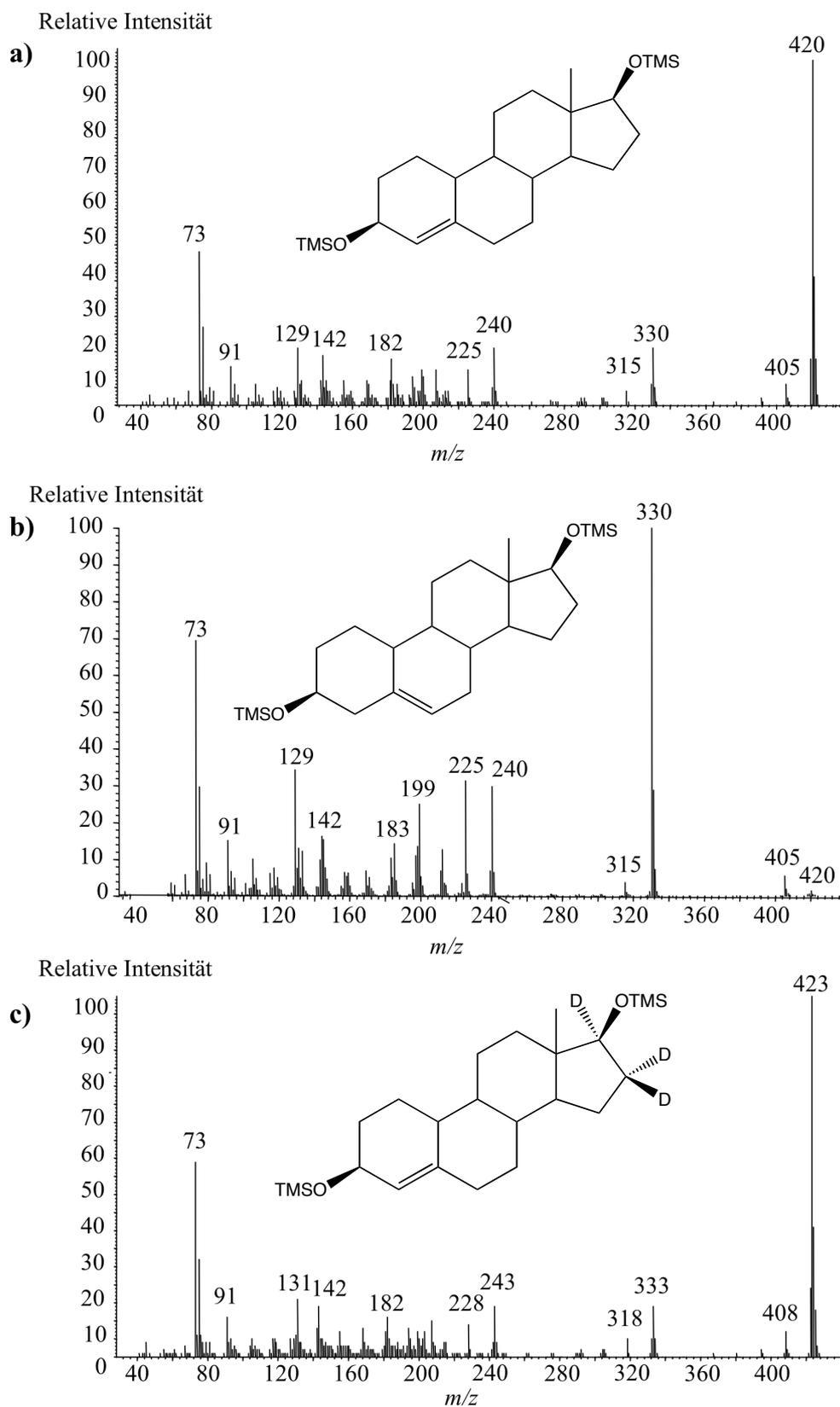


Abbildung 17: EI-Massenspektren der bis-TMS-Derivate von a)  $\Delta^4$ -Norandrostendiol ( $M_w = 420$ ), b)  $\Delta^5$ -Norandrostendiol ( $M_w = 420$ ) und dem ISTD  $d_3$ -Norandrostendiol ( $\Delta^4$ ,  $MW = 423$ )

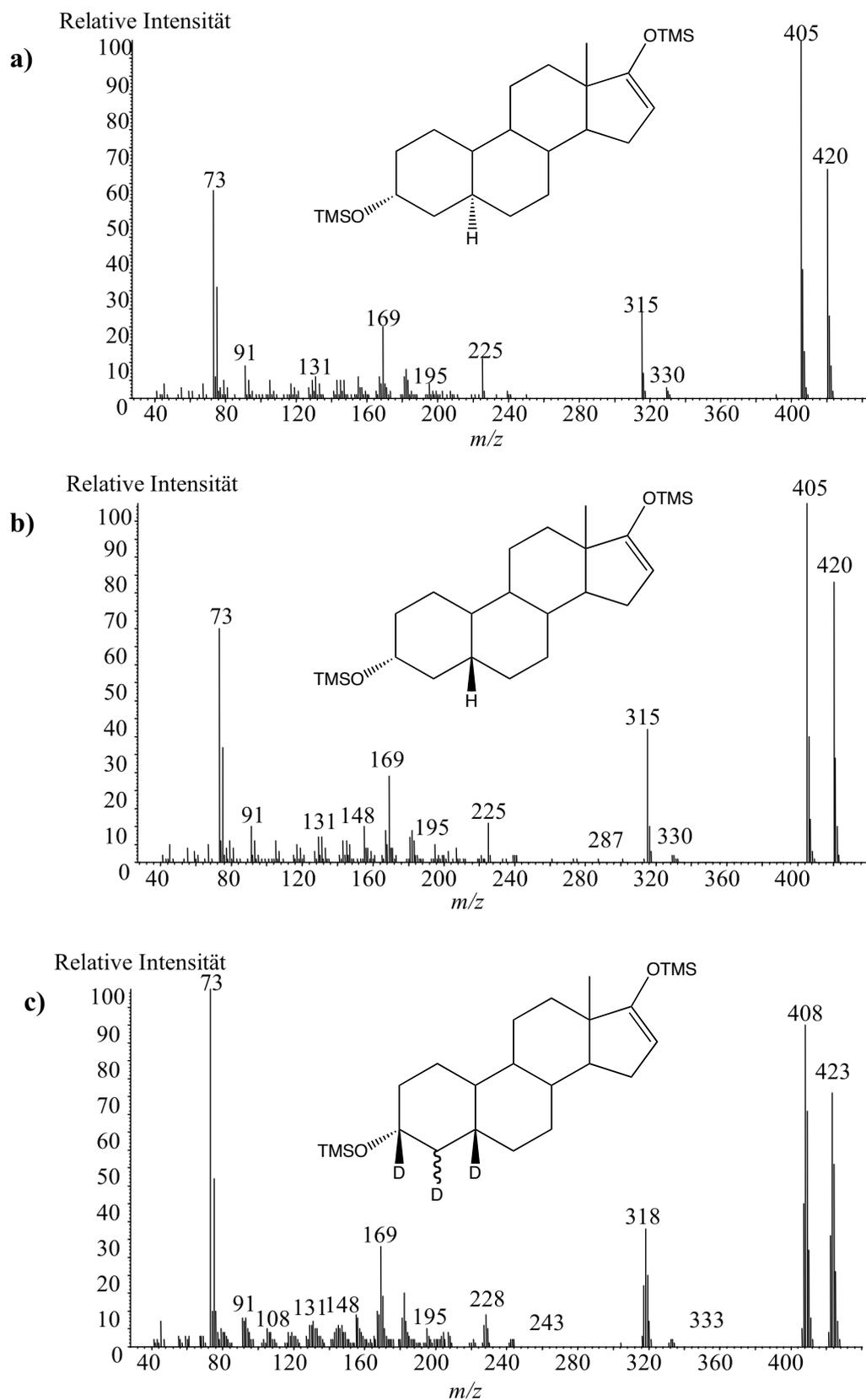


Abbildung 18: EI-Massenspektren der bis-TMS-Derivate von a) Norandrosteron ( $M_W = 420$ ), b) Nor-etiocolanolon ( $M_W = 420$ ) und dem Istd  $d_3$ -Noretiocholanolon ( $MW = 423$ )

## 4.2 Überprüfung der Prohormon-Präparate

Die Überprüfung der Prohormon-Präparate erfolgte anhand eines Vergleichs der Retentionszeiten und Massenspektren der Referenzverbindungen mit den aus den Präparaten extrahierten Substanzen (jeweils als bis-TMS-Derivate gemessen).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zugesammengefasst, in der jeweils die Retentionszeiten sowie charakteristische Fragmentationen aufgeführt sind. Anhand der gewonnenen Daten konnten die Identität der Inhaltsstoffe aus den Produkten, die laut Etikett Norandrostendion oder  $\Delta^4$ -Norandrostendiol enthalten sollten, bestätigt werden. Jedoch zeigten die Daten des *NorDiol 5*-Produktes keine Übereinstimmung mit der Referenzsubstanz  $\Delta^5$ -Norandrostendiol. Die auffällige Erhöhung der charakteristischen Ionen im Massenspektrum des extrahierten Produktes um jeweils 14 Da ließ vermuten, dass es nicht um ein Norsteroid, sondern um eine Verbindung mit Androstan-Grundgerüst handelt.

<i>Referenz/ Prohormon-Präparat</i>	<i>Retentionszeit (min)</i>	<i>Charakteristische Ionen m/z (rel. Intensität)</i>			
<b>ND</b>	<b>5.97</b>	<b>416 (100)</b>	<b>401 (10)</b>	<b>194 (8)</b>	<b>169 (5)</b>
<i>19-Norandrostenedione</i>	5.96	416 (100)	401 (12)	194 (5)	169 (5)
<i>NorCycloDione</i>	5.95	416 (100)	401 (10)	194 (8)	169 (5)
<b>NDiol</b>	<b>5.84</b>	<b>420 (100)</b>	<b>405 (8)</b>	<b>142 (15)</b>	<b>129 (35)</b>
<i>Norandrodiol</i>	5.82	420 (100)	405 (8)	142 (15)	129 (25)
<i>Cyclo-Nordioli</i>	5.83	420 (100)	405 (8)	142 (15)	129 (30)
<b><math>\Delta^5</math>-NDiol</b>	<b>5.79</b>	<b>420 (3)</b>	<b>405 (8)</b>	<b>330 (100)</b>	<b>129 (35)</b>
<i>NorDiol 5</i>	5.95	434 (35)	419 (15)	334 (70)	129 (65)

**Tabelle 12: Retentionszeiten und charakteristische Ionen der Referenzverbindungen und der extrahierten Prohormon-Präparate nach GC/MS-Messung der bis-TMS-Derivate**

Durch weitere Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem Inhalt des Präparates *NorDiol 5* um 5-Androstendiol (Androst-5-en-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) handelte, dessen Massenspektrum in Abbildung 19 gezeigt wird. Aufgrund dieses Analysenergebnisses konnte dieses Präparat nicht in der klinischen Studie eingesetzt werden. Da zu diesem Zeitpunkt die Vermarktung von  $\Delta^5$ -NDiol-haltigen Nahrungsergänzungsmitteln in den USA eingestellt wurde, war es nicht möglich, ein Alternativpräparat für die klinische Studie zu besorgen.

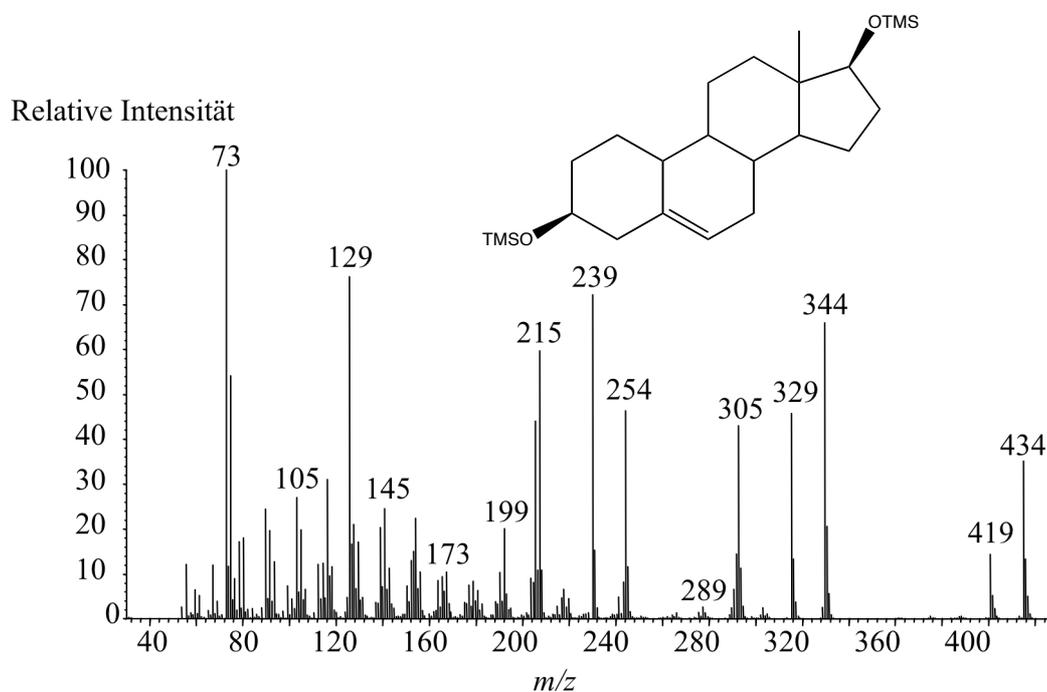
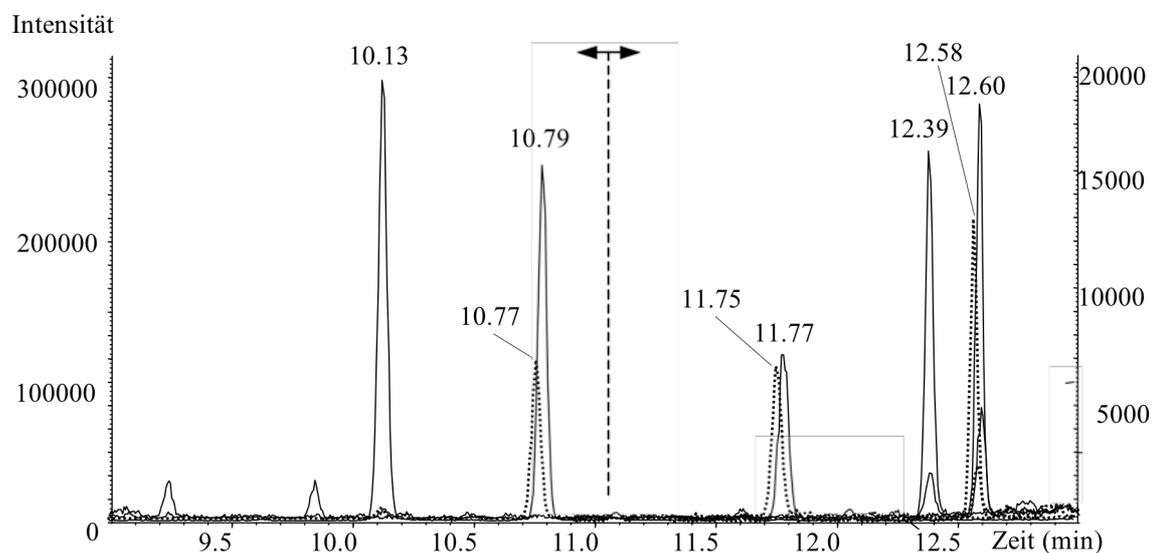


Abbildung 19: Massenspektrum von 5-Androstendiol-bis-TMS

### 4.3 GC/MS-Bestimmung der Analyten nach Probenaufarbeitung

Zur Bestimmung der Retentionszeiten aller Analyten nach Probenaufarbeitung wurde ein Plasmablank mit jeweil 50 ng/ml NA und NE sowie 5 ng/ml ND, NDiol und NL und dem IStd-Gemisch (40 ng/ml d<sub>3</sub>-NE, 5 ng/ml d<sub>3</sub>-NDiol, 4 ng/ml d<sub>3</sub>-NL) versetzt, aufgearbeitet und mit der GC/MS-Methode für Plasmaproben (siehe 3.4.3) gemessen. Das in Abbildung 20 dargestellte Chromatogramm wurde durch Extraktion der charakteristischen Ionenspuren der entsprechenden Norsteroiden gewonnen. Dabei werden die Peaks der IStds durch eine gepunktete Linienführung verdeutlicht. Die Zuordnung der Analyten und IStds zu diesen Ionen und den ermittelten Retentionszeiten erfolgt in Tabelle 13. Zur besseren optischen Darstellung der unterschiedlich starken Intensitäten wurde eine zweite Größenachse in das Diagramm eingeführt. Die Intensitäten der Peaks mit einer Retentionszeit > 11 min (rechts der gestrichelten Linie) beziehen sich demnach auf diese rechts positionierte zweite y-Achse.



**Abbildung 20:** GC/MS-Chromatogramm nach Aufarbeitung einer Plasmaprobe mit 50 ng/ml NA und NE sowie 5 ng/ml ND, NDiol und NL und dem IStd (40 ng/ml d<sub>3</sub>-NE, 5 ng/ml d<sub>3</sub>-NDiol, 4 ng/ml d<sub>3</sub>-NL), Messung als bis-TMS-Derivate, Extraktion der charakteristischen Ionenspuren

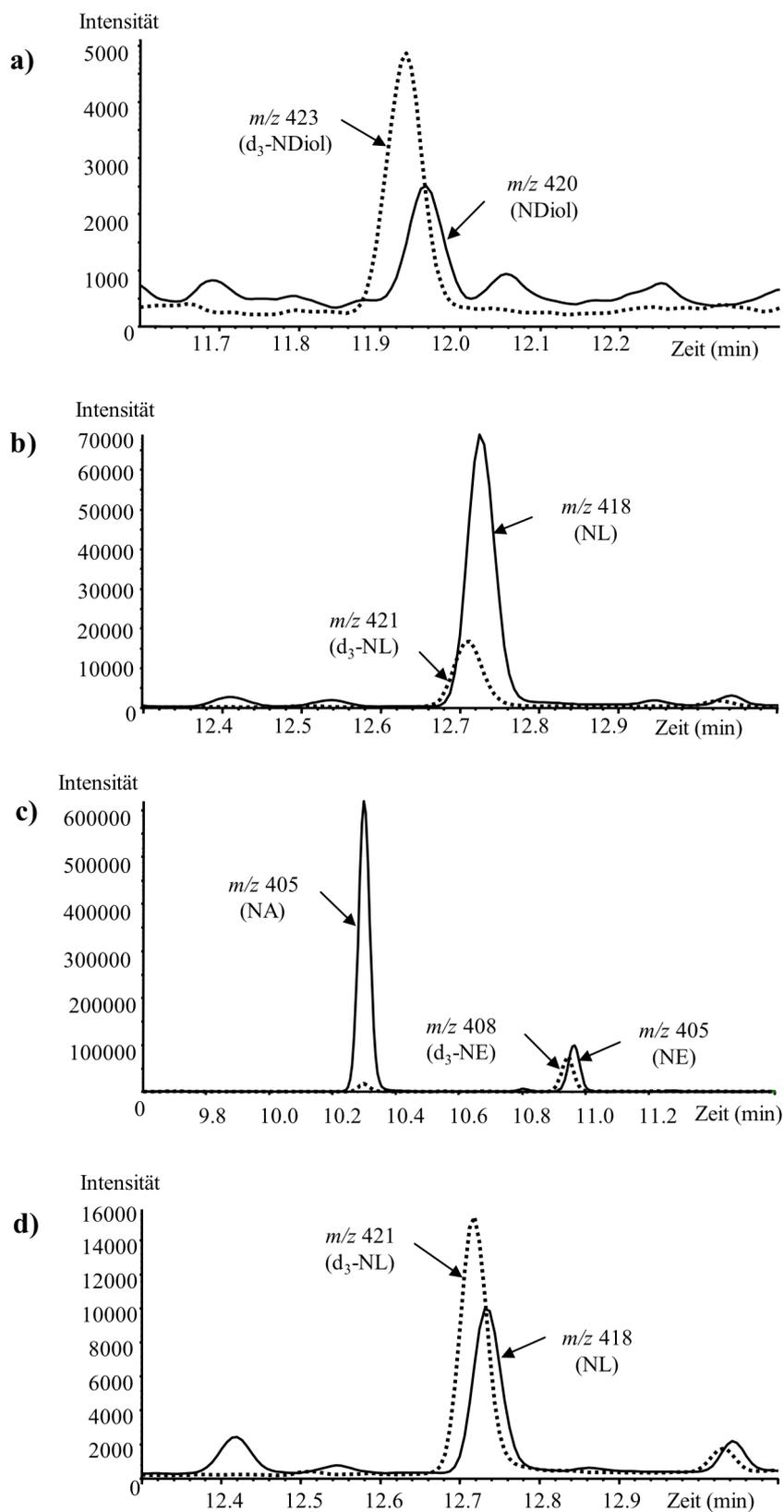
<i>Retentionszeit (min)</i>	<i>Norsteroid</i>	<i>Charakteristisches Ion (m/z)</i>
10.13	NA	405
10.77	d <sub>3</sub> -NE	408
10.79	NE	405
11.75	d <sub>3</sub> -NDiol	423
11.77	NDiol	420
12.39	ND	416
12.58	d <sub>3</sub> -NL	421
12.60	NL	418

**Tabelle 13: Zuordnung der Norsterioide zu den Retentionszeiten über die extrahierten Ionenspuren (m/z)**

Zur Verdeutlichung werden in Abbildung 21 die extrahierten Ionenchromatogramme nach GC/MS-Analyse einer realen Plasmaprobe aus dieser Studie gezeigt. Die IStds sind wiederum durch gepunktete Linien kenntlich gemacht. Die Plasmaprobe wurde dem Probanden V1 eine Stunde nach Einnahme von 25 mg NDiol (als Sublingualtablette) abgenommen. Die Probe wurde sowohl für die Analyse der Gesamtfraktion der Norsterioide aufgearbeitet (Abbildung 21 a)–c)) als auch für NL<sub>unc</sub> (Abbildung 21 d)). Die Tabelle 14 zeigt die berechneten Konzentrationen der entsprechenden Norsterioide:

<i>Norsteroid</i>	<i>Konzentration (ng/ml)</i>
NDiol	1,8
NL	11,9
NA	109,2
NE	20,7
NL <sub>unc</sub>	2,2

**Tabelle 14: Ermittelte Konzentrationen der Analyten eine Stunde nach Applikation von 25 mg NDiol als Sublingualtablette bei einem Probanden (V1)**



**Abbildung 21: GC/MS-Analyse einer Plasmaprobe, die eine Stunde nach Einnahme von 25 mg NDiol als Sublingualtablette abgenommen wurde. Die Analyten sind mit durchgezogenen Linien, die IStds mit gepunkteten Linien kenntlich gemacht (Konzentrationen siehe Tabelle 14).**

## 4.4 Validierung der analytischen Methode

Neben einer kurzen Darstellung der Ergebnisse der Methodvalidierung für alle Analyten werden im Folgenden jeweils beispielhaft die Ergebnisse für NL<sub>unc</sub> detailliert aufgeführt.

