

Endogene steroïden: een aparte tak van sport bij dopinganalyse

D.H. van de KERKHOF

Het gebruik van endogene steroïden als dopingmiddel in de sport maakt nog steeds een snelle ontwikkeling door. In de jaren '80 van de vorige eeuw werd veelvuldig testosteron gebruikt. Tegenwoordig worden testosteronprecursors als dehydro-epiandrosteron en androst-4- α -3,17-dion en diverse 19-norsteroïden aangetroffen. Analooq aan deze ontwikkeling zijn de methodieken om endogene steroïden aan te tonen in urine sterk veranderd. Testosteron werd in de beginjaren met name gedetecteerd met behulp van de testosteron/epitestosteron(T/E)-ratio, terwijl tegenwoordig tevens gecompliceerdere technieken als isotoopratiomassaspectrometrie worden toegepast. Dit artikel beschrijft zowel de ontwikkeling van het gebruik van endogene steroïden in de sport, als de daaropvolgende ontwikkeling van de analytische methodieken.

Trefwoorden: dopinganalyse; endogene steroïden; T/E-ratio; supplementen; isotoopratio-massaspectrometrie

Geschiedenis van steroïden in de sport

In de twintigste eeuw heeft de sport een belangrijke ontwikkeling doorgemaakt. De maatschappelijke rol van de topsport is groter geworden, mede gestimuleerd door sterk gegroeide financiële belangen. Het toenemende belang van topsport is een stimulerende factor geweest voor gebruik van prestatieverhogende middelen. Tijdens de vorige eeuw werden voornamelijk alkaloïden, amfetaminen, steroïden en peptidehormonen gebruikt, terwijl tegenwoordig ook de ontwikkeling van 'genetische doping' met argwaan wordt gevolgd.

Testosteron werd voor het eerst geïsoleerd uit testikels van stieren in 1927 (1). De eerste gepubliceerde synthese uit cholesterol stamt uit 1935. De eerste geruchten van het gebruik van testosteron in de sport kwamen naar voren in 1952, toen tijdens de Olympische Spelen in Helsinki atleten uit de Sovjet Unie opvallend goed presteerden bij gewichtheffen. In 1958 werd vervolgens het eerste synthetische anabole steroïd Dianabol (methandrostenalon) gesynthetiseerd, dat de anabole effecten van testosteron kon bewerkstelligen zonder de ongewenste androgene effecten

(hirsutisme, stemverlaging etc). Methandrostenalon en veel opvolgers hiervan, zijn 17 β -methylderivaten van androgenen waarbij de klaring door de lever lager is. Daardoor zijn deze steroïden geschikt voor orale inname.

In de jaren '60 vonden een aantal fatale dopingincidenten plaats met amfetaminen en heroïne (1). Dit stimuleerde het Internationaal Olympisch Comité (IOC) om de Medische Commissie op te richten en een beperkte lijst van verboden middelen op te stellen. Deze lijst is in de loop der tijd sterk gegroeid. Dopinganalyse van anabole steroïden werd echter pas effectief toen gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS) beschikbaar kwam. De eerste controles bij officiële wedstrijden werden uitgevoerd in 1974 bij de Commonwealth Games.

De Olympische Spelen van Moskou in 1980 worden gezien als het moment waar voor het eerst steroïden van lichaamseigen oorsprong op grote schaal werden gebruikt. Hierbij werd waarschijnlijk een reeks van intramusculair toe te dienen esters toegepast, zoals bijvoorbeeld testosterondecanoaat. Inmiddels konden steroïden van exogene herkomst relatief gemakkelijk worden aangetoond door de introductie van GC-MS. Donike et al (2) introduceerden een ratio van de testosteron- en epitestosteronconcentratie (T/E-ratio) om testosterongebruik aan te tonen. Testosteron werd toegevoegd aan de IOC-lijst van dopinggeduide middelen in 1982, nadat uit een heranalyse van alle monsters van de Olympische Spelen van 1980 bleek dat 20% van alle mannelijke en vrouwelijke atleten een T/E-ratio hadden boven de toenmalige acceptatiegrens van 6.

De jaren '90 werden gekenmerkt door de introductie van diverse andere steroïden van endogene oorsprong, zoals