### 4.4.1 Linearität

Für alle Analyten konnte eine lineare Abhängigkeit der Messsignale von den eingesetzten Konzentrationen über den jeweiligen Arbeitsbereich bestätigt werden (Tabelle 10). Dabei konnte für die Berechnungen aller Analyten auf die Berücksichtigung des y-Achsenabschnitts verzichtet werden. Die berechneten Konzentrationen wichen in keinem Fall mehr als 15 % von den Nominalwerten ab.

<i>Analyt</i>	<i>Arbeitsbereich</i>	<i>Korrelationskoeffizient (<math>R^2</math>)</i>	<i>Kalibrierfunktion</i>
ND	0,5–80 ng/ml	0,9983	$y = 0,2516x$
NDiol	0,5–10 ng/ml	0,9975	$y = 0,1846x$
NL	0,5–80 ng/ml	0,9989	$y = 0,2963x$
NA	5–2000 ng/ml	0,9974	$y = 0,061x$
NE	5–2000 ng/ml	0,9979	$y = 0,0578x$
NL <sub>unc</sub>	0,5–5 ng/ml	0,9998	$y = 0,2869$

**Tabelle 15: Arbeitsbereiche und Konzentrationen der Analyten zur Überprüfung der Linearität**

### Überprüfung der Linearität für $NL_{unc}$

Bei der Überprüfung der Linearität für  $NL_{unc}$  ergab die Varianzanalyse keine signifikante Verringerung der Restvarianz beim Vergleich der linearen Funktion mit der Funktion 2. Ordnung ( $p = 0,51$ ) oder unter Einbeziehung des Ordinatenabschnitts ( $p = 0,91$ ).

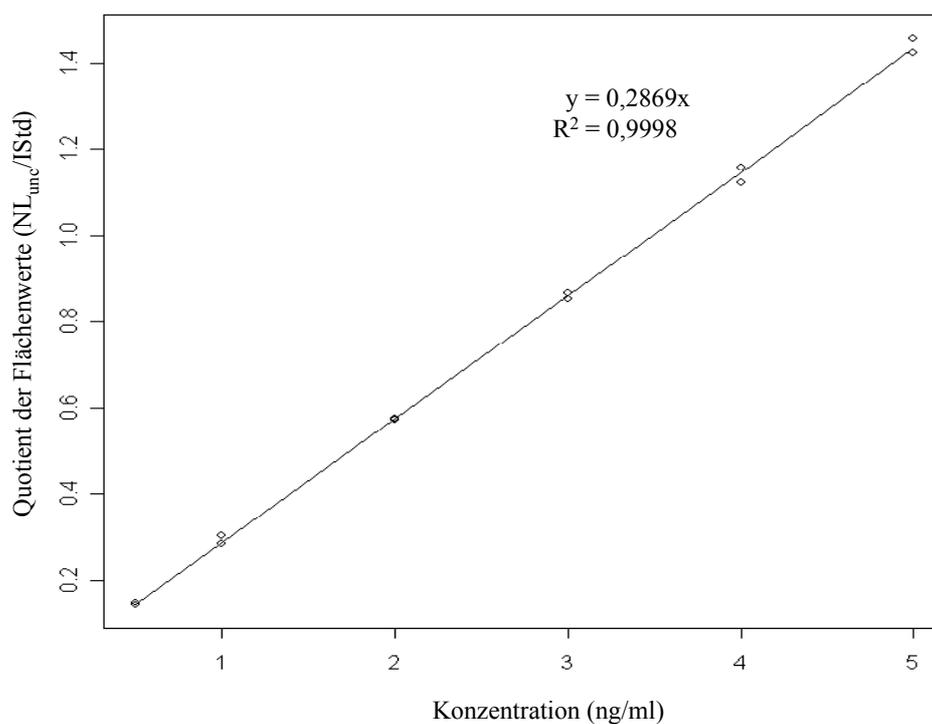


Abbildung 22: Diagramm zur Ermittlung der Kalibrierfunktion von  $NL_{unc}$

eingesetzte Konzentration (ng/ml)	Flächenwert $NL_{unc}$	Flächenwert $IStd$ ( $d_3$ -NL, korrigiert)	Quotient $NL_{unc}/IStd$	Berechnete Konzentration (ng/ml)	entspricht dem Nominalwert zu
0,5	4077	29005	0,1406	0,49	98 %
0,5	5819	39745	0,1464	0,51	102 %
1,0	8251	29225	0,2823	0,98	98 %
1,0	12636	41885	0,3017	1,05	105 %
2,0	12644	22047	0,5735	2,00	100 %
2,0	10707	18698	0,5726	2,00	100 %
3,0	22451	25914	0,8663	3,02	101 %
3,0	19490	22839	0,8534	2,97	99 %
4,0	18804	16762	1,1218	3,91	98 %
4,0	43447	37564	1,1566	4,03	101 %
5,0	47766	32761	1,4580	5,08	102 %
5,0	41163	28885	1,4251	4,97	99 %

Tabelle 16: Berechnung der Ist-Konzentration über die Flächenwerte von  $NL_{unc}$  und  $d_3$ -NL

#### 4.4.2 Nachweisgrenze

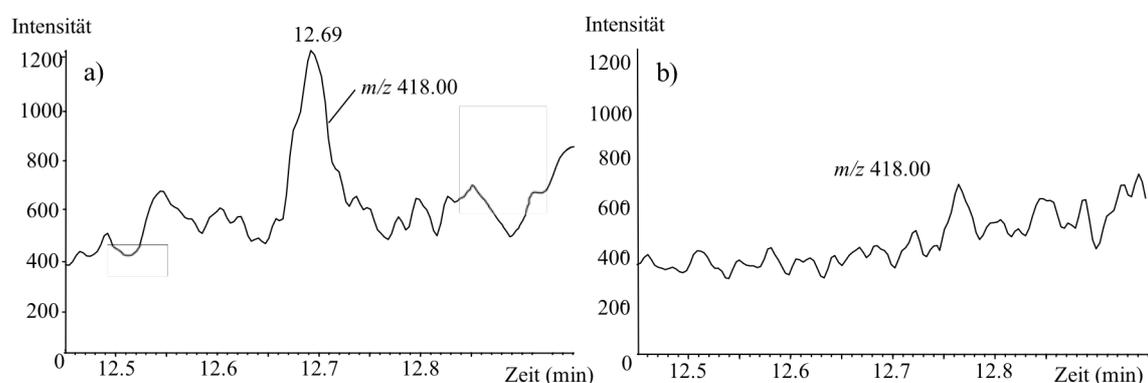
Die Nachweisgrenzen (LOD) lagen für alle Analyten zwischen 0,2–0,3 ng/ml und sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Analyt	LOD (ng/ml)
ND	0,2
NDiol	0,3
NL	0,2
NA	0,2
NE	0,2
NL <sub>unc</sub>	0,2

**Tabelle 17: Nachweisgrenzen der Analyten**

#### Nachweisgrenze von NL<sub>unc</sub>

Eine mit 0,2 ng/ml NL versetzte Plasmaprobe erzielte nach Aufarbeitung und GC/MS-Messung eine Signalhöhe für NL<sub>unc</sub> von etwa 800 bei einem Basisrauschen von ca. 250. Das entsprechende Chromatogramm für  $m/z$  418 ist in Abbildung 23 a) dargestellt. Zum Vergleich ist das entsprechende Zeitfenster für  $m/z$  418 eines ungespiketen Plasmablanks mit aufgeführt (Abbildung 23 b)).



**Abbildung 23: GC-MS-Chromatogramm für  $m/z$  418 einer Plasmaprobe mit 0,2 ng/ml NL (a) sowie eines Plasmablanks (b)**

### 4.4.3 Bestimmungsgrenze

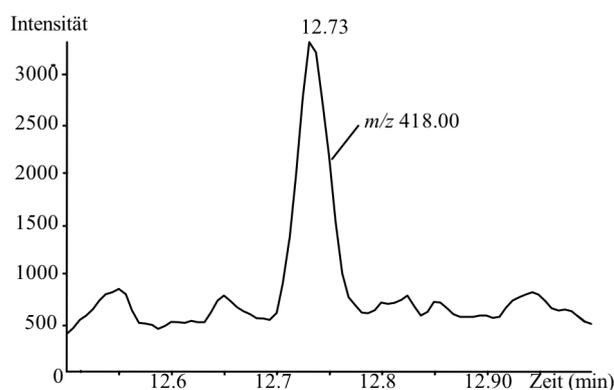
Die Bestimmungsgrenzen (LLOQ) für alle Analyten sind samt den ermittelten Werten der definierenden Kenngrößen Richtigkeit und Präzision in Tabelle 18 aufgeführt. Die mit 5,0 ng/ml relativ hohen LLOQs für NA und NE resultieren aus dem Ausmaß der Arbeitsbereiche (bis 2000 ng/ml). Alle Werte für Richtigkeit und Präzision blieben in dem geforderten Rahmen von  $\leq 20\%$ . Für die Berechnungen der Plasmakonzentrationen werden Konzentrationen, die unter den LLOQs liegen mit  $0,0\text{ ng/ml}$  aufgeführt.

<i>Analyt</i>	<i>LLOQ (ng/ml)</i>	<i>Richtigkeit (Abweichung vom Nominalwert)</i>	<i>Präzision, CV</i>
ND	0,5	9,2 %	4,6 %
NDiol	0,5	11,4 %	6,5 %
NL	0,5	5,5 %	2,5 %
NA	5,0	12,2 %	3,1 %
NE	5,0	10,4 %	2,1 %
NL <sub>unc</sub>	0,5	9,9 %	7,4 %

**Tabelle 18:** Auflistung der LLOQs mit den ermittelten Werten für Richtigkeit und Präzision

#### *Bestimmungsgrenze von NL<sub>unc</sub>*

Die Abbildung 24 zeigt das GC/MS-Chromatogramm für NL<sub>unc</sub> ( $m/z$  418) nach Aufarbeitung einer mit 0,5 ng/ml NL versetzten Plasmaprobe. Diese Konzentration entspricht dem LLOQ von NL<sub>unc</sub>.



**Abbildung 24:** GC-MS-Chromatogramm einer Plasmaprobe mit 0,5 ng/ml NL ( $m/z$  418)

#### 4.4.4 Richtigkeit und Präzision

Die Werte für Richtigkeit und Präzision bei der Bestimmung aller Analyten lag innerhalb der geforderten Grenzen von jeweils  $\leq 15\%$ .

<i>Analyt</i>	<i>eingesetzte Konzentration (ng/ml)</i>	<i>Richtigkeit (Abweichung vom Nominalwert)</i>	<i>Präzision, CV</i>
ND	0,5	9,2 %	4,6 %
	25	7,0 %	1,0 %
	80	3,0 %	3,0 %
NDiol	0,5	11,4 %	6,5 %
	10	0,4 %	2,2 %
NL	0,5	5,5 %	2,5 %
	25	7,6 %	2,2 %
	80	1,7 %	1,6 %
NA	5,0	12,2 %	3,1 %
	400	1,1 %	1,1 %
	2000	4,3%	0,6 %
NE	5,0	10,4 %	2,1 %
	400	2,0 %	2,3 %
	2000	4,9 %	1,1 %
NL <sub>unc</sub>	0,5	9,9 %	7,4 %
	5	4,8 %	1,7 %

**Tabelle 19: Bestimmung von Richtigkeit und Präzision für alle Analyten**

*Richtigkeit und Präzision von  $NL_{unc}$* 

Die Ergebnisse für die Richtigkeit und die Präzision bei der Bestimmung von  $NL_{unc}$  können Tabelle 20 entnommen werden. Die Berechnung erfolgte mit je fünf Proben bei zwei verschiedenen Konzentrationen.

<i>eingesetzte Konzentration (ng/ml)</i>	<i>berechnete Konzentration (ng/ml)</i>	<i>entspricht dem Nominalwert zu</i>	
0,5	0,56	112,6 %	
0,5	0,58	116,5 %	
0,5	0,57	113,0 %	
0,5	0,47	93,8 %	
0,5	0,57	113,4 %	
	0,55	109,9 %	MW
		9,9 %	Abw. vom Nominalwert
		7,4 %	CV
5	4,70	94,1 %	
5	4,72	94,4 %	
5	4,83	96,5 %	
5	4,87	97,5 %	
5	4,66	93,3 %	
	4,76	95,2 %	MW
		4,8 %	Abw. vom Nominalwert
		1,7 %	CV

**Tabelle 20: Berechnung von Richtigkeit und Präzision am Beispiel von  $NL_{unc}$**

#### 4.4.5 Wiederfindung

Die Wiederfindungsraten aller Analyten lag zwischen ca. 50–80 %.

<i>Analyt</i>	<i>eingesetzte Konzentration (ng/ml)</i>	<i>Wiederfindung</i>
ND	5	68,6 %
	50	66,4 %
NDiol	5	53,8 %
NL	5	66,1 %
	50	67,8 %
NA	10	74,8 %
	500	81,1 %
NE	10	74,3 %
	500	75,6 %
NL <sub>unc</sub>	2,5	61,8 %

**Tabelle 21: Wiederfindungsraten für alle Analyten**

#### *Bestimmung der Wiederfindung von NL<sub>unc</sub>*

<i>Probe</i>	<i>Quotient der Flächenwerte (NL<sub>unc</sub>/IStd)</i>		
W1	0,4096		
W2	0,4893		
W3	0,4303		
W4	0,4379		
W5	0,4746	MW W1–W5	0,4484
W6	0,6219		
W7	0,7751		
W8	0,7444		
W9	0,7278		
W10	0,7595	MW W6–W10	0,7257
		Wiederfindung	61,8 %

**Tabelle 22: Bestimmung der Wiederfindungsrate von NL<sub>unc</sub> bei einer Konzentration von 2,5 ng/ml**

#### 4.5 Plasmakonzentrationen der untersuchten Norsteroiden nach Applikation der Prohormon-Präparate

Im Folgenden werden die Resultate der Quantifizierungen der Analyten ND bzw. NDiol, NL, NA und NE – jeweils bestimmt als Gesamtfraktion, die sowohl die konjugierten, als auch die unkonjugierten Analyten erfasst – sowie das frei vorliegende  $NL_{unc}$  in den Plasmaproben der Probanden V1–V8 vorgestellt.

Die Ergebnisdarstellung erfolgt separat für jeden der vier durchgeführten Ausscheidungsversuche. Die ermittelten Plasmakonzentrationen für jeweils einen Analyten werden dabei in Diagrammform präsentiert und diskutiert. Die dargestellten individuellen Profile aller acht Probanden vermitteln neben dem Verlauf der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve vor allem einen Eindruck über die interindividuelle Streuung. Auf die Verwendung von Mittelwertsprofilen wurde aufgrund der o. g. Streuung verzichtet, da diese zu einer zu großen Datenreduktion und Artefaktbildung durch stark abweichendes Verhalten von z. B. V8 in Versuch 3 führen würden. Im Anhang dieser Arbeit sind für jeden einzelnen Probanden die im Untersuchungszeitraum festgestellten Konzentrationen aller Analyten in tabellarischer Form dargestellt (Kapitel 6.1, Tabelle 26–Tabelle 36).

#### 4.5.1 Orale Applikation von 100 mg Norandrostendion

##### *Plasmaspiegelverläufe von Norandrostendion*

Nach Applikation einer 100 mg Kapsel ND (*19-Norandrostenedione*) wurden für die Probanden V1–V8 die in Abbildung 25 graphisch dargestellten Konzentrationen des verabreichten Norandrostendion im Plasma bestimmt. Die maximal erreichten Plasmakonzentrationen ( $C_{max}$ ) lagen zwischen 3,6–78,7 ng/ml. Die Zeitpunkte, zu denen diese Maximalwerte gemessen wurden ( $t_{max}$ ), wurden zwischen 30 Minuten und 3 Stunden nach Applikation des Prohormons erreicht. Dabei waren die ersten deutliche Konzentrationsanstiege nach etwa 30 Minuten festzustellen.

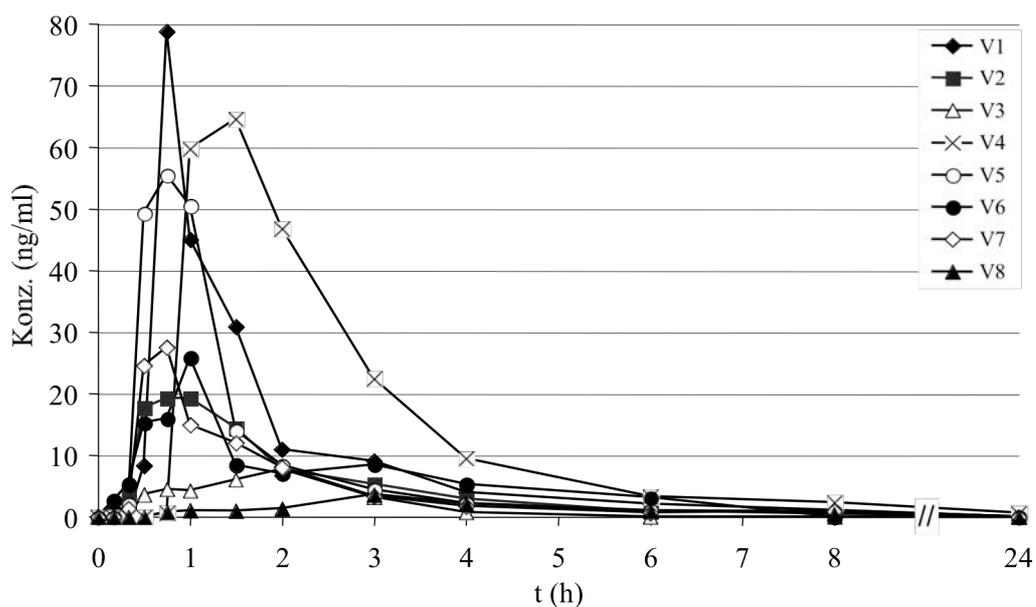


Abbildung 25: Plasmaspiegelverläufe von ND nach oraler Applikation von 100 mg ND

*Plasmaspiegelverläufe von Nandrolon*

Es konnte in den Plasmaproben aller Probanden das Vorkommen von Nandrolon bestätigt werden. Die maximal erzielten Plasmakonzentrationen an Nandrolon variierten zwischen 4,5– 40,6 ng/ml. Diese wurden zwischen 45 Minuten und 3 Stunden nach der Einnahme der Kapsel mit 100 mg Norandrostendion bestimmt. Die entsprechenden Plasmaspiegelverläufe für alle Probanden sind in Abbildung 26 dargestellt.

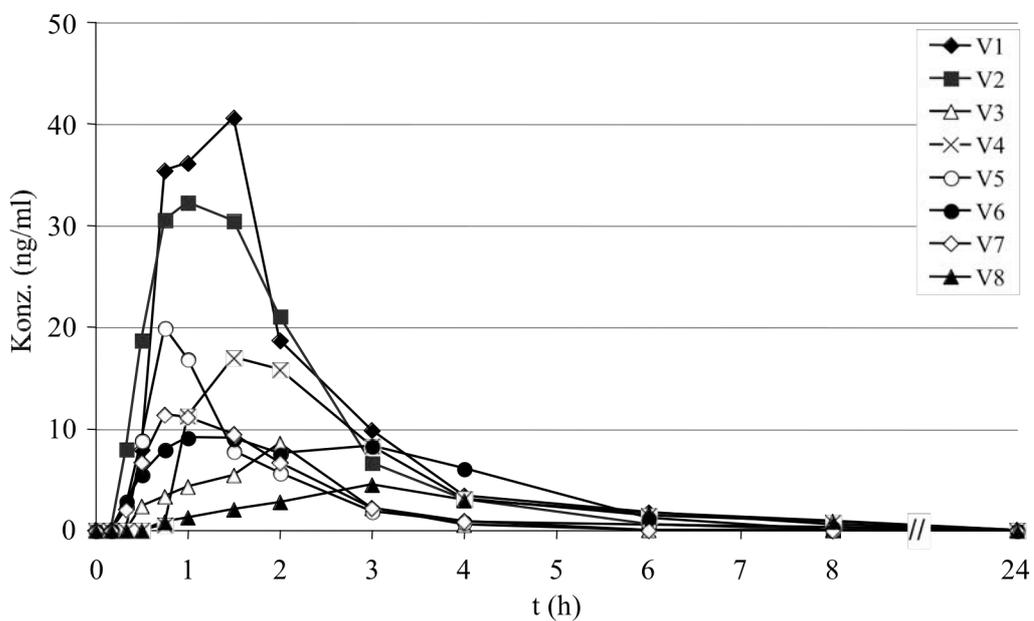


Abbildung 26: Plasmaspiegelverläufe von NL nach oraler Applikation von 100 mg ND

*Plasmaspiegelverläufe von Norandrosteron und Noretiocholanolon*

Die Hauptmetaboliten Norandrosteron und Noretiocholanolon wurden in deutlich höheren Konzentrationen in den Plasmaproben der Probanden festgestellt. Die Werte für  $C_{max}$  lagen zwischen 555,4–1644,8 ng/ml für NA und zwischen 140,7–549,0 ng/ml bei der Bestimmung von NE. Nach 24 Stunden enthielten noch Plasmaproben von drei Probanden NA (max. 7,0 ng/ml), NE konnte noch in einer Probe nachgewiesen werden (6,8 ng/ml). Abbildung 27 (NA) bzw. Abbildung 28 (NE) zeigen die jeweiligen Plasmaspiegelverläufe.

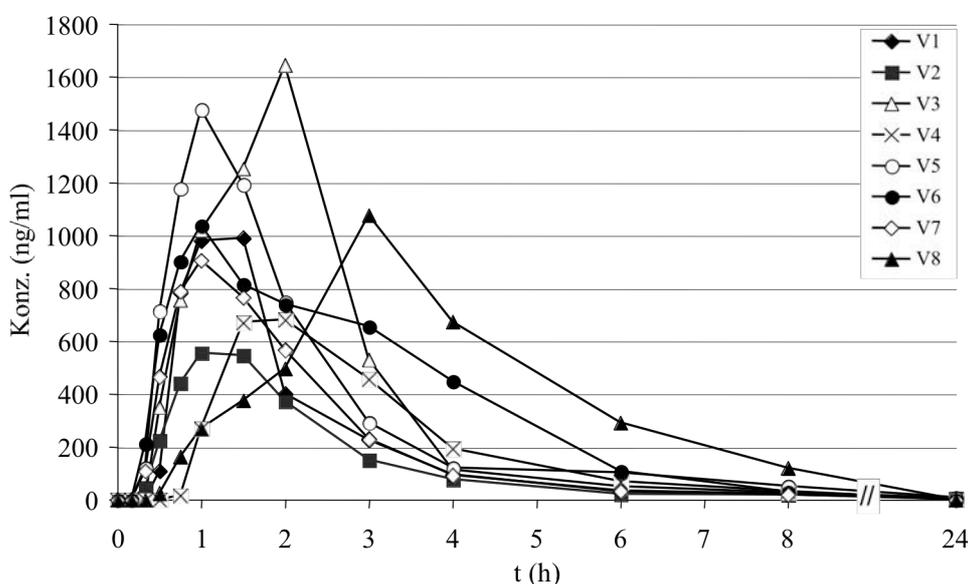


Abbildung 27: Plasmaspiegelverläufe von NA nach oraler Applikation von 100 mg ND

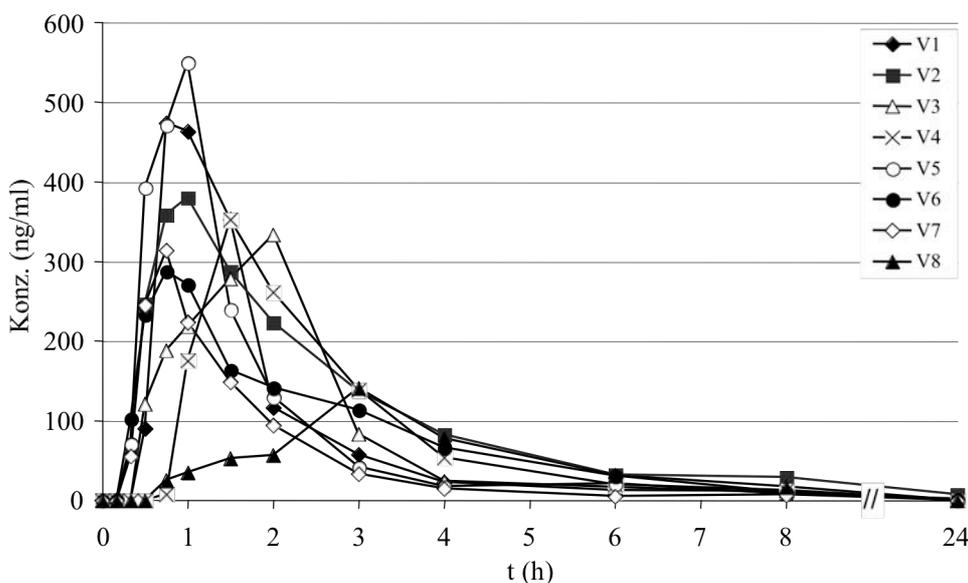


Abbildung 28: Plasmaspiegelverläufe von NE nach oraler Applikation von 100 mg ND

*Plasmaspiegelverläufe von unkonjugiert vorliegendem Nandrolon*

Nach oraler Applikation von 100 mg Norandrostendion zeigten Plasmaproben aller Probanden geringe Mengen an unkonjugiert vorliegendem Nandrolon. Dabei konnten Konzentrationen bis zu 3,1 ng/ml festgestellt werden (Abbildung 29).  $NL_{unc}$ -Konzentrationen in den Plasmaproben von V6 und V8 lagen jedoch mit  $< 0,5$  ng/ml unter der Bestimmungsgrenze (gekennzeichnet mit einer gestrichelten Linie in Abbildung 29) und konnten somit nicht ausreichend genau quantifiziert werden.

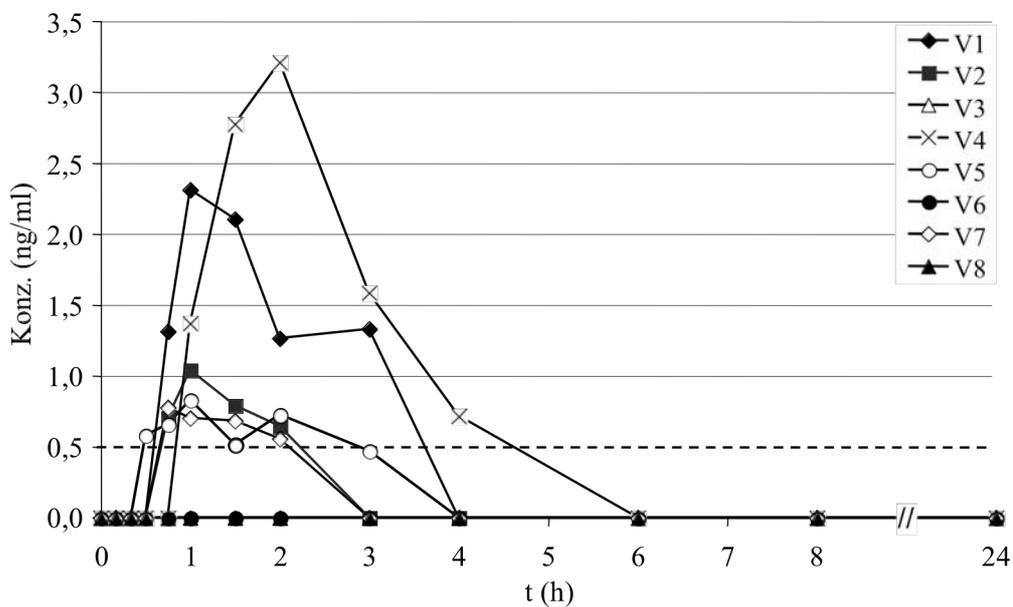


Abbildung 29: Plasmaspiegelverläufe von  $NL_{unc}$  nach oraler Applikation von 100 mg ND

#### 4.5.2 Sublinguale Applikation von 25 mg Norandrostendion

##### *Plasmaspiegelverläufe von Norandrostendion*

Die Applikation von jeweils einer Sublingualtablette mit 25 mg ND (*NorCycloDione*) an die acht Probanden führte zu einer raschen Resorption des Wirkstoffes und maximalen Plasmakonzentrationen zwischen 12,5–60,2 ng/ml (Abbildung 30), die innerhalb von 30 Minuten nach der Anwendung auftraten.

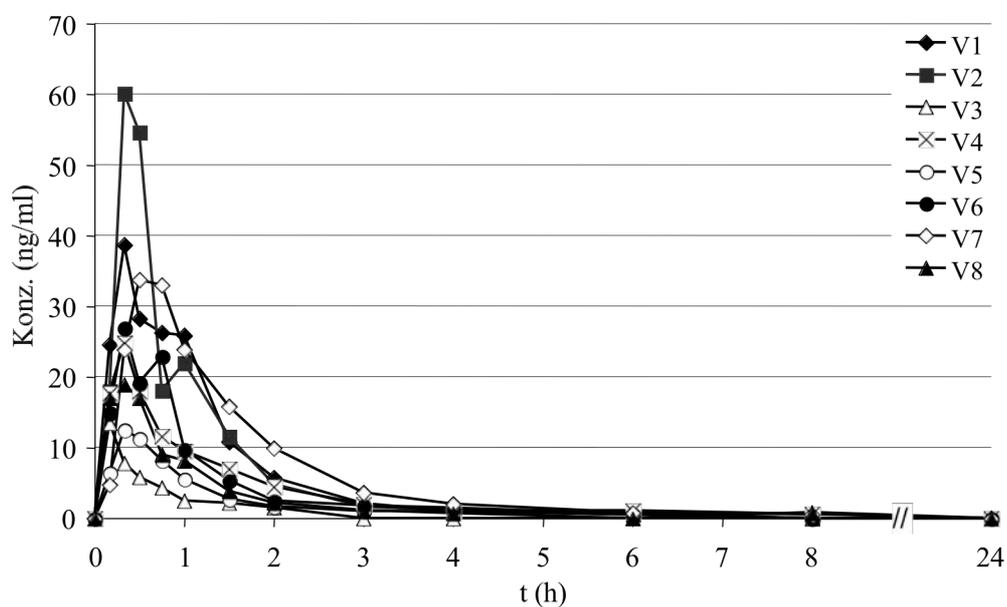


Abbildung 30: Plasmaspiegelverläufe von ND nach sublingualem Applikation von 25 mg ND

*Plasmaspiegelverläufe von Nandrolon*

Nach sublingualer Verabreichung von 25 mg ND konnte in den Plasmaproben aller Probanden die Entstehung von Nandrolon bestätigt werden. Es resultierten Nandrolon-Plasmakonzentrationen zwischen 0,7–17,2 ng/ml. Die Konzentrationsspitzen wurden in einem Zeitraum von 30 Minuten bis 3 Stunden nach Applikation der Sublingualtabletten erzielt. Die entsprechenden Plasmaspiegelverläufe der acht Probanden sind in Abbildung 31 dargestellt.

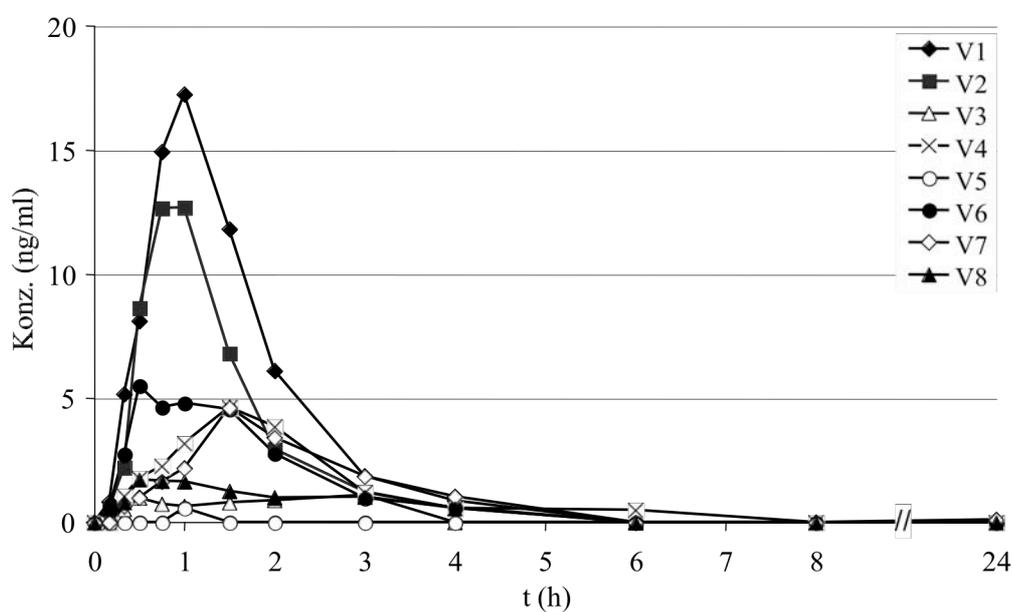


Abbildung 31: Plasmaspiegelverläufe von NL nach sublingualer Applikation von 25 mg ND

### Plasmaspiegelverläufe von Norandrosteron und Noretiocholanolon

Entsprechend der schnellen Resorption des sublingual verabreichten NDs sind auch bei dessen Hauptmetaboliten Norandrosteron und Noretiocholanolon schnelle Konzentrationsanstiege zu verzeichnen (Abbildung 32 und Abbildung 33). Die maximalen Plasmakonzentrationen, die für NA zwischen 169,1–318,2 ng/ml und für NE zwischen 18,5 –114,9 ng/ml lagen, wurden zwischen 45 und 120 Minuten nach Prohormon-Applikation erreicht.

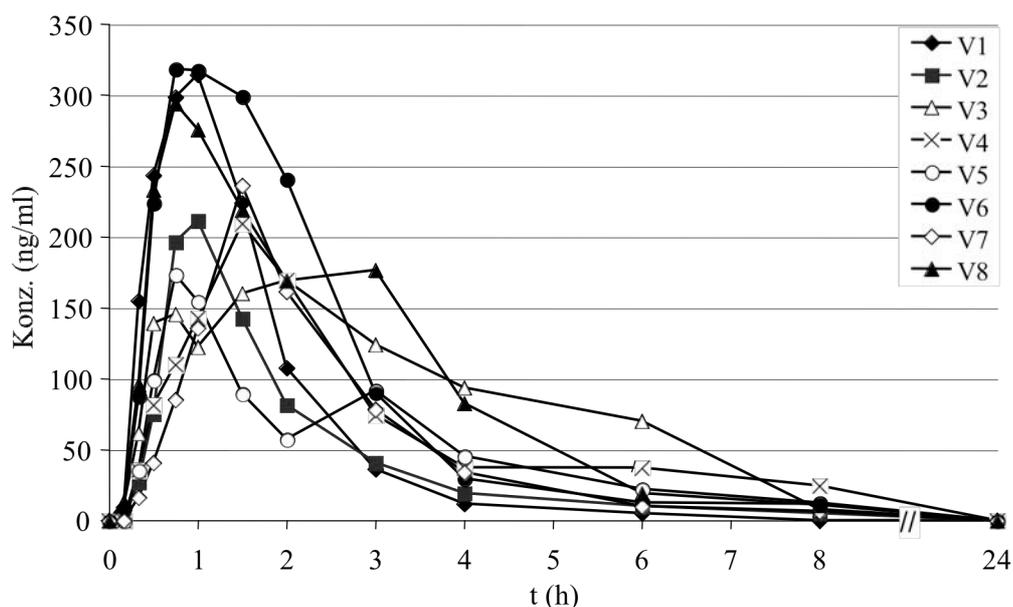


Abbildung 32: Plasmaspiegelverläufe von NA nach sublingualer Applikation von 25 mg ND

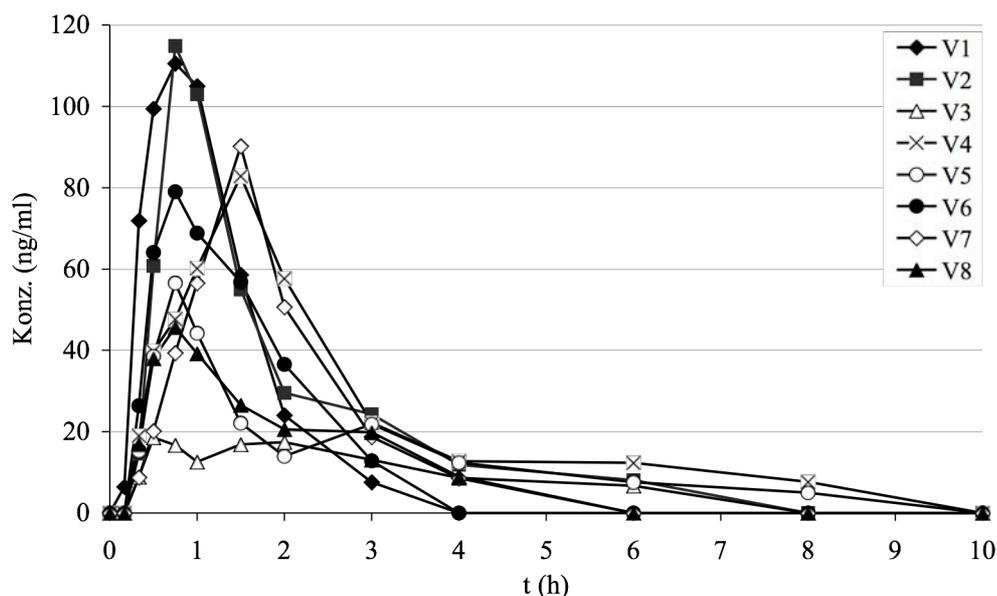


Abbildung 33: Plasmaspiegelverläufe von NE nach sublingualer Applikation von 25 mg ND

*Plasmaspiegelverläufe von unkonjugiert vorliegendem Nandrolon*

Nach Verwendung der 25 mg ND Sublingualtablette wurden in den Plasmaproben der Probanden bis zu 1,7 ng/ml an unkonjugiert vorliegendem Nandrolon bestimmt (Abbildung 34). Die Werte für V5 lagen jedoch unter der Bestimmungsgrenze von 0,5 ng/ml, die durch eine gestrichelte Linie im Diagramm angezeigt wird. Die Konzentrationsspitzen in den Proben der übrigen Probanden wurde zwischen 10 und 90 Minuten nach Applikation gemessen.

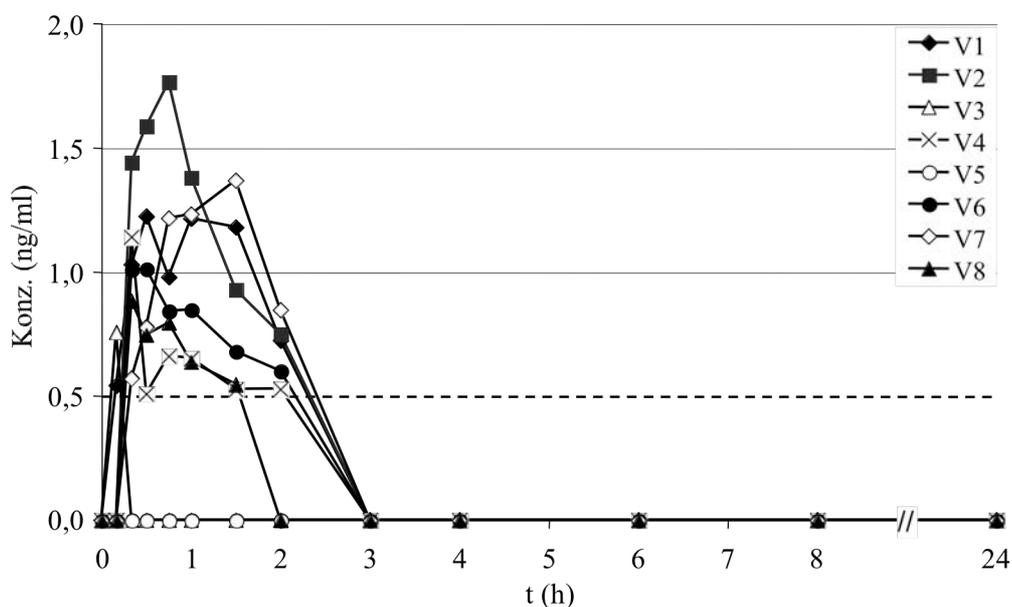


Abbildung 34: Plasmaspiegelverläufe von  $NL_{unc}$  nach sublingualer Applikation von 25 mg ND

### 4.5.3 Orale Applikation von 100 mg Norandrostendiol

#### *Plasmaspiegelverläufe von Norandrostendiol*

Die perorale Applikation von 100 mg NDIol führte nur zu geringen Plasmakonzentrationen – bis zu 2,3 ng/ml – dieses Wirkstoffes bei den acht Probanden. Die in Abbildung 35 gezeigten Konzentrationsverläufe lassen in diesem geringen Konzentrationsbereich keine richtigen an- und absteigenden Phasen erkennen. Die Maximalwerte traten zwischen 1–8 Stunden nach Applikation der Kapsel auf, und auch nach 24 Stunden zeigten Proben zweier Probanden noch geringe NDIol-Konzentrationen. Bei dem Probanden V8 konnte erst nach einer Verzögerungszeit von vier Stunden NDIol im Plasma bestimmt werden. In den Plasmaproben von V5 wurde kein NDIol festgestellt.

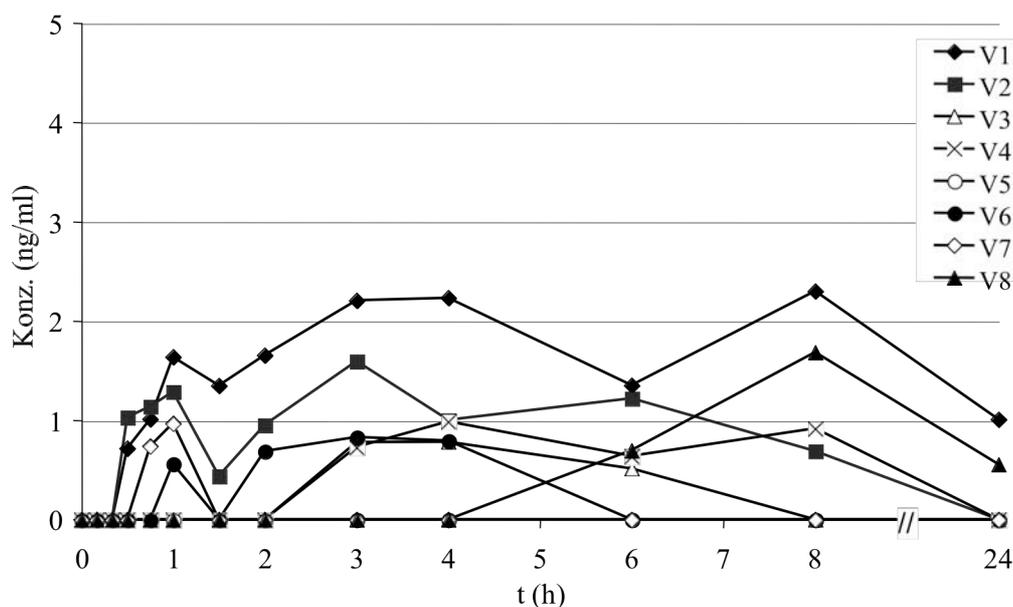


Abbildung 35: Plasmaspiegelverläufe von NDIol nach oraler Applikation von 100 mg NDIol

*Plasmaspiegelverläufe von Nandrolon*

Die Einnahme von 100 mg NDIol führte ebenfalls zu Bildung von Nandrolon. Auch hier kam es zu fast gleichbleibend niedrigen Konzentrationsverläufen über den 8-stündigen Beobachtungszeitraum mit Maximalwerten bis zu 8,8 ng/ml. Wiederum konnte der Zielanalyt in den Plasmaproben von V8 in den ersten vier Stunden nach Kapseleinnahme nicht nachgewiesen werden, bevor dessen Konzentration innerhalb der nächsten vier Stunden auf 4,1 ng/ml anstieg. Erneut wiesen auch Plasmaproben zweier Probanden nach 24 Stunden noch geringe Mengen an NL auf. Im Plasma von V5, das auch kein NDIol aufwies, konnte ebenfalls kein NL nachgewiesen werden.

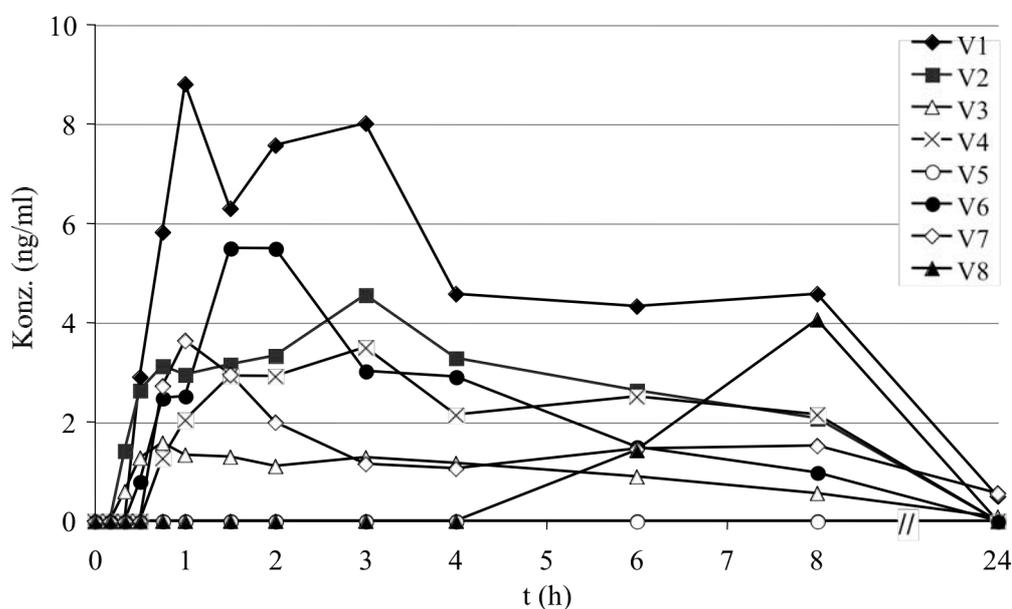


Abbildung 36: Plasmaspiegelverläufe von NL nach oraler Applikation von 100 mg NDIol

### Plasmaspiegelverläufe von Norandrosteron und Noretiocholanolon

Die Plasmaspiegelverläufe der Metaboliten Norandrosteron und Noretiocholanolon nach peroraler Einnahme von 100 mg NDIol sind in Abbildung 37 und Abbildung 38 dargestellt. Es wurden maximale Plasmakonzentrationen von 53,4–461,7 ng/ml an NA und 22,0–44,9 ng/ml an NE erreicht. Die Plasmakonzentrationen dieser Metaboliten nahmen innerhalb des Beobachtungszeitraums nur langsam ab – nach 24 Stunden wurden noch bis zu ca. 30 ng/ml an NA und NE im Plasma einiger Probanden gemessen. Entgegen der Ergebnisse für die Analyten NDIol und NL konnten in den Plasmaproben von V5 die Metaboliten NA und NE nachgewiesen werden.

Es fällt erneut das schon charakteristische Konzentrationsprofil des Probanden V8 auf. Nach geringem (NA) oder gar keinem Konzentrationsanstieg (NE) während der ersten vier Stunden nach Prohormon-Applikation kam es im anschließenden vierstündigen Zeitraum zu deutlichen Zunahmen der Analyten im Plasma des Probanden. V8 erzielte insgesamt die höchsten Konzentrationen an NA und NE in dieser Versuchsreihe, wobei ein weiterer Anstieg im zeitlichen Verlauf (< 8 h) nicht ausgeschlossen werden kann. Ursache dieser, alle Analyten betreffenden, abweichenden Plasmaspiegelverläufe könnte eine verzögerte Auflösung der Kapselhülle im Gastrointestinal-Trakt sein.

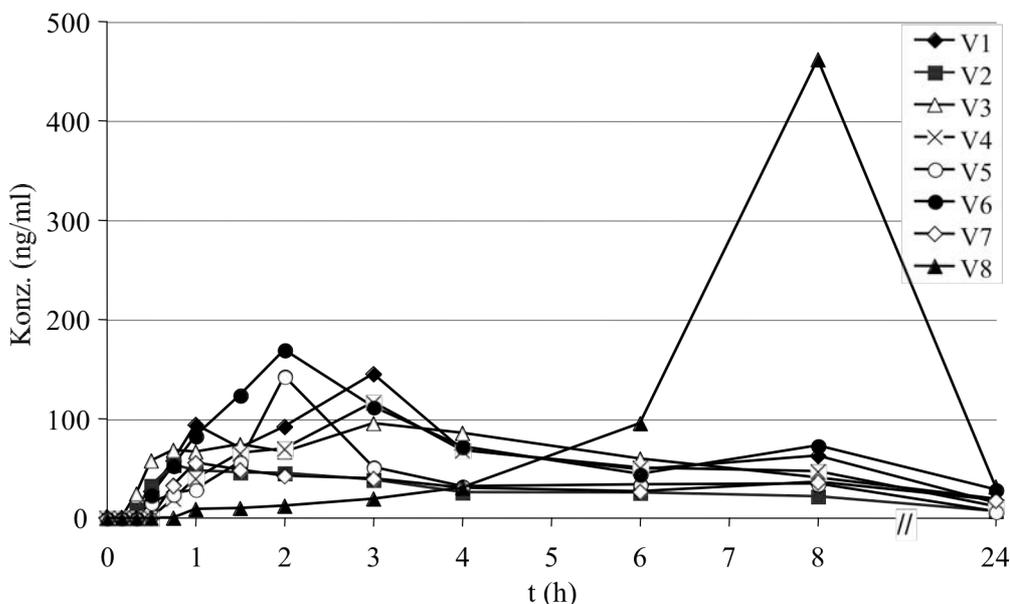


Abbildung 37: Plasmaspiegelverläufe von NA nach oraler Applikation von 100 mg NDIol

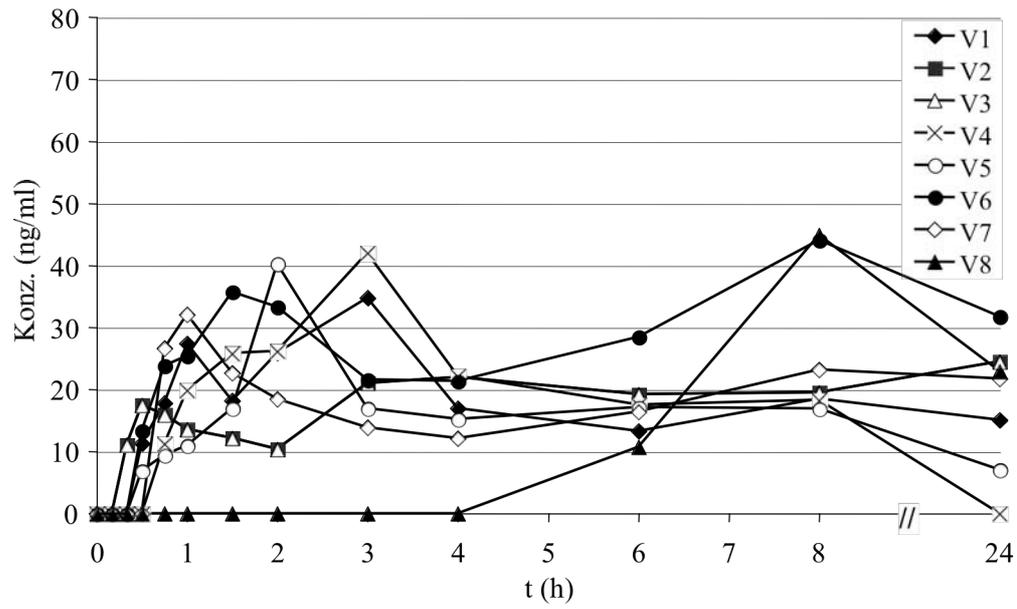


Abbildung 38: Plasmaspiegelverläufe von NE nach oraler Applikation von 100 mg NDiol

*Plasmaspiegelverläufe von unkonjugiert vorliegendem Nandrolon*

Die Einnahme von 100 mg NDIol in Kapselform resultierte nur in sehr geringen Mengen an „frei“ vorliegendem Nandrolon im Plasma der Probanden. Tatsächlich überschritten nur die in zwei Plasmaproben von Probanden V7 bestimmten Konzentrationen die Bestimmungsgrenze von 0,5 ng/ml (Abbildung 39, Bestimmungsgrenze als gestrichelte Linie dargestellt). Diese Werte lagen bei 0,7 ng/ml ( $t = 45$  min) und 0,6 ng/ml ( $t = 60$  min).

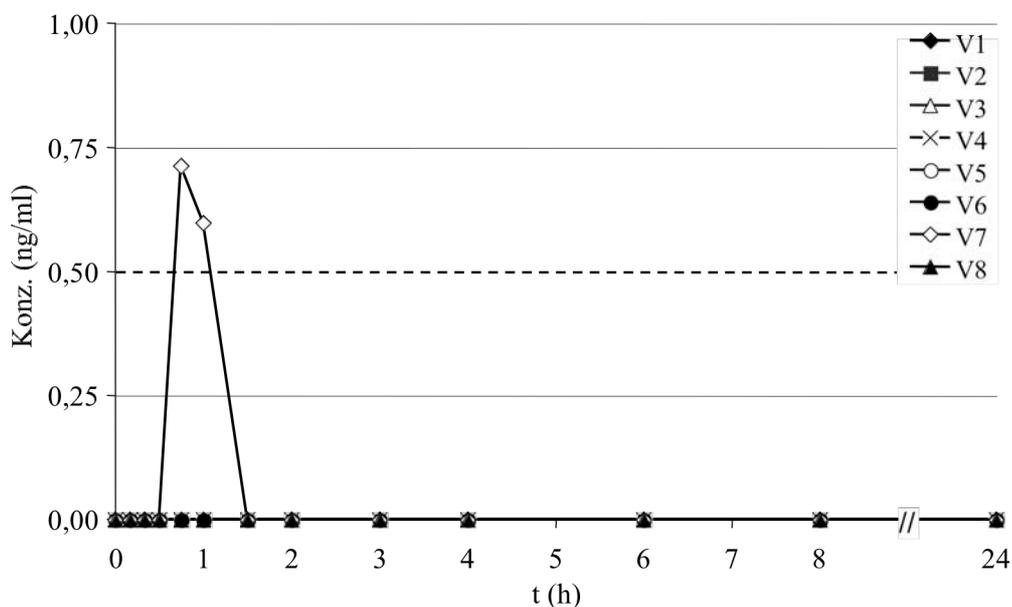


Abbildung 39: Plasmaspiegelverläufe von  $NL_{unc}$  nach oraler Applikation von 100 mg NDIol

#### 4.5.4 Sublinguale Applikation von 25 mg Norandrostendiol

##### *Plasmaspiegelverläufe von Norandrostendiol*

Nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol kam es zu einer schnellen Resorption des Wirkstoffes bei allen Probanden. Es wurden maximale Plasmakonzentrationen von 1,6–4,3 ng/ml in den Plasmaproben bestimmt, die innerhalb von 45 Minuten erreicht wurden. Dem schnellen Konzentrationsanstieg folgte ein stetiger Konzentrationsabfall, so dass innerhalb von vier Stunden nach der Einnahme kein NDiol mehr in den Plasmaproben nachgewiesen werden konnte. Abbildung 40 zeigt die entsprechenden Plasmaspiegelverläufe der acht Probanden.

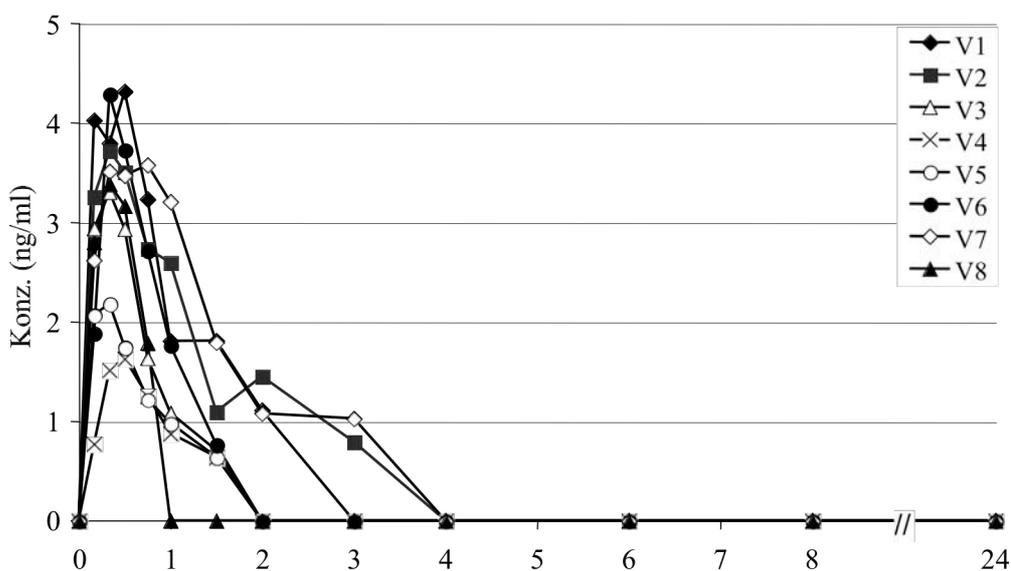


Abbildung 40: Plasmaspiegelverläufe von NDiol nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol

*Plasmaspiegelverläufe von Nandrolon*

Bereits in den Plasmaproben aller Probanden, die 10 Minuten nach sublingualer Verabreichung von 25 mg NDiol abgenommen wurden, konnte die Entstehung von Nandrolon als Metabolit bestätigt werden. Die Konzentrationsspitzen der Probanden erzielt Werte von 4,4–20,2 ng/ml und wurden innerhalb einer Stunde nach Applikation erreicht (Abbildung 41).

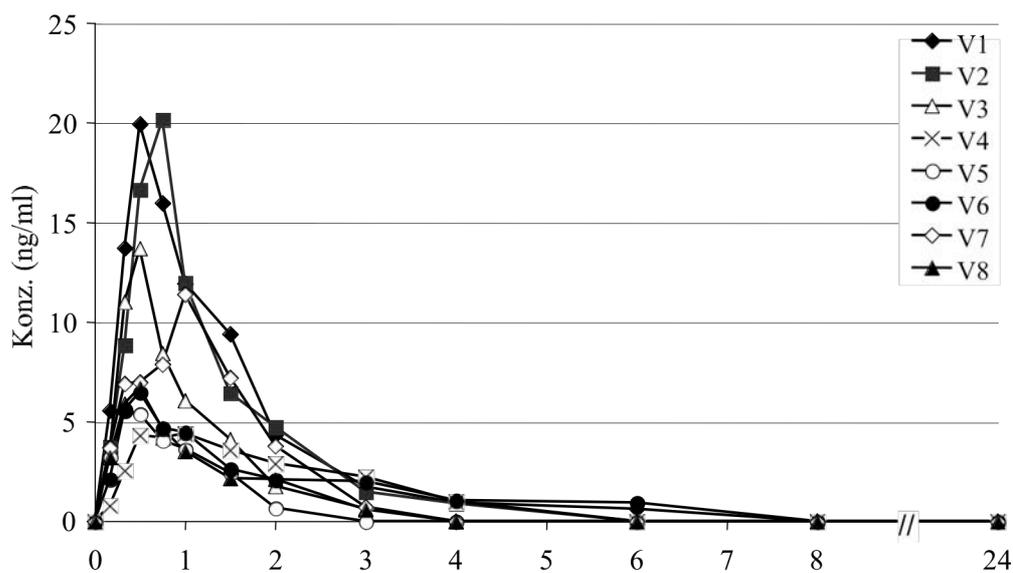


Abbildung 41: Plasmaspiegelverläufe von NL nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol

*Plasmaspiegelverläufe von Norandrosteron und Noretiocholanolon*

Entsprechend der schnellen Anflutung des sublingual verabreichten NDIol kam es auch zu schnellen Konzentrationsanstiegen der Hauptmetaboliten NA und NE. Maximal erzielten Plasmakonzentrationen reichen von 41,8–169,2 ng/ml für NA und 12,0–72,2 ng/ml für NE. Nach 24 Stunden konnten in den Plasmaproben der Probanden noch geringe Mengen an NA nachgewiesen werden, die jedoch unter der Bestimmungsgrenze von 5,0 ng/ml lagen.

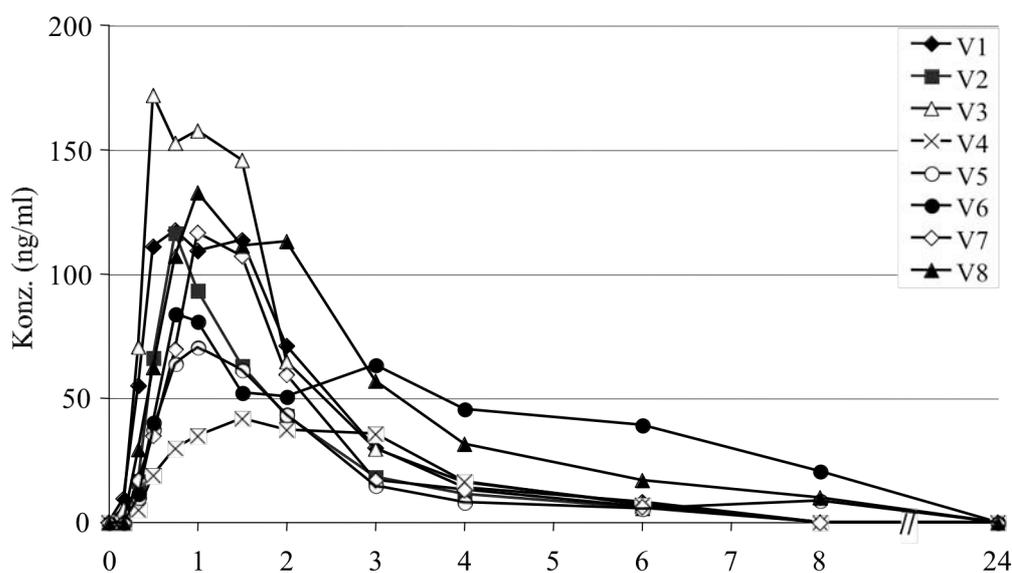


Abbildung 42: Plasmaspiegelverläufe von NA nach sublingualer Applikation von 25 mg NDIol

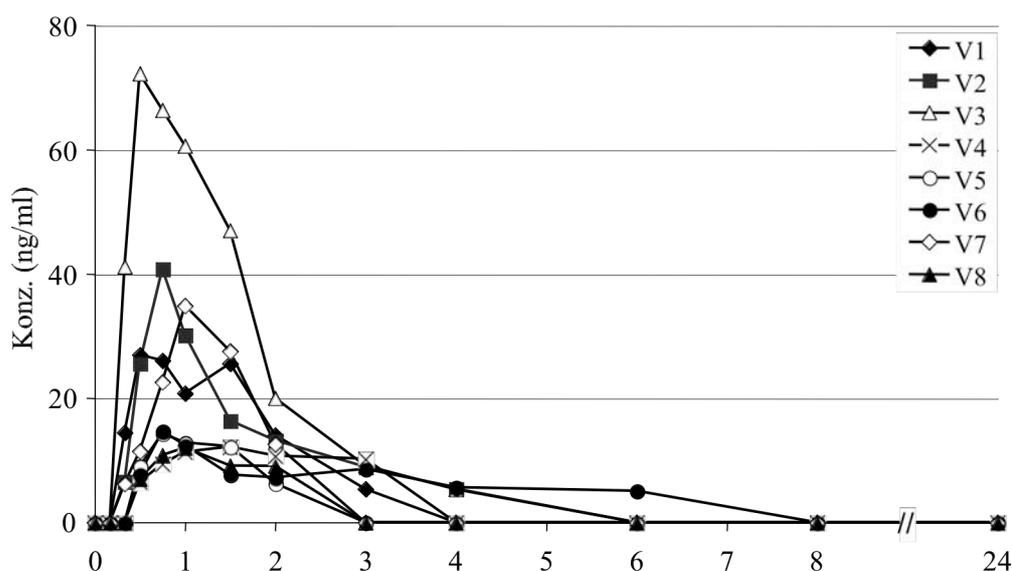


Abbildung 43: Plasmaspiegelverläufe von NE nach sublingualer Applikation von 25 mg NDIol

*Plasmaspiegelverläufe von unkonjugiert vorliegendem Nandrolon*

Schon 10 Minuten nach Applikation der 25 mg NDiol Sublingualtabletten wurden beachtliche Konzentrationen an unkonjugiert vorliegendem Nandrolon in den Plasmaproben der Probanden gemessen. Die Plasmaspiegelverläufe für die acht Probanden sind in Abbildung 44 dargestellt. Die Maximalwerte zwischen 3,2–5,7 ng/ml wurden innerhalb 30 Minuten erreicht. Obwohl die Plasmakonzentrationen unter der Bestimmungsgrenze von 0,5 ng/ml (gestrichelte Linie im Diagramm) lagen, konnte auch 3 Stunden nach Einnahme in Proben aller Probanden  $NL_{unc}$  nachgewiesen werden.

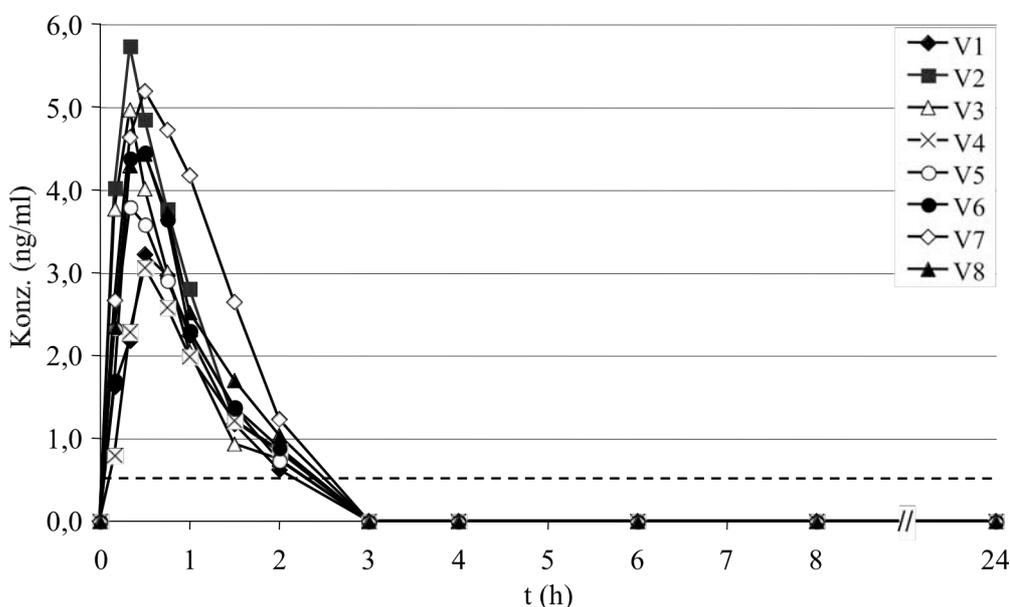


Abbildung 44: Plasmaspiegelverläufe von  $NL_{unc}$  nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol

## 4.6 Betrachtung einer möglichen hormonellen Aktivität durch aktives Nandrolon

In Studien zur Pharmakokinetik oder männlichen Zeugungsfähigkeit wurden nach *i.m.* Injektionen von Nandrolonestern Plasmakonzentrationen bis zu 8 ng/ml  $NL_{unc}$  erreicht. Als Parameter zur Erfassung einer pharmakologischen Wirksamkeit diente dabei u. a. die resultierende Testosteronsuppression, die bis zu einem Abfall von  $NL_{unc}$  auf 0,3–1,2 ng/ml anhielt.

In Abbildung 45 sind die nach Einnahme der ND bzw. NDiol-haltigen Nahrungsergänzungsmittel resultierenden Plasmakonzentrationen an unkonjugiertem – pharmakologisch aktivem – Nandrolon noch einmal zusammengefasst. Dabei wurde der Konzentrationsbereich von 0,3–1,2 ng/ml, der als minimale effektive Konzentration betrachtet werden kann, schattiert dargestellt. Im ersten Ausscheidungsversuch mit 100 mg ND Kapseln erreichten die Plasmawerte von sechs der acht Probanden diesen Konzentrationsbereich, wobei zwei diesen deutlich überschritten (Abbildung 45a)). Die sublinguale Verabreichung von 25 mg ND führte bei allen Probanden zu maximalen Plasmakonzentrationen an  $NL_{unc}$ , die im Bereich einer möglichen pharmakologischen Beeinflussung lagen (Abbildung 45b)). Während die perorale Applikation von 100 mg NDiol nur bei einem Probanden zu quantifizierbaren Konzentrationen an  $NL_{unc}$  führte (Abbildung 45c)) resultierte die sublinguale Aufnahme von 25 mg NDiol in maximalen Plasmakonzentrationen zwischen 3,7–5,7 ng/ml (Abbildung 45d)). Alle acht Probanden erreichten in diesem Ausscheidungsversuch über etwa zwei Stunden  $NL_{unc}$ -Plasmawerte, die pharmakologisch relevant und mit einer tatsächlichen Nandrolon-Therapie vergleichbar waren.

Diese Erkenntnisse lassen den Schluß zu, dass sich die Prohormone ND und NDiol im Phase-I-Metabolismus entsprechend des Testosteron-Stoffwechsels durch Hydroxysteroid-Dehydrogenasen zu Nandrolon umgesetzt werden. Die Ergebnisse aus den Ausscheidungsversuchen wiegen um so schwerer, wenn man bedenkt, dass die entsprechenden Konsumenten diese Prohormon-Präparate mehrfach am Tag einnehmen und somit auch länger anhaltende Wirkspiegel aufrecht erhalten werden können. In einschlägigen Internetforen wird die vierfach tägliche Einnahme empfohlen, manche Sportler sprechen sogar von grammweiser Dosierung der Prohormone (92).

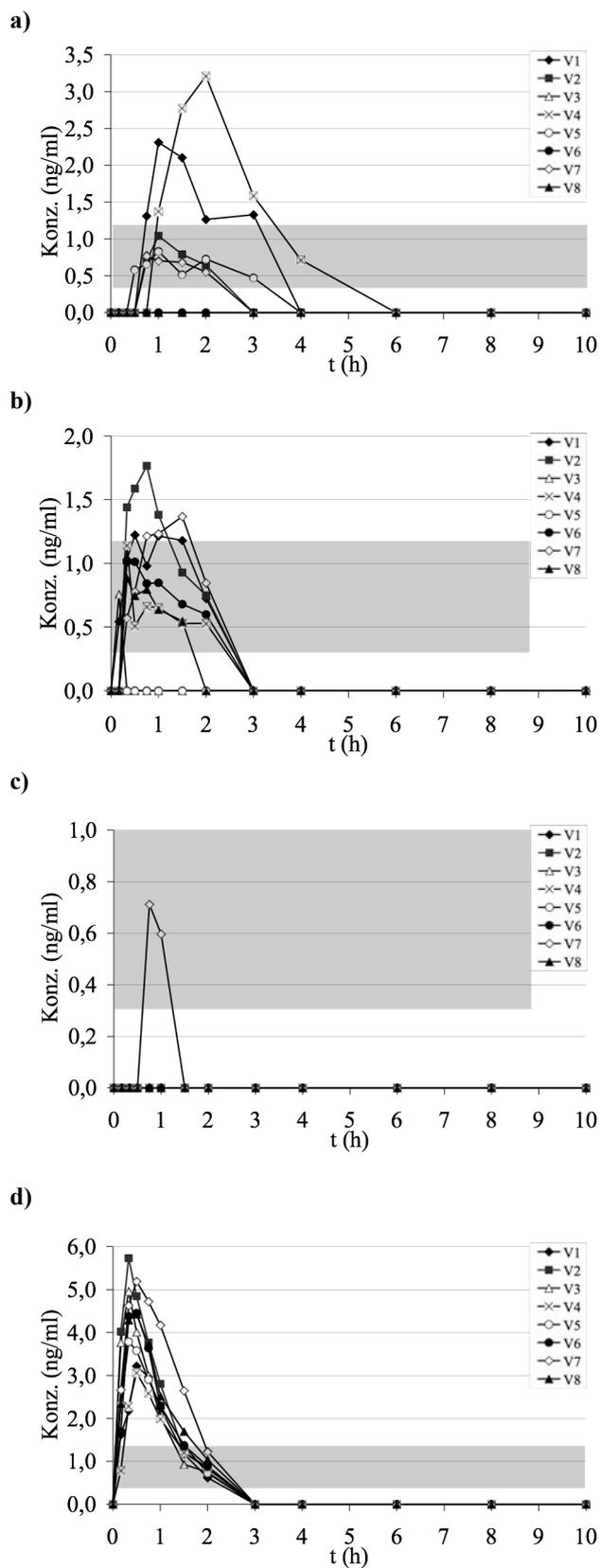


Abbildung 45: Konzentrations-Zeit-Verläufe von  $NL_{unc}$  im Plasma nach Applikation a) einer 100 mg ND Kapsel, b) einer 25 mg ND Sublingualtablette, c) einer 100 mg NDiol Kapsel und d) einer 25 mg NDiol Sublingualtablette; der Bereich der minimalen effektiven Konzentration ist schattiert dargestellt

## 4.7 Pharmakokinetik und Statistik

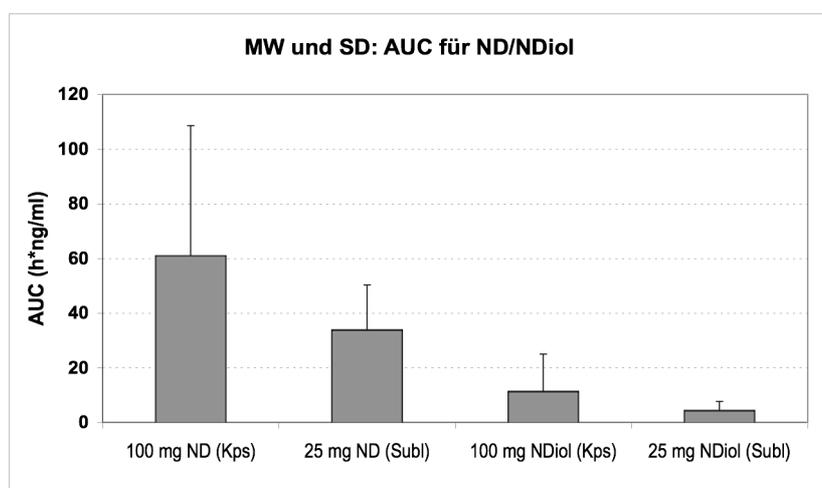
Die nachstehende Tabelle enthält die Mittelwerte ( $\pm$  SD) der pharmakokinetischen Kenngrößen  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  und AUC, die während der Prohormon-Ausscheidungsstudien bei den acht Probanden bestimmt wurden.

<i>Prüfmedikation</i>	<i>C<sub>max</sub></i> (ng/ml)	<i>t<sub>max</sub></i> (h)	<i>AUC</i> (h*ng/ml)
<b>100 mg ND (Kps)</b>			
ND	35,1 ( $\pm$ 27,1)	1,3 ( $\pm$ 0,8)	61,0 ( $\pm$ 47,6)
NL	17,8 ( $\pm$ 12,7)	1,4 ( $\pm$ 0,8)	40,5 ( $\pm$ 23,7)
NA	1045,6 ( $\pm$ 366,9)	1,8 ( $\pm$ 1,0)	2686,0 ( $\pm$ 1033,7)
NE	353,6 ( $\pm$ 122,4)	1,3 ( $\pm$ 0,8)	787,1 ( $\pm$ 221,5)
NL <sub>unc</sub>	1,0 ( $\pm$ 1,2)	1,2 ( $\pm$ 0,5)	2,0 ( $\pm$ 2,5)
<b>25 mg ND (Subl)</b>			
ND	28,7 ( $\pm$ 15,7)	0,3 ( $\pm$ 0,1)	33,9 ( $\pm$ 16,4)
NL	6,0 ( $\pm$ 5,9)	1,2 ( $\pm$ 0,8)	10,5 ( $\pm$ 8,6)
NA	240,7 ( $\pm$ 60,7)	1,2 ( $\pm$ 0,5)	666,6 ( $\pm$ 190,3)
NE	74,8 ( $\pm$ 32,8)	0,9 ( $\pm$ 0,4)	148,5 ( $\pm$ 59,2)
NL <sub>unc</sub>	1,0 ( $\pm$ 0,5)	0,6 ( $\pm$ 0,5)	1,5 ( $\pm$ 1,0)
<b>100 mg NDiol (Kps)</b>			
NDiol	1,1 ( $\pm$ 0,7)	4,3 ( $\pm$ 2,7)	11,4 ( $\pm$ 13,6)
NL	4,0 ( $\pm$ 2,6)	2,6 ( $\pm$ 2,6)	33,5 ( $\pm$ 24,2)
NA	154,8 ( $\pm$ 130,8)	2,8 ( $\pm$ 2,3)	1371,9 ( $\pm$ 1365,0)
NE	37,7 ( $\pm$ 6,9)	3,8 ( $\pm$ 2,6)	529,1 ( $\pm$ 185,7)
NL <sub>unc</sub>	0,1 ( $\pm$ 0,3)	(0,8)*	0,1 ( $\pm$ 0,1)
<b>25 mg NDiol (Subl)</b>			
NDiol	3,3 ( $\pm$ 0,9)	0,4 ( $\pm$ 0,2)	4,4 ( $\pm$ 3,3)
NL	11,0 ( $\pm$ 6,4)	0,6 ( $\pm$ 0,3)	15,3 ( $\pm$ 7,6)
NA	106,3 ( $\pm$ 40,1)	0,9 ( $\pm$ 0,3)	277,9 ( $\pm$ 122,9)
NE	28,5 ( $\pm$ 20,8)	0,8 ( $\pm$ 0,3)	49,5 ( $\pm$ 31,0)
NL <sub>unc</sub>	4,5 ( $\pm$ 0,8)	0,4 ( $\pm$ 0,1)	5,0 ( $\pm$ 1,2)

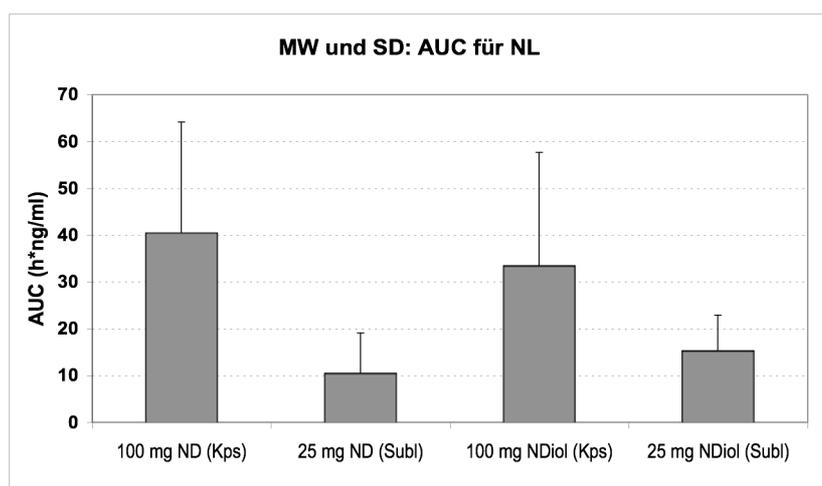
**Tabelle 23: Zusammenfassung der berechneten pharmakokinetischen Parameter  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  und AUC. Die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte ( $\pm$  SD) berechnet aus den jeweiligen Werten der acht Probanden dar.**

\* nur bei einem Probanden bestimmbar; MW nicht berechnet

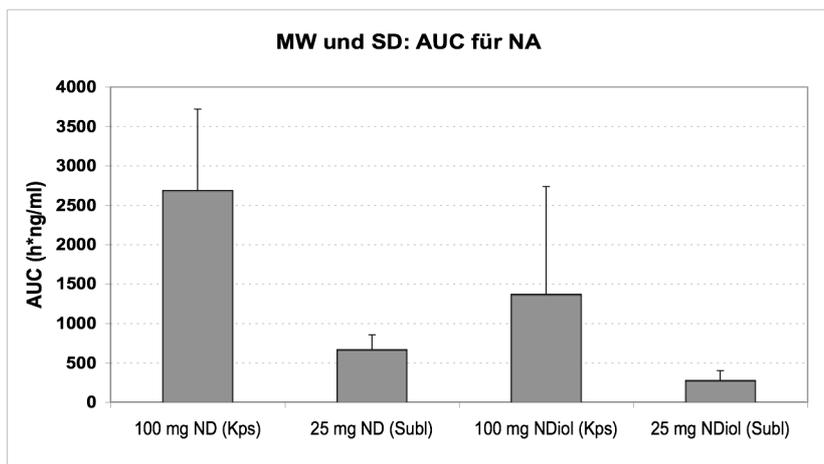
Die Abbildung 46–Abbildung 50 verdeutlichen anhand von Balkendiagrammen die Ausmaße der AUC-Werte als wichtigste pharmakokinetische Zielgröße. Abbildung 46 zeigt die berechneten AUC-Werte des jeweiligen *parent compounds* ND bzw. NDiol nach deren Applikation als 100 mg Kapsel oder 25 mg Sublingualtablette. Des Weiteren werden die Flächenwerte für NL, die der Hauptmetaboliten NA und NE, sowie des frei vorliegenden  $NL_{unc}$  für alle vier durchgeführten Ausscheidungsstudien graphisch dargestellt.



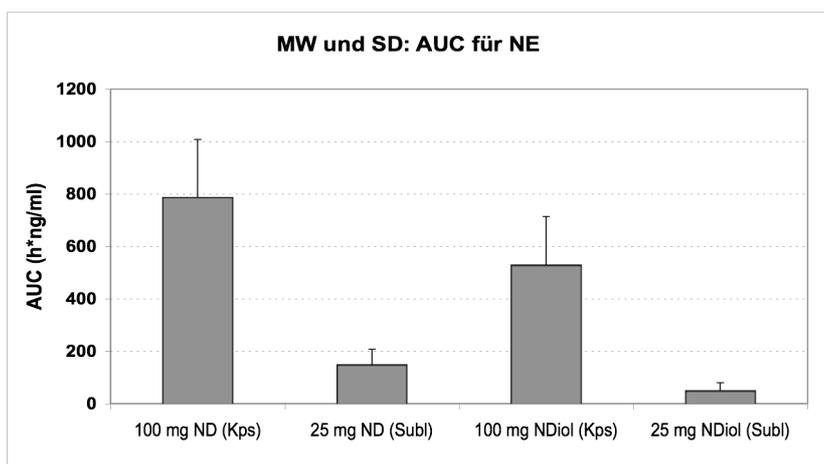
**Abbildung 46:** Graphische Darstellung der mittleren resultierenden AUC-Werte (+ SD) für ND bzw. NDiol nach Applikation der entsprechenden Prohormon-Präparate



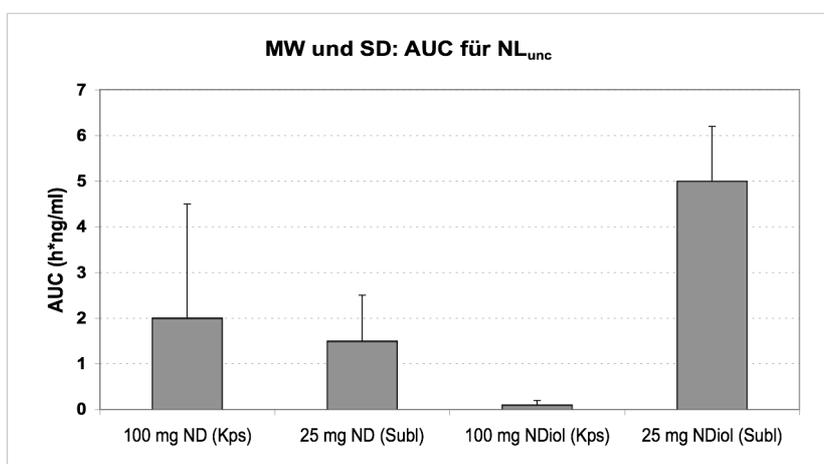
**Abbildung 47:** Graphische Darstellung der mittleren resultierenden AUC-Werte (+ SD) für NL nach Applikation der entsprechenden Prohormon-Präparate



**Abbildung 48:** Graphische Darstellung der mittleren resultierenden AUC-Werte (+ SD) für NA nach Applikation der entsprechenden Prohormon-Präparate



**Abbildung 49:** Graphische Darstellung der mittleren resultierenden AUC-Werte (+ SD) für NE nach Applikation der entsprechenden Prohormon-Präparate



**Abbildung 50:** Graphische Darstellung der mittleren resultierenden AUC-Werte (+ SD) für NL<sub>unc</sub> nach Applikation der entsprechenden Prohormon-Präparate

Die Überprüfung der pharmakokinetischen Kenngrößen  $C_{max}$  und AUC anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests ergab eine Normalverteilung für alle Variablen (ND, NDiol, NL, NA, NE, NL<sub>unc</sub>). Der Vergleich zwischen Kapsel- und Sublingualtabletten-Einnahme bezüglich dieser Variablen wurde mit Hilfe des gepaarten t-Tests durchgeführt und die entsprechenden  $p$ -Werte in Tabelle 24 aufgelistet. Die  $p$ -Werte für die  $t_{max}$ -Vergleiche resultieren aus Berechnungen mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben. Um das multiple Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  einzuhalten, wurden die einzelnen Tests nach Bonferroni jeweils zum Niveau  $\alpha/k$  ( $\alpha = 0,01$ ) durchgeführt. Für  $p$ -Werte  $< 0,01$  wird demnach ein signifikanter Unterschied der entsprechenden Parameter festgestellt. Für die Berechnungen wurde nicht berücksichtigt, dass bei der sublingualen Applikation mit 25 mg nur ein Viertel der Dosis im Vergleich zur Kapseleinnahme mit 100 mg der Prohormone verabreicht wurde.

<i>Parameter</i>	<i>Analyt</i>	<i>Vergleich ND</i>	<i>Vergleich NDiol</i>
		<i>Kps/Subl</i>	<i>Kps/Subl</i>
		<i>p</i>	<i>p</i>
$C_{max}$	ND	0,5710	-
	NDiol	-	0,0001
	NL	0,0043	0,0083
	NA	0,0006	0,3333
	NE	0,0003	0,3692
	NL <sub>unc</sub>	0,9930	< 0,0001
$t_{max}$	ND	0,0007	-
	NDiol	-	0,0018
	NL	0,4535	0,0051
	NA	0,0836	0,0119
	NE	0,2599	0,0017
	NL <sub>unc</sub>	0,0391	
AUC	ND	0,1226	-
	NDiol	-	0,1976
	NL	0,0007	0,0325
	NA	0,0003	0,0048
	NE	0,0001	0,0002
	NL <sub>unc</sub>	0,5485	< 0,0001

**Tabelle 24: Ergebnisse der  $p$ -Wert Berechnungen für  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  und AUC für den Vergleich zwischen peroraler und sublingualer Prohormon-Applikation**

#### 4.7.1 Vergleich zwischen oraler und sublingualer Applikation von Norandrostendion

Bezüglich des verabreichten ND ergaben sich keine signifikanten Unterschiede sowohl in den gemessenen Spitzenkonzentration im Plasma der Probanden als auch in den AUC-Werten nach Kapsel- bzw. Sublingualtabletten-Applikation. Jedoch konnte der mittlere Zeitpunkt bis zum Erreichen der ND-Spitzenkonzentrationen im Plasma durch die sublinguale Applikationsform signifikant verkürzt werden. Hinsichtlich des intermediär gebildeten NL und der Hauptmetaboliten NA und NE lässt sich zusammenfassend sagen, dass die orale Applikation von 100 mg ND jeweils signifikant höhere maximale Plasmaspiegel und auch AUC-Werte im Vergleich zur sublingualen Applikation von 25 mg ND hervorruft, sich die  $t_{max}$ -Werte jedoch nicht signifikant unterscheiden.

Entgegengesetzt dazu führten die verschiedenen Applikationsformen von ND nicht zu signifikant unterschiedlichen  $C_{max}$ - und AUC-Werten für  $NL_{unc}$ . Auch wenn sich die  $t_{max}$ -Werte für  $NL_{unc}$  nach Anwendung der Sublingualtabletten im Vergleich zur Kapseleinnahme halbierten, kann die Verkürzung aufgrund der angewendeten konservativen Bonferroni-Methode nicht als signifikant bezeichnet werden ( $p$ -Werte siehe Tabelle 24).

#### 4.7.2 Vergleich zwischen oraler und sublingualer Applikation von Norandrostendiol

Sowohl die perorale Gabe von 100 mg NDiol als auch die sublinguale Zufuhr von 25 mg NDiol führte nur zu sehr geringen Plasmkonzentrationen des *parent compounds*. Dennoch erzielte die Sublingual-Formulierung mit 3,3 ng/ml ( $\pm 0,9$ ) signifikant höhere Plasmkonzentrationen an NDiol als das Kapselpräparat mit 1,1 ng/ml ( $\pm 0,7$ ). Die nur langsam und flach abfallenden Konzentrationsverläufe nach der Kapseleinnahme führen dennoch zu im Mittel höheren AUC-Werten für NDiol, deren Unterschied zu den Werten nach sublingualer Anwendung aber nicht signifikant ausfällt. Die Zeit zum Erreichen der  $t_{max}$ -Werte wird durch die sublinguale Zufuhr signifikant verkürzt. Die maximal erreichten Plasmkonzentrationen von intermediär gebildetem NL liegen nach Einnahme der Sublingualtabletten signifikant höher und werden auch signifikant schneller erreicht. Bezüglich der AUC werden allerdings höhere Werte für NL nach peroraler Applikation erreicht, die wiederum aus den langsam abflachenden Konzentrationsverläufen resultieren. Die  $C_{max}$ -Werte der Hauptmetaboliten NA und NE zeigen keine signifikanten Unterschiede nach Anwendung der verschie-

denen Formulierungen. Die charakteristischen Konzentrations-Zeit-Verläufe sind auch hier wieder Ursache der geringeren  $t_{max}$ -Werte nach sublingualer Applikation und höheren AUC-Werten nach Kapseleinnahme ( $p$ -Werte siehe Tabelle 24).

Die Betrachtung hinsichtlich der Bildung von  $NL_{unc}$  im Plasma der Probanden nach peroraler und sublingualer Applikation von 100 mg NDiol zeigte unerwartet deutliche Unterschiede. Während die Kapseleinnahme nur bei einem Probanden zu quantifizierbaren Konzentrationen an  $NL_{unc}$  führte ( $C_{max} = 0,7$  ng/ml), kam es nach Anwendung der NDiol-Sublingualtabletten mit  $C_{max} = 4,5 (\pm 0,8)$  ng/ml  $NL_{unc}$  zur Entstehung von pharmakologisch wirksamen Konzentrationen bei allen teilnehmenden Probanden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Durchführung einer klinischen Phase I-Studie zur Untersuchung des *in vivo* Metabolismus der Nandrolon-Prohormone Norandrostendion (ND) und Norandrostendiol (NDiol). Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf die Umwandlung der Prohormone in pharmakologisch aktives Nandrolon nach Einnahme entsprechender Nahrungsergänzungsmittel gerichtet.

Als Studienmedikation wurden verschiedene Nahrungsergänzungsmittel, die jeweils eines der Nandrolon-Prohormone enthielten, über amerikanische Internetanbieter bezogen. Um den Einfluss der Arzneiform auf das entstehende Metabolitenprofil zu untersuchen, wurde die perorale Einnahme von Kapselpräparaten mit der Anwendung von Sublingualtabletten verglichen. Sublingualtabletten lässt man unter der Zunge zergehen. Die so über die Mundschleimhaut stattfindende Wirkstoffaufnahme bietet Vorteile hinsichtlich der Bioverfügbarkeit, so dass diese Präparate geringer dosiert werden können. Nach Untersuchungen auf Qualität und Reinheit der Präparate standen folgende Produkte zur Studiendurchführung zur Verfügung:

- *19-Norandrostenedione* (100 mg ND/Kapsel)
- *CycloNorDione* (25 mg ND/ Sublingualtablette)
- *Norandrodiol* (100 mg NDiol/Kapsel)
- *Cyclo-Nordioliol* (25 mg NDiol/Sublingualtablette)

Die Studie wurde mit acht freiwilligen, männlichen Probanden durchgeführt, die durch medizinische Untersuchungen für geeignet befunden wurden und allen Ein- und Ausschlusskriterien entsprachen. Im Abstand von mindestens zwei Wochen erhielten alle Probanden jeweils eine Einzeldosis der Prohormon-Präparate. Vor und im Zeitraum von acht Stunden nach der Einnahme wurden den Probanden Blutproben abgenommen. Alle medizinischen Maßnahmen wurden von einer Prüffärztin im Institut für Sportmedizin und Kreislaufforschung der Deutschen Sporthochschule Köln durchgeführt. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln positiv bewertet und beim Kölner Gesundheitsamt sowie dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM, Bonn) angemeldet.

Die Analyse der Blutproben fand im Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln mit den Techniken der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) statt. Die dazu entwickelte Methode wurde anhand der *FDA Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation* validiert und erlaubte die Quantifizierung der applizierten Prohormone Norandrostendion bzw. Norandrostendiol, von Nandrolon und den Hauptmetaboliten Norandrosteron und Noretiocholanolon in den Plasmaproben der Probanden. Als pharmakologische Kenngrößen wurden die gemessenen Spitzenkonzentrationen aller Analyten im Plasma der Probanden ( $C_{max}$ ), die Zeitpunkt dieser Spitzenkonzentration nach Applikation ( $t_{max}$ ) sowie die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC) als Maß für die Bioverfügbarkeit bestimmt.

Die Einnahme einer 100 mg ND Kapsel führte zu maximalen Plasmakonzentrationen in der Konjugatfraktion von 35,1 ng/ml ( $\pm 27,1$ ) des applizierten Prohormons ND, 17,8 ng/ml ( $\pm 12,7$ ) Nandrolon, sowie 1045,6 ng/ml ( $\pm 366,9$ ) Norandrosteron und 353,6 ng/ml ( $\pm 122,4$ ) Noretiocholanolon. Die Anwendung einer 25 mg ND Sublingualtablette resultierte in  $C_{max}$ -Werten von 28,7 ng/ml ( $\pm 15,7$ ) für ND, 6,0 ng/ml ( $\pm 5,9$ ) für Nandrolon, 240,7 ng/ml ( $\pm 60,7$ ) für Norandrosteron und 74,8 ng/ml ( $\pm 32,8$ ) für Noretiocholanolon. Die perorale Verabreichung von 100 mg NDIol führte zu maximalen Plasmakonzentrationen von 1,1 ng/ml ( $\pm 0,7$ ) NDIol, 4,0 ng/ml ( $\pm 2,6$ ) Nandrolon sowie 154,8 ng/ml ( $\pm 130,8$ ) Norandrosteron und 37,7 ng/ml ( $\pm 6,9$ ) Noretiocholanolon. Die sublinguale Aufnahme von 25 mg NDIol resultierte in  $C_{max}$ -Werten von 3,3 ng/ml ( $\pm 0,9$ ) für NDIol, 11,0 ng/ml ( $\pm 6,4$ ) für Nandrolon, 106,3 ng/ml ( $\pm 40,1$ ) für Norandrosteron und 28,5 ng/ml ( $\pm 20,8$ ) für Noretiocholanolon. Nach Applikation von ND sowohl in Kapselform als auch über die Sublingualtablette führte zu mittleren  $C_{max}$ -Werten von unkonjugiert vorliegendem – pharmakologisch aktivem – Nandrolon von 1,0 ng/ml. Während nach peroral Einnahme von NDIol nur bei einem Probanden quantifizierbare Mengen an unkonjugierten Nandrolon festgestellt werden konnten ( $C_{max} = 0,7$  ng/ml), führte die sublinguale Aufnahme mit  $C_{max} = 4,5$  ng/ml ( $\pm 0,8$ ) zu einer eindeutigen Nachweisbarkeit von pharmakologisch aktivem Nandrolon bei allen Probanden.

Bezüglich der Zeitpunkte der Spitzenkonzentrationen in den Plasmaproben wurde festgestellt, dass die sublinguale Aufnahme der Prohormone in einer signifikant schnelleren Anflutung der Wirkstoffe und damit auch schnellerem Auftreten der verschiedenen Metaboliten im Gegensatz zur Kapseleinnahme resultierte. Insgesamt führte die Anwendung mittels Sublingualtablette zu sehr gleichförmigen Plasmakurven aller Analyten mit deutlichen Kon-

zentrationen- und -abstiegen bei allen Probanden. Die durch perorale Einnahme erzielten Plasmakonzentrationen wiesen starke interindividuelle Streuungen auf. Die teilweise nur sehr langsam abfallenden Konzentrationen führen im Vergleich zur sublingualen Applikation – trotz zum Teil niedrigerer  $C_{max}$ -Werte – zu deutlich höheren AUC-Werten.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen erstmalig anhand von Blutuntersuchungen die entstehenden Stoffwechselprodukte nach Einnahme der Nandrolon-Prohormone Norandrostendion und Norandrostendiol, insbesondere die im Phase-I-Metabolismus erfolgte enzymatische Umsetzung zu pharmakologisch aktivem Nandrolon. Die Entstehung teilweiser beträchtlicher Nandrolon-Mengen ist besonders kritisch zu betrachten, da bereits Plasmakonzentrationen zwischen 0,3–1,2 ng/ml als minimale Wirkkonzentrationen beschrieben wurden, die endokrinologische Wirkungen hervorrufen. Insbesondere die sublinguale NDiol-Aufnahme resultierte bei allen Probanden kurzfristig in Nandrolon-Spiegeln, die mit einer therapeutischen Nandrolon-Therapie vergleichbar sind. Diese Ergebnisse untermauern erstmals wissenschaftlich die Dringlichkeit des seit 2005 geltenden Verbots für den Verkauf dieser Prohormon-Präparate als Nahrungsergänzungsmittel.

Zur Abrundung die vorliegenden Studienergebnisse können zukünftig noch die Urinproben der Probanden, die auch während allen Ausscheidungsversuchen mit den verschiedenen Prohormon-Präparaten gesammelt wurden, analysiert werden. So können zu den jeweiligen Plasmakonzentrationen die korrespondierenden Konzentrationen der urinären Metaboliten bestimmt werden. Weiterhin ist eine Aussage über den Zeitraum der Nachweisbarkeit der Einnahme von ND bzw. NDiol über die Bestimmung des Hauptmetaboliten Norandrosteron im Urin möglich. Da in den vergangenen Jahren immer mehr neue Prohormone (u. a. von Testosteron, Dihydrotestosteron und Boldenon) entwickelt und als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben wurden, wäre auch hinsichtlich dieser Produkte die Gewinnung von wissenschaftliche Daten über den Metabolismus und die Sicherheit für die Anwender nötig. Die mit der 12. Novelle des Arzneimittelgesetzes eingetretene Verschärfung der Auflagen für klinische Prüfungen würde die Durchführung dieser Studien innerhalb der Hochschulforschung jedoch fast unmöglich machen.

## 6 Anhang

### 6.1 Tabellarische Auflistung aller Plasmakonzentrationen

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>ND</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V1</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:30	8,3	7,9	108,7	89,9	0,0
	0:45	78,7	35,4	782,5	473,2	1,3
	1:00	45,0	36,1	978,4	462,6	2,3
	1:30	30,8	40,6	989,2	352,3	2,1
	2:00	11,0	18,7	399,9	116,3	1,7
	3:00	9,0	9,9	225,0	57,2	1,3
	4:00	4,0	3,4	94,4	22,6	0,0
	6:00	2,1	1,8	30,0	12,3	0,0
	8:00	1,1	0,5	18,1	11,4	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>ND</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V2</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	4,0	8,0	44,6	62,6	0,0
	0:30	17,7	18,7	224,0	246,3	0,0
	0:45	19,3	30,5	440,7	358,2	0,7
	1:00	19,3	32,2	555,4	379,6	1,0
	1:30	14,4	30,4	544,7	286,8	0,8
	2:00	7,7	21,1	372,0	222,6	0,6
	3:00	5,3	6,6	149,2	137,0	0,0
	4:00	2,9	3,0	75,7	82,2	0,0
	6:00	0,9	0,6	20,9	31,7	0,0
	8:00	1,0	0,0	18,4	28,5	0,0
	24:00	0,0	0,0	6,0	6,8	0,0

**Tabelle 25: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V1–V2 nach oraler Applikation von 100 mg ND**

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>ND</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V3</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:30	3,6	2,4	350,3	120,9	0,0
	0:45	4,5	3,3	754,4	188,1	0,0
	1:00	4,3	4,3	1020,4	218,5	0,0
	1:30	6,0	5,4	1252,7	278,2	0,0
	2:00	7,8	8,5	1644,8	333,3	0,0
	3:00	3,2	2,2	529,1	83,2	0,0
	4:00	0,8	0,6	112,3	24,3	0,0
	6:00	0,0	0,0	48,4	16,3	0,0
	8:00	0,0	0,0	25,5	9,4	0,0
	24:00	0,0	0,0	6,2	0,0	0,0
<b>V4</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:30	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:45	0,7	0,6	15,7	7,8	0,0
	1:00	59,7	11,2	269,7	175,4	1,4
	1:30	64,5	17,0	670,7	352,1	2,8
	2:00	46,7	15,8	681,3	261,1	3,2
	3:00	22,4	8,3	456,3	138,6	1,6
	4:00	9,5	3,1	193,0	53,5	0,7
	6:00	3,3	1,5	68,1	19,8	0,0
	8:00	2,4	0,8	32,0	12,4	0,0
	24:00	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>V5</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	2,1	2,4	120,7	70,9	0,0
	0:30	49,3	8,9	714,7	392,2	0,6
	0:45	55,5	19,9	1178,2	470,8	0,7
	1:00	50,5	16,9	1476,8	549,0	0,8
	1:30	14,0	7,8	1192,7	239,2	0,5
	2:00	8,3	5,6	747,0	129,3	0,7
	3:00	4,4	1,8	292,3	41,5	0,5
	4:00	2,2	0,8	120,7	17,2	0,0
	6:00	1,0	0,5	101,7	20,8	0,0
	8:00	0,9	0,3	51,2	8,2	0,0
	24:00	0,0	0,0	7,0	1,6	0,0

**Tabelle 26: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V3–V5 nach oraler Applikation von 100 mg ND**

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>ND</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V6</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	2,7	0,0	0,0	1,1	0,0
	0:20	5,4	2,8	212,0	102,2	0,0
	0:30	15,3	5,4	624,2	232,9	0,0
	0:45	16,0	7,9	901,6	287,4	0,0
	1:00	25,8	9,1	1037,3	270,6	0,0
	1:30	8,5	9,0	814,4	163,4	0,0
	2:00	7,1	7,6	738,5	141,4	0,0
	3:00	8,5	8,3	655,2	113,4	0,0
	4:00	5,3	6,1	447,4	66,2	0,0
	6:00	3,2	1,2	107,0	30,9	0,0
	8:00	0,0	0,0	29,0	10,3	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>V7</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	1,4	2,2	108,8	55,5	0,0
	0:30	24,5	6,7	466,5	245,0	0,0
	0:45	27,5	11,4	786,8	313,4	0,8
	1:00	14,9	11,1	904,2	223,6	0,7
	1:30	12,0	9,5	764,3	148,7	0,7
	2:00	8,0	6,7	565,9	94,0	0,6
	3:00	3,4	2,2	230,0	33,1	0,0
	4:00	1,7	0,9	93,0	14,5	0,0
	6:00	0,7	0,0	32,6	5,0	0,0
	8:00	1,0	0,0	20,7	6,8	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>V8</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:30	0,0	0,0	24,0	0,0	0,0
	0:45	0,8	0,8	162,3	24,9	0,0
	1:00	1,0	1,2	268,5	34,8	0,0
	1:30	1,0	2,1	375,0	52,4	0,0
	2:00	1,4	2,8	495,3	56,5	0,0
	3:00	3,6	4,5	1075,9	140,7	0,0
	4:00	2,1	3,0	673,5	78,0	0,0
	6:00	1,0	1,7	291,0	31,4	0,0
	8:00	0,5	0,9	118,8	16,9	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabelle 27: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V6–V8 nach oraler Applikation von 100 mg ND**

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>ND</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V1</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	24,6	0,8	9,5	6,4	0,5
	0:20	38,7	5,2	155,0	71,9	1,0
	0:30	28,3	8,1	243,5	99,4	1,2
	0:45	26,3	14,9	298,5	110,6	1,0
	1:00	25,9	17,2	314,2	105,0	1,2
	1:30	10,8	11,8	223,9	58,6	1,2
	2:00	5,7	6,1	107,6	24,0	0,7
	3:00	2,1	1,9	36,2	7,6	0,0
	4:00	1,0	0,9	11,8	0,0	0,0
	6:00	0,5	0,0	5,2	0,0	0,0
	8:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>V2</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	18,0	0,6	0,0	0,0	0,0
	0:20	60,2	2,2	27,0	14,6	1,4
	0:30	54,7	8,6	75,0	60,7	1,6
	0:45	18,1	12,7	196,3	114,9	1,8
	1:00	22,0	12,7	211,5	103,0	1,4
	1:30	11,6	6,8	142,3	54,9	0,9
	2:00	4,8	2,9	81,4	29,6	0,7
	3:00	1,6	1,2	40,7	24,3	0,0
	4:00	1,0	0,6	19,3	11,8	0,0
	6:00	0,5	0,0	10,1	8,1	0,0
	8:00	0,0	0,0	5,2	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>V3</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	13,5	0,0	10,8	0,0	0,8
	0:20	7,8	0,5	61,7	8,9	0,0
	0:30	5,8	1,0	139,1	18,5	0,0
	0:45	4,4	0,7	145,4	16,7	0,0
	1:00	2,5	0,6	122,4	12,6	0,0
	1:30	2,2	0,8	160,1	16,9	0,0
	2:00	1,5	0,9	169,1	17,4	0,0
	3:00	0,0	1,1	124,1	13,1	0,0
	4:00	0,0	0,0	93,7	8,6	0,0
	6:00	0,0	0,0	70,2	6,7	0,0
	8:00	0,0	0,0	7,8	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabelle 28: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V1–V3 nach sublingualer Applikation von 25 mg ND**

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>ND</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V4</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	17,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	24,9	1,1	35,8	19,0	1,1
	0:30	18,0	1,8	81,7	39,8	0,5
	0:45	11,6	2,3	110,1	47,7	0,7
	1:00	9,6	3,2	142,7	60,2	0,7
	1:30	7,0	4,6	209,3	82,9	0,5
	2:00	4,5	3,9	169,4	57,7	0,5
	3:00	2,0	1,2	74,5	22,2	0,0
	4:00	1,1	0,6	37,4	12,8	0,0
	6:00	1,1	0,5	37,1	12,3	0,0
	8:00	0,6	0,0	24,6	7,7	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>ND</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V5</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	6,4	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	12,5	0,0	35,5	15,3	0,0
	0:30	11,3	0,0	99,0	38,6	0,0
	0:45	8,2	0,0	173,3	56,6	0,0
	1:00	5,5	0,6	154,4	44,2	0,0
	1:30	2,7	0,0	89,4	22,1	0,0
	2:00	1,7	0,0	57,2	14,0	0,0
	3:00	1,0	0,0	91,8	21,9	0,0
	4:00	1,0	0,0	45,4	12,4	0,0
	6:00	0,5	0,0	22,1	7,6	0,0
	8:00	0,0	0,0	12,5	5,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>ND</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V6</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	14,9	0,6	9,1	0,0	0,0
	0:20	26,9	2,7	87,7	26,4	1,0
	0:30	19,2	5,5	223,9	64,1	1,0
	0:45	22,9	4,6	318,2	79,0	0,8
	1:00	9,8	4,8	317,2	68,8	0,8
	1:30	5,4	4,6	299,0	56,8	0,7
	2:00	2,5	2,8	240,4	36,6	0,6
	3:00	1,8	1,0	90,2	12,8	0,0
	4:00	1,5	0,6	29,6	0,0	0,0
	6:00	0,6	0,0	12,7	0,0	0,0
	8:00	0,0	0,0	11,5	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabelle 29: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V4–V6 nach sublingualer Applikation von 25 mg ND**

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>ND</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V7</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	4,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	23,9	0,7	16,2	8,8	0,6
	0:30	33,7	1,0	40,6	20,1	0,8
	0:45	33,0	1,6	85,2	39,4	1,2
	1:00	23,9	2,2	135,9	56,6	1,2
	1:30	15,8	4,6	236,0	90,2	1,4
	2:00	9,9	3,4	161,2	50,7	0,8
	3:00	3,6	1,9	78,5	18,8	0,0
	4:00	2,0	1,0	34,1	8,6	0,0
	6:00	0,8	0,0	10,1	0,0	0,0
	8:00	0,6	0,0	6,6	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>ND</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V8</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	17,0	0,6	13,1	0,0	0,0
	0:20	18,9	0,8	95,9	17,0	0,9
	0:30	17,1	1,7	233,0	38,0	0,7
	0:45	9,0	1,7	294,1	45,6	0,8
	1:00	8,2	1,6	275,7	39,3	0,6
	1:30	3,9	1,2	219,2	26,6	0,5
	2:00	2,2	1,0	168,9	20,6	0,0
	3:00	1,1	1,0	176,6	19,8	0,0
	4:00	0,7	0,6	82,6	9,0	0,0
	6:00	0,0	0,0	19,2	0,0	0,0
	8:00	0,8	0,0	11,1	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabelle 30: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V7–V8 nach sublingualer Applikation von 25 mg ND**

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V1</b>	0:00	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:30	0,7	2,9	26,6	11,3	0,0
	0:45	1,0	5,8	57,6	17,8	0,0
	1:00	1,6	8,8	94,0	27,4	0,0
	1:30	1,3	6,3	70,4	18,2	0,0
	2:00	1,7	7,6	91,8	25,9	0,0
	3:00	2,2	8,0	144,8	34,8	0,0
	4:00	2,2	4,6	68,7	17,0	0,0
	6:00	1,4	4,3	48,8	13,3	0,0
	8:00	2,3	4,6	62,5	18,5	0,0
	24:00	1,0	0,5	15,3	15,1	0,0
<b>V2</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	1,4	8,5	9,0	0,0
	0:30	1,0	2,6	32,3	22,0	0,0
	0:45	1,1	3,1	53,4	28,7	0,0
	1:00	1,3	2,9	47,7	25,3	0,0
	1:30	0,4	3,2	45,9	26,5	0,0
	2:00	1,0	3,3	45,1	25,3	0,0
	3:00	1,6	4,6	38,5	39,3	0,0
	4:00	1,0	3,3	25,6	37,4	0,0
	6:00	1,2	2,6	25,1	34,1	0,0
	8:00	0,7	2,1	21,5	34,2	0,0
	24:00	0,0	0,0	6,9	28,2	0,0
<b>V3</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	0,6	24,3	11,1	0,0
	0:30	0,0	1,3	57,5	17,5	0,0
	0:45	0,0	1,6	68,2	15,9	0,0
	1:00	0,0	1,3	66,4	13,5	0,0
	1:30	0,0	1,3	74,0	12,2	0,0
	2:00	0,0	1,1	66,7	10,4	0,0
	3:00	0,8	1,3	95,1	21,0	0,0
	4:00	0,8	1,2	85,5	22,0	0,0
	6:00	0,5	0,9	59,4	19,2	0,0
	8:00	0,0	0,6	40,4	19,5	0,0
	24:00	0,0	0,0	19,2	24,5	0,0

**Tabelle 31: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V1–V3 nach oraler Applikation von 100 mg NDiol**

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V4</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:30	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:45	0,0	1,3	19,3	11,2	0,0
	1:00	0,0	2,0	39,6	19,9	0,0
	1:30	0,0	2,9	65,1	25,8	0,0
	2:00	0,0	2,9	69,6	26,2	0,0
	3:00	0,7	3,5	116,4	41,9	0,0
	4:00	1,0	2,1	67,8	22,2	0,0
	6:00	0,6	2,5	50,3	17,5	0,0
	8:00	0,9	2,1	46,6	18,3	0,0
	24:00	0,0	0,0	11,5	0,0	0,0

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V5</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:30	0,0	0,0	15,6	6,9	0,0
	0:45	0,0	0,0	24,3	9,4	0,0
	1:00	0,0	0,0	28,7	11,0	0,0
	1:30	0,0	0,0	56,0	16,9	0,0
	2:00	0,0	0,0	142,4	40,3	0,0
	3:00	0,0	0,0	51,1	16,9	0,0
	4:00	0,0	0,0	31,5	15,2	0,0
	6:00	0,0	0,0	33,6	17,2	0,0
	8:00	0,0	0,0	34,1	16,9	0,0
	24:00	0,0	0,0	6,5	7,0	0,0

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V6</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:30	0,0	0,8	23,3	13,3	0,0
	0:45	0,0	2,5	52,6	23,8	0,0
	1:00	0,6	2,5	82,4	25,4	0,0
	1:30	0,0	5,5	123,5	35,7	0,0
	2:00	0,7	5,5	169,2	33,3	0,0
	3:00	0,8	3,0	111,5	21,6	0,0
	4:00	0,8	2,9	72,0	21,4	0,0
	6:00	0,0	1,5	44,1	28,4	0,0
	8:00	0,0	1,0	72,7	44,1	0,0
	24:00	0,0	0,0	28,4	31,7	0,0

**Tabelle 32: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V4–V6 nach oraler Applikation von 100 mg NDiol**

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V7</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:30	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:45	0,7	2,7	32,5	26,6	0,7
	1:00	1,0	3,6	55,5	32,1	0,6
	1:30	0,0	3,0	48,6	22,7	0,0
	2:00	0,0	2,0	42,4	18,4	0,0
	3:00	0,0	1,1	39,5	13,9	0,0
	4:00	0,0	1,1	30,4	12,1	0,0
	6:00	0,0	1,5	26,7	16,4	0,0
	8:00	0,0	1,5	36,5	23,2	0,0
	24:00	0,0	0,6	17,9	21,7	0,0

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V8</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:30	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:45	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1:00	0,0	0,0	8,7	0,0	0,0
	1:30	0,0	0,0	9,7	0,0	0,0
	2:00	0,0	0,0	12,0	0,0	0,0
	3:00	0,0	0,0	19,3	0,0	0,0
	4:00	0,0	0,0	30,8	0,0	0,0
	6:00	0,7	1,4	95,0	10,7	0,0
	8:00	1,7	4,1	461,7	44,9	0,0
	24:00	0,6	0,0	31,3	23,0	0,0

**Tabelle 33: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V7–V8 nach oraler Applikation von 100 mg NDiol**

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V1</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	4,0	5,6	9,5	0,0	1,6
	0:20	3,8	13,7	55,0	14,5	2,2
	0:30	4,3	19,9	111,0	27,0	3,2
	0:45	3,2	16,0	117,5	26,0	3,0
	1:00	1,8	11,9	109,2	20,7	2,2
	1:30	1,8	9,4	113,5	25,6	1,2
	2:00	1,1	4,3	71,0	14,1	0,6
	3:00	0,0	1,7	29,9	5,4	0,0
	4:00	0,0	0,9	14,0	0,0	0,0
	6:00	0,0	0,6	8,2	0,0	0,0
	8:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V2</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	3,3	3,7	0,0	0,0	4,0
	0:20	3,7	8,8	16,6	6,5	5,7
	0:30	3,5	16,7	66,1	25,6	4,8
	0:45	2,7	20,2	116,4	40,8	3,8
	1:00	2,6	12,0	93,3	30,1	2,8
	1:30	1,1	6,4	63,0	16,4	1,2
	2:00	1,4	4,7	42,9	13,2	0,8
	3:00	0,8	1,5	18,3	8,9	0,0
	4:00	0,0	0,9	11,3	5,4	0,0
	6:00	0,0	0,0	5,7	0,0	0,0
	8:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V3</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	2,9	3,5	5,6	0,0	3,8
	0:20	3,3	11,0	70,7	41,1	5,0
	0:30	2,9	13,7	171,7	72,2	4,0
	0:45	1,6	8,4	152,5	66,3	3,0
	1:00	1,1	6,1	157,5	60,6	2,0
	1:30	0,7	4,1	145,7	47,0	0,9
	2:00	0,0	1,8	64,6	20,0	0,7
	3:00	0,0	0,6	29,6	9,2	0,0
	4:00	0,0	0,0	16,0	5,3	0,0
	6:00	0,0	0,0	7,5	0,0	0,0
	8:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabelle 34: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V1–V3 nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol**

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V4</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	0,8	0,8	0,0	0,0	0,8
	0:20	1,5	2,5	5,1	0,0	2,3
	0:30	1,6	4,3	19,0	6,5	3,1
	0:45	1,3	4,2	29,9	9,4	2,6
	1:00	0,9	4,4	34,9	11,3	2,0
	1:30	0,6	3,6	41,8	12,2	1,2
	2:00	0,0	2,9	37,2	10,7	0,9
	3:00	0,0	2,2	35,6	10,2	0,0
	4:00	0,0	1,0	16,4	0,0	0,0
	6:00	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
	8:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V5</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	2,1	3,2	0,0	0,0	2,3
	0:20	2,2	5,5	10,1	0,0	3,8
	0:30	1,7	5,4	37,4	9,1	3,6
	0:45	1,2	4,1	63,9	14,3	2,9
	1:00	1,0	3,6	70,5	12,9	2,3
	1:30	0,6	2,4	61,3	12,2	1,4
	2:00	0,0	0,7	43,5	6,3	0,7
	3:00	0,0	0,0	14,8	0,0	0,0
	4:00	0,0	0,0	8,1	0,0	0,0
	6:00	0,0	0,0	5,6	0,0	0,0
	8:00	0,0	0,0	8,7	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V6</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	1,9	2,1	0,0	0,0	1,7
	0:20	4,3	5,6	11,7	0,0	4,4
	0:30	3,7	6,5	40,2	7,8	4,5
	0:45	2,7	4,7	83,7	14,7	3,6
	1:00	1,8	4,5	80,9	12,4	2,3
	1:30	0,8	2,6	52,2	7,7	1,4
	2:00	0,0	2,1	50,6	7,3	0,9
	3:00	0,0	2,0	63,4	8,6	0,0
	4:00	0,0	1,1	45,6	5,7	0,0
	6:00	0,0	0,9	39,1	5,0	0,0
	8:00	0,0	0,0	20,5	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabelle 35: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V4–V6 nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol**

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V7</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	2,6	3,7	0,0	0,0	2,7
	0:20	3,5	6,9	17,1	6,2	4,6
	0:30	3,5	7,0	34,9	11,5	5,2
	0:45	3,6	7,9	69,6	22,6	4,7
	1:00	3,2	11,4	116,5	34,8	4,2
	1:30	1,8	7,2	107,0	27,5	2,6
	2:00	1,1	3,8	59,5	12,6	1,2
	3:00	1,0	0,7	17,1	0,0	0,0
	4:00	0,0	0,0	13,2	0,0	0,0
	6:00	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0
	8:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<i>Proband</i>	<i>t</i> (h:mm)	<i>NDiol</i> (ng/ml)	<i>NL</i> (ng/ml)	<i>NA</i> (ng/ml)	<i>NE</i> (ng/ml)	<i>NL<sub>unc</sub></i> (ng/ml)
<b>V8</b>	0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0:10	2,8	3,2	0,0	0,0	2,4
	0:20	3,4	5,9	29,4	0,0	4,3
	0:30	3,2	6,7	62,3	7,0	4,4
	0:45	1,8	4,7	107,1	10,8	3,7
	1:00	0,0	3,5	132,6	12,0	2,5
	1:30	0,0	2,2	111,2	9,2	1,7
	2:00	0,0	2,1	113,0	9,1	1,0
	3:00	0,0	0,6	56,9	0,0	0,0
	4:00	0,0	0,0	31,5	0,0	0,0
	6:00	0,0	0,0	16,9	0,0	0,0
	8:00	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
	24:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabelle 36: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V4–V6 nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol**

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: a: Perhydrocyclopentaphenanthren mit 17 Kohlenstoffatomen und den Ringen A–D; b: Strukturformel von Testosteron ( $M_w = 288$ ) .....	3
Abbildung 2: Biosynthese des Testosterons .....	7
Abbildung 3: Metabolismus von Testosteron.....	9
Abbildung 4: Metabolismus von Testosteron; (24), modifiziert .....	10
Abbildung 5: Strukturformeln von Phase II-Metaboliten des Testosterons: Testosteron-17-O-glucuronid und Androsteron- bzw. Etiocholanolon-3-O-glucuronid.....	11
Abbildung 6: Strukturformel von Nandrolon ( $M_w = 274$ ).....	14
Abbildung 7: Nandrolon wird in Phase I zu Norandrosteron und Noretiocholanolon metabolisiert (oben, $M_w = 276$ ) und als dessen 3-O-Glucuronide im Urin ausgeschieden (unten, $M_w = 452$ ).....	15
Abbildung 8: Plasmaspiegelverläufe von Nandrolon nach einmaliger <i>i. m.</i> Injektion von 50, 100 bzw. 150 mg Nandrolondecanoat (51).....	18
Abbildung 9: Plasmaspiegelverläufe von Nandrolon (oben) und Testosteron (unten) nach glutealer Injektion von 100 mg Nandrolonphenylpropionat in 4 ml Arachisöl (Erdnussöl) (◆) oder glutealer Injektion von 100 mg Nandrolondecanoat in 4 ml (○) bzw. 1 ml (●) Arachisöl oder nach deltoider Injektion von 100 mg Nandrolondecanoat in 1 ml Arachisöl (■)(53). .....	19
Abbildung 10: Auszug aus der Dopingliste 2006 der Welt Anti-Doping Agentur (WADA), modifiziert.....	20
Abbildung 11: Die Nandrolon-Prohormone Norandrostendion (NDion; $M_w = 272$ ), $\Delta_4$ -Norandrostendiol (NDiol; $M_w = 276$ ) und $\Delta^5$ -Norandrostendiol (5-NDiol; $M_w = 276$ ) werden zu Norandrosteron und Noretiocholanolon metabolisiert – die intermediäre Bildung von Nandrolon wurde bisher nicht bestätigt .....	24
Abbildung 12: Veranschaulichung der Prohormon-Aufnahme über den Gastro-Intestinal-Trakt (orale Applikation, links) bzw. über die Mundschleimhaut (sublinguale und bukkale Applikation); Quelle: <a href="http://www.netrition.com/cycloplex_page.html">http://www.netrition.com/cycloplex_page.html</a> .....	27
Abbildung 13: Aufarbeitungsschema für die Gesamtfraktion der Norsteroiden im Plasma.....	38
Abbildung 14: Aufarbeitungsschema für die freie Fraktion der Norsteroiden im Plasma.....	39
Abbildung 15: Berechnung der Signalgröße a) allgemein, b) mit Flächenkorrektur am Beispiel von NL, wobei die Fläche des deuterierten ISTDs um ca. 3% des Nandrolonsignals (entspricht Isotop auf $m/z$ 421) korrigiert wird.....	41

Abbildung 16: EI-Massenspektren der bis-TMS-Derivate von a) Norandrostendion ( $M_W = 416$ ), b) Nandrolon ( $M_W = 418$ ) und dem IStd $d_3$ -Nandrolon ( $M_W = 421$ ).....	51
Abbildung 17: EI-Massenspektren der bis-TMS-Derivate von a) $\Delta^4$ -Norandrostendiol ( $M_W = 420$ ), b) $\Delta^5$ -Norandrostendiol ( $M_W = 420$ ) und dem IStd $d_3$ -Norandrostendiol ( $\Delta^4$ , $M_W = 423$ ).....	52
Abbildung 18: EI-Massenspektren der bis-TMS-Derivate von a) Norandrosteron ( $M_W = 420$ ), b) Noretiocholanolon ( $M_W = 420$ ) und dem IStd $d_3$ -Noretiocholanolon ( $M_W = 423$ ).....	53
Abbildung 19: Massenspektrum von 5-Androstendiol-bis-TMS .....	55
Abbildung 20: GC/MS-Chromatogramm nach Aufarbeitung einer Plasmaprobe mit 50 ng/ml NA und NE sowie 5 ng/ml ND, NDiol und NL und dem IStd (40 ng/ml $d_3$ -NE, 5 ng/ml $d_3$ -NDiol, 4 ng/ml $d_3$ -NL), Messung als bis-TMS-Derivate, Extraktion der charakteristischen Ionenspuren.....	56
Abbildung 21: GC/MS-Analyse einer Plasmaprobe, die eine Stunde nach Einnahme von 25 mg NDiol als Sublingualtablette abgenommen wurde. Die Analyten sind mit durchgezogenen Linien, die IStds mit gepunkteten Linien kenntlich gemacht (Konzentrationen siehe Tabelle 14). .....	58
Abbildung 22: Diagramm zur Ermittlung der Kalibrierfunktion von $NL_{unc}$ .....	60
Abbildung 23: GC-MS-Chromatogramm für $m/z$ 418 einer Plasmaprobe mit 0,2 ng/ml NL (a) sowie eines Plasmablanks (b).....	61
Abbildung 24: GC-MS-Chromatogramm einer Plasmaprobe mit 0,5 ng/ml NL ( $m/z$ 418).....	62
Abbildung 25: Plasmaspiegelverläufe von ND nach oraler Applikation von 100 mg ND .....	67
Abbildung 26: Plasmaspiegelverläufe von NL nach oraler Applikation von 100 mg ND.....	68
Abbildung 27: Plasmaspiegelverläufe von NA nach oraler Applikation von 100 mg ND .....	69
Abbildung 28: Plasmaspiegelverläufe von NE nach oraler Applikation von 100 mg ND.....	69
Abbildung 29: Plasmaspiegelverläufe von $NL_{unc}$ nach oraler Applikation von 100 mg ND... ..	70
Abbildung 30: Plasmaspiegelverläufe von ND nach sublingualer Applikation von 25 mg ND .....	71
Abbildung 31: Plasmaspiegelverläufe von NL nach sublingualer Applikation von 25 mg ND .....	72
Abbildung 32: Plasmaspiegelverläufe von NA nach sublingualer Applikation von 25 mg ND .....	73
Abbildung 33: Plasmaspiegelverläufe von NE nach sublingualer Applikation von 25 mg ND .....	73

Abbildung 34: Plasmaspiegelverläufe von NL <sub>unc</sub> nach sublingualer Applikation von 25 mg ND .....	74
Abbildung 35: Plasmaspiegelverläufe von NDiol nach oraler Applikation von 100 mg NDiol .....	75
Abbildung 36: Plasmaspiegelverläufe von NL nach oraler Applikation von 100 mg NDiol...	76
Abbildung 37: Plasmaspiegelverläufe von NA nach oraler Applikation von 100 mg NDiol..	77
Abbildung 38: Plasmaspiegelverläufe von NE nach oraler Applikation von 100 mg NDiol...	78
Abbildung 39: Plasmaspiegelverläufe von NL <sub>unc</sub> nach oraler Applikation von 100 mg NDiol .....	79
Abbildung 40: Plasmaspiegelverläufe von NDiol nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol .....	80
Abbildung 41: Plasmaspiegelverläufe von NL nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol .....	81
Abbildung 42: Plasmaspiegelverläufe von NA nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol .....	82
Abbildung 43: Plasmaspiegelverläufe von NE nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol .....	82
Abbildung 44: Plasmaspiegelverläufe von NL <sub>unc</sub> nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol .....	83
Abbildung 45: Konzentrations-Zeit-Verläufe von NL <sub>unc</sub> im Plasma nach Applikation a) einer 100 mg ND Kapsel, b) einer 25 mg ND Sublingualtablette, c) einer 100 mg NDiol Kapsel und d) einer 25 mg NDiol Sublingualtablette; der Bereich der minimalen effektiven Konzentration ist schattiert dargestellt.....	85
Abbildung 46: Graphische Darstellung der mittleren resultierenden AUC-Werte (+ SD) für ND bzw. NDiol nach Applikation der entsprechenden Prohormon- Präparate .....	87
Abbildung 47: Graphische Darstellung der mittleren resultierenden AUC-Werte (+ SD) für NL nach Applikation der entsprechenden Prohormon-Präparate.....	87
Abbildung 48: Graphische Darstellung der mittleren resultierenden AUC-Werte (+ SD) für NA nach Applikation der entsprechenden Prohormon-Präparate .....	88
Abbildung 49: Graphische Darstellung der mittleren resultierenden AUC-Werte (+ SD) für NE nach Applikation der entsprechenden Prohormon-Präparate.....	88
Abbildung 50: Graphische Darstellung der mittleren resultierenden AUC-Werte (+ SD) für NL <sub>unc</sub> nach Applikation der entsprechenden Prohormon-Präparate.....	88

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Analyten.....	29
Tabelle 2: Interne Standards.....	30
Tabelle 3: Prohormon-Präparate.....	32
Tabelle 4: Liste der Prüfpräparate und der verabreichten Dosierungen.....	35
Tabelle 5: Zeitpunkte der Blutabnahmen nach Prohormon-Applikation.....	36
Tabelle 6: Sammelschema für Urinproben.....	36
Tabelle 7: Charakteristische Fragmentionen der Analyten und IStds.....	40
Tabelle 8: Konzentrationen der Standardlösungen der Analyten und IStds.....	42
Tabelle 9: Konzentrationen und korrespondierende Analyten der deuterierten internen Standards.....	43
Tabelle 10: Arbeitsbereiche und Konzentrationen der Analyten zur Überprüfung der Linearität.....	44
Tabelle 11: Konzentrationen der Analyten zur Überprüfung der Wiederfindung.....	46
Tabelle 12: Retentionszeiten und charakteristische Ionen der Referenzverbindungen und der extra-hierten Prohormon-Präparate nach GC/MS-Messung der bis-TMS-Derivate.....	54
Tabelle 13: Zuordnung der Norsterioide zu den Retentionszeiten über die extrahierten Ionenspuren ( $m/z$ ).....	57
Tabelle 14: Ermittelte Konzentrationen der Analyten eine Stunde nach Applikation von 25 mg NDIol als Sublingualtablette bei einem Probanden (V1).....	57
Tabelle 15: Arbeitsbereiche und Konzentrationen der Analyten zur Überprüfung der Linearität.....	59
Tabelle 16: Berechnung der Ist-Konzentration über die Flächenwerte von $NL_{unc}$ und $d_3$ -NL.....	60
Tabelle 17: Nachweisgrenzen der Analyten.....	61
Tabelle 18: Auflistung der LLOQs mit den ermittelten Werten für Richtigkeit und Präzision.....	62
Tabelle 19: Bestimmung von Richtigkeit und Präzision für alle Analyten.....	63
Tabelle 20: Berechnung von Richtigkeit und Präzision am Beispiel von $NL_{unc}$ .....	64

---

Tabelle 21: Wiederfindungsraten für alle Analyten.....	65
Tabelle 22: Bestimmung der Wiederfindungsrate von $NL_{unc}$ bei einer Konzentration von 2,5 ng/ml.....	65
Tabelle 23: Zusammenfassung der berechneten pharmakokinetischen Parameter $C_{max}$ , $t_{max}$ und AUC. Die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte ( $\pm$ SD) berechnet aus den jeweiligen Werten der acht Probanden dar. * nur bei einem Probanden bestimmbar; MW nicht berechnet.....	86
Tabelle 24: Ergebnisse der $p$ -Wert Berechnungen für $C_{max}$ , $t_{max}$ und AUC für den Vergleich zwischen peroraler und sublingualer Prohormon-Applikation.....	89
Tabelle 25: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V1–V2 nach oraler Applikation von 100 mg ND .....	95
Tabelle 26: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V3–V5 nach oraler Applikation von 100 mg ND .....	96
Tabelle 27: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V6–V8 nach oraler Applikation von 100 mg ND .....	97
Tabelle 28: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V1–V3 nach sublingualer Applikation von 25 mg ND .....	98
Tabelle 29: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V4–V6 nach sublingualer Applikation von 25 mg ND .....	99
Tabelle 30: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V7–V8 nach sublingualer Applikation von 25 mg ND .....	100
Tabelle 31: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V1–V3 nach oraler Applikation von 100 mg NDiol .....	101
Tabelle 32: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V4–V6 nach oraler Applikation von 100 mg NDiol .....	102
Tabelle 33: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V7–V8 nach oraler Applikation von 100 mg NDiol .....	103
Tabelle 34: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V1–V3 nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol .....	104
Tabelle 35: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V4–V6 nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol .....	105
Tabelle 36: Plasmakonzentrationen der Analyten bei den Probanden V4–V6 nach sublingualer Applikation von 25 mg NDiol .....	106

## 6.4 Literaturverzeichnis

- (1) Uralets, V. P., and Gillette, P. A. (1999) Over-the-counter anabolic steroids 4-androsten-3,17-dione; 4-androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol; and 19-nor-4-androsten-3,17-dione: excretion studies in men. *J Anal Toxicol* 23, 357-66.
- (2) Nieschlag, E., and Behre, H. M. (2004) *Testosterone - Action, Deficiency, Substitution*, 3<sup>rd</sup> ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- (3) Arlt, W. (2006) Androgen therapy in women. *Eur J Endocrinol* 154, 1-11.
- (4) Lüllmann, H., and Mohr, K. (1999) *Pharmakologie und Toxikologie*, 14. Ausgabe, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- (5) Bergink, E. W., Janssen, P. S., Turpijn, E. W., and van der Vies, J. (1985) Comparison of the receptor binding properties of nandrolone and testosterone under in vitro and in vivo conditions. *J Steroid Biochem* 22, 831-6.
- (6) Toth, M., and Zakar, T. (1982) Different binding of testosterone, 19-nortestosterone and their 5 alpha-reduced derivatives to the androgen receptor of the rat seminal vesicle: a step toward the understanding of the anabolic action of nortestosterone. *Endokrinologie* 80, 163-72.
- (7) Wilson, J. D. (1999) The role of androgens in male gender role behavior. *Endocr Rev* 20, 726-37.
- (8) Bagatell, C. J., and Bremner, W. J. (1996) Androgens in men--uses and abuses. *N Engl J Med* 334, 707-14.
- (9) Griggs, R. C., Kingston, W., Jozefowicz, R. F., Herr, B. E., Forbes, G., and Halliday, D. (1989) Effect of testosterone on muscle mass and muscle protein synthesis. *J Appl Physiol* 66, 498-503.
- (10) Mooradian, A. D., Morley, J. E., and Korenman, S. G. (1987) Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 8, 1-28.
- (11) Thews, Mutschler, and Vaupel (1999) *Anatomie, Physiologie, Pathologie des Menschen*, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- (12) Bhasin, S., Storer, T. W., Berman, N., Yarasheski, K. E., Clevenger, B., Phillips, J., Lee, W. P., Bunnell, T. J., and Casaburi, R. (1997) Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 407-13.
- (13) Brodsky, I. G., Balagopal, P., and Nair, K. S. (1996) Effects of testosterone replacement on muscle mass and muscle protein synthesis in hypogonadal men--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3469-75.

- (14) Bhasin, S., Storer, T. W., Berman, N., Callegari, C., Clevenger, B., Phillips, J., Bunnell, T. J., Tricker, R., Shirazi, A., and Casaburi, R. (1996) The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med* 335, 1-7.
- (15) Anderson, D. C. (1974) Sex-hormone-binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 3, 69-96.
- (16) Quigley, C. A., De Bellis, A., Marschke, K. B., el-Awady, M. K., Wilson, E. M., and French, F. S. (1995) Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16, 271-321.
- (17) Simoncini, T., and Genazzani, A. R. (2003) Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 148, 281-92.
- (18) Payne, A. H., and Hales, D. B. (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 25, 947-70.
- (19) Peltoketo, H., Luu-The, V., Simard, J., and Adamski, J. (1999) 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol* 23, 1-11.
- (20) Simard, J., Ricketts, M. L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, F. A., and Melner, M. H. (2005) Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev* 26, 525-82.
- (21) Derendorf, H., Gramatte, T., and Schäfer, H. (2002) *Pharmakokinetik - Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie*, 2 ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- (22) Schänzer, W. (1996) Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin Chem* 42, 1001-20.
- (23) Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S. X., Simard, J., Labrie, C., El-Alfy, M., Pelletier, G., and Belanger, A. (2000) Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol* 25, 1-16.
- (24) Schänzer, W., and Donike, M. (1996) in *Proceedings of the 14th Cologne Workshop on Dope Analysis* (Schänzer, W., Geyer, H., Gotzmann, A., and Mareck-Engelke, U., Eds.) pp 185-201, Sport & Buch Strauss, Edition Sport, Cologne.
- (25) Träger, L. (1977) *Biosynthese Stoffwechsel Wirkung*, Springer Verlag, Berlin.
- (26) Robel, P., Emiliozzi, R., and Baulieu, E.-E. (1967) Metabolism of Dehydroisoandrosterone Glucuronide. *J Clin Endocrinol Metab* 27, 1290-1302.
- (27) Hadd, H. E., and Blickenstaff, R. T. (1969) Conjugates of Steroid Hormones. *Academic Press New York-London*, 95-213.

- 
- (28) Matsui, M., Kawase, M., and Okada, M. (1974) Preparation and Stability in Solution of Androstenedione 3-Enol Glucosiduronate. *Chem Pharm Bull* 22, 2530-2537.
- (29) Dessypris, A. G. (1975) Testosterone sulphate, its biosynthesis, metabolism, measurement, functions and properties. *J Steroid Biochem* 6, 1287-98.
- (30) Camacho, A. M., and Migeon, C. J. (1964) Studies on the Origin of Testosterone in the Urine of Normal Adult Subjects and Patients with Various Endocrine Disorders. *J Clin Invest* 43, 1083-9.
- (31) Basaria, S., Wahlstrom, J. T., and Dobs, A. S. (2001) Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5108-17.
- (32) Rote Liste<sup>®</sup> (2006), Rote Liste<sup>®</sup> Service GmbH, Frankfurt/Main.
- (33) Chen, J., Kim, J., and Dalton, J. T. (2005) Discovery and therapeutic promise of selective androgen receptor modulators. *Mol Interv* 5, 173-88.
- (34) Negro-Vilar, A. (1999) Selective androgen receptor modulators (SARMs): a novel approach to androgen therapy for the new millennium. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3459-62.
- (35) Birch, J. (1950) Hydroaromatic Steroid Hormones. I. 10-Nortestosterone. *J Chem Soc* 367-8.
- (36) Sundaram, K., Kumar, N., Monder, C., and Bardin, C. W. (1995) Different patterns of metabolism determine the relative anabolic activity of 19-norandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 253-7.
- (37) Engel, L. L., Alexander, J., and Wheeler, M. (1958) Urinary metabolites of administered 19-nortestosterone. *J Biol Chem* 231, 159-64.
- (38) Le Bizec, B., Bryand, F., Gaudin, I., Monteau, F., Poulain, F., and Andre, F. (2002) Endogenous nandrolone metabolites in human urine: preliminary results to discriminate between endogenous and exogenous origin. *Steroids* 67, 105-10.
- (39) Kuuranne, T., Kurkela, M., Thevis, M., Schanzer, W., Finel, M., and Kostianen, R. (2003) Glucuronidation of anabolic androgenic steroids by recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* 31, 1117-24.
- (40) Organon (2001) *Fachinformationen zu Deca-Durabolin<sup>®</sup>* Bundesverband der pharmazeutischen industrie e. V., Aulendorf, Deutschland.

- 
- (41) Schroeder, E. T., Terk, M., and Sattler, F. R. (2003) Androgen therapy improves muscle mass and strength but not muscle quality: results from two studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E16-24.
- (42) Storer, T. W., Woodhouse, L. J., Sattler, F., Singh, A. B., Schroeder, E. T., Beck, K., Padero, M., Mac, P., Yarasheski, K. E., Geurts, P., Willemsen, A., Harms, M. K., and Bhasin, S. (2005) A randomized, placebo-controlled trial of nandrolone decanoate in human immunodeficiency virus-infected men with mild to moderate weight loss with recombinant human growth hormone as active reference treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 4474-82.
- (43) Johansen, K. L., Mulligan, K., and Schambelan, M. (1999) Anabolic effects of nandrolone decanoate in patients receiving dialysis: a randomized controlled trial. *JAMA* 281, 1275-81.
- (44) Navarro, J. F. (2003) In the erythropoietin era, can we forget alternative or adjunctive therapies for renal anaemia management? The androgen example. *Nephrol Dial Transplant* 18, 2222-6.
- (45) Creutzberg, E. C., Wouters, E. F., Mostert, R., Pluymers, R. J., and Schols, A. M. (2003) A role for anabolic steroids in the rehabilitation of patients with COPD? A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Chest* 124, 1733-42.
- (46) Behre, H. M., Kliesch, S., Lemcke, B., von Eckardstein, S., and Nieschlag, E. (2001) Suppression of spermatogenesis to azoospermia by combined administration of GnRH antagonist and 19-nortestosterone cannot be maintained by this non-aromatizable androgen alone. *Hum Reprod* 16, 2570-7.
- (47) Knuth, U. A., Behre, H., Belkien, L., Bents, H., and Nieschlag, E. (1985) Clinical trial of 19-nortestosterone-hexoxyphenylpropionate (Anadur) for male fertility regulation. *Fertil Steril* 44, 814-21.
- (48) Bicikova, M., Hampl, R., and Starka, L. (1977) Binding of synthetic anabolic steroids to testosterone-estradiol binding globulin and to rat prostate cytosol. *Endocrinol Exp* 11, 85-90.
- (49) Saartok, T., Dahlberg, E., and Gustafsson, J. A. (1984) Relative binding affinity of anabolic-androgenic steroids: comparison of the binding to the androgen receptors in skeletal muscle and in prostate, as well as to sex hormone-binding globulin. *Endocrinology* 114, 2100-6.
- (50) Wijnand, H. P., Bosch, A. M., and Donker, C. W. (1985) Pharmacokinetic parameters of nandrolone (19-nortestosterone) after intramuscular administration of nandrolone decanoate (Deca-Durabolin) to healthy volunteers. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 271, 19-30.

- 
- (51) Bagchus, W. M., Smeets, J. M., Verheul, H. A., De Jager-Van Der Veen, S. M., Port, A., and Geurts, T. B. (2005) Pharmacokinetic evaluation of three different intramuscular doses of nandrolone decanoate: analysis of serum and urine samples in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2624-30.
- (52) Belkien, L., Schurmeyer, T., Hano, R., Gunnarsson, P. O., and Nieschlag, E. (1985) Pharmacokinetics of 19-nortestosterone esters in normal men. *J Steroid Biochem* 22, 623-9.
- (53) Minto, C. F., Howe, C., Wishart, S., Conway, A. J., and Handelsman, D. J. (1997) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nandrolone esters in oil vehicle: effects of ester, injection site and injection volume. *J Pharmacol Exp Ther* 281, 93-102.
- (54) Yesalis, C. E., and Bahrke, M. S. (1995) Anabolic-androgenic steroids. Current issues. *Sports Med* 19, 326-40.
- (55) World Anti-Doping Agency (WADA). (2006) Dopingliste, [http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2006\\_LIST.pdf](http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2006_LIST.pdf),
- (56) Kicman, A. T., and Gower, D. B. (2003) Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. *Ann Clin Biochem* 40, 321-56.
- (57) Saugy, M., Cardis, C., Robinson, N., and Schweizer, C. (2000) Test methods: anabolics. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14, 111-33.
- (58) Schaenzer, W., and Donike, M. (1993) Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. *Anal. Chim. Acta* 275, 23-48.
- (59) World Anti-Doping Agency (WADA). (2004) Adverse Analytical Findings Report by Accredited Laboratories, [http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/LABSTATS\\_2004.pdf](http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/LABSTATS_2004.pdf), 14.06.2006
- (60) Van Eenoo, P., Delbeke, F. T., de Jong, F. H., and De Backer, P. (2001) Endogenous origin of norandrosterone in female urine: indirect evidence for the production of 19-norsteroids as by-products in the conversion from androgen to estrogen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78, 351-7.
- (61) World Anti-Doping Agency (WADA). (2004) WADA Technical Document – TD2004NA, [http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/nandrolone\\_aug\\_04.pdf](http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/nandrolone_aug_04.pdf),
- (62) Grosse, J., Anielski, P., Hemmersbach, P., Lund, H., Mueller, R. K., Rautenberg, C., and Thieme, D. (2005) Formation of 19-norsteroids by in situ demethylation of endogenous steroids in stored urine samples. *Steroids* 70, 499-506.
- (63) Colker, C. M., Antonio, J., and Kalman, D. (2001) The metabolism of orally ingested 19-nor-4-androstene-3,17-dione and 19-nor-4-androstene-3,17-diol in healthy, resistance-trained men. *J Strength Cond Res* 15, 144-7.

- 
- (64) Tseng, Y. L., Kuo, F. H., and Sun, K. H. (2005) Quantification and profiling of 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone in human urine after consumption of a nutritional supplement and norsteroids. *J Anal Toxicol* 29, 124-34.
- (65) Catlin D. H., Leder B. Z., Ahrens, B., Starcevic, B., Hatton, C. K., Green, G. A., and Finkelstein, J. S. (2000) Trace contamination of over-the-counter androstenedione and positive urine test results for a nandrolone metabolite. *Jama* 284, 2618-21.
- (66) Geyer, H., Parr, M. K., Mareck, U., Reinhart, U., Schrader, Y., and Schänzer, W. (2004) Analysis of non-hormonal nutritional supplements for anabolic-androgenic steroids - results of an international study. *Int J Sports Med* 25, 124-9.
- (67) DSHEA. (1994) Dietary Supplement Health and Education Act of 1994, <http://www.fda.gov/opacom/laws/dshea.html>, 1994
- (68) Anabolic Steroid Control Act of 2004. (2004), Pub. L. No. 108-358.
- (69) Brown, G. A., Vukovich, M. D., Martini, E. R., Kohut, M. L., Franke, W. D., Jackson, D. A., and King, D. S. (2000) Endocrine responses to chronic androstenedione intake in 30- to 56-year-old men. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4074-80.
- (70) Leder, B. Z., Longcope, C., Catlin, D. H., Ahrens, B., Schoenfeld, D. A., and Finkelstein, J. S. (2000) Oral androstenedione administration and serum testosterone concentrations in young men. *Jama* 283, 779-82.
- (71) Rasmussen, B. B., Volpi, E., Gore, D. C., and Wolfe, R. R. (2000) Androstenedione does not stimulate muscle protein anabolism in young healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 55-9.
- (72) Ziegenfuss, T. N., Berardi, J. M., and Lowery, L. M. (2002) Effects of prohormone supplementation in humans: a review. *Can J Appl Physiol* 27, 628-46.
- (73) Ballantyne, C. S., Phillips, S. M., MacDonald, J. R., Tarnopolsky, M. A., and MacDougall, J. D. (2000) The acute effects of androstenedione supplementation in healthy young males. *Can J Appl Physiol* 25, 68-78.
- (74) Broeder, C. E., Quindry, J., Brittingham, K., Panton, L., Thomson, J., Appakondur, S., Breuel, K., Byrd, R., Douglas, J., Earnest, C., Mitchell, C., Olson, M., Roy, T., and Yarlagaadda, C. (2000) The Andro Project: physiological and hormonal influences of androstenedione supplementation in men 35 to 65 years old participating in a high-intensity resistance training program. *Arch Intern Med* 160, 3093-104.
- (75) Brown, G. A., Vukovich, M. D., Reifenrath, T. A., Uhl, N. L., Parsons, K. A., Sharp, R. L., and King, D. S. (2000) Effects of anabolic precursors on serum testosterone concentrations and adaptations to resistance training in young men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 10, 340-59.

- 
- (76) King, D. S., Sharp, R. L., Vukovich, M. D., Brown, G. A., Reifenrath, T. A., Uhl, N. L., and Parsons, K. A. (1999) Effect of oral androstenedione on serum testosterone and adaptations to resistance training in young men: a randomized controlled trial. *JAMA* 281, 2020-8.
- (77) Bassindale, T., Cowan, D. A., Dale, S., Hutt, A. J., Leeds, A. R., Wheeler, M. J., and Kicman, A. T. (2004) Effects of oral administration of androstenedione on plasma androgens in young women using hormonal contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 6030-8.
- (78) Brown, G. A., Dewey, J. C., Brunkhorst, J. A., Vukovich, M. D., and King, D. S. (2004) Changes in serum testosterone and estradiol concentrations following acute androstenedione ingestion in young women. *Horm Metab Res* 36, 62-6.
- (79) Van Gammeren, D., Falk, D., and Antonio, J. (2001) The effects of supplementation with 19-nor-4-androstene-3,17-dione and 19-nor-4-androstene-3,17-diol on body composition and athletic performance in previously weight-trained male athletes. *Eur J Appl Physiol* 84, 426-31.
- (80) Van Gammeren, D., Falk, D., and Antonio, J. (2002) Effects of norandrostenedione and norandrostenediol in resistance-trained men. *Nutrition* 18, 734-7.
- (81) De Cock, K. J., Delbeke, F. T., Van Eenoo, P., Desmet, N., Roels, K., and De Backer, P. (2001) Detection and determination of anabolic steroids in nutritional supplements. *J Pharm Biomed Anal* 25, 843-52.
- (82) Geyer H, Mareck-Engelke U, Reinhard U, Thevis M, and Schänzer, W. (2000) Positive Dopingfälle mit Norandrosteron durch verunreinigte Nahrungsergänzungsmittel. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 51, 378-382.
- (83) Pitha, J., Harman, S. M., and Michel, M. E. (1986) Hydrophilic cyclodextrin derivatives enable effective oral administration of steroidal hormones. *J Pharm Sci* 75, 165-7.
- (84) Brown, G. A., Martini, E. R., Roberts, B. S., Vukovich, M. D., and King, D. S. (2002) Acute hormonal response to sublingual androstenediol intake in young men. *J Appl Physiol* 92, 142-6.
- (85) Pitha, J., Anaissie, E. J., and Uekama, K. (1987) gamma-Cyclodextrin:testosterone complex suitable for sublingual administration. *J Pharm Sci* 76, 788-90.
- (86) Schänzer, W., and Donike, M. (1995) in *Proceedings of the 12th Cologne Workshop on Dope Analysis* (Donike, M., Geyer, H., Gotzmann, A., and Mareck-Engelke, U., Eds.) pp 93-112, Sport & Buch Strauss, Edition Sport, Cologne.
- (87) Schänzer, W., and Donike, M. (1993) Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. *Analytica Chimica Acta* 275, 23-48.

- 
- (88) FDA guidance paper. (2001) Food and Drug Administration: Guidance for industry– Bioanalytical Method Validation, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>,
- (89) Bland, J. M., and Altman, D. G. (1995) Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 310, 170.
- (90) R Development Core Team. (2004) R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>
- (91) Thevis, M., and Schänzer, W. (2005) Mass Spectrometry in Doping Control Analysis. *Current Organic Chemistry* 9, 825-848.
- (92) Mesomorphosis.com. (2001) Internetforum, <http://www.mesomorphosis.com/exclusive/arnold/vol02/990809.htm>, 12.07.2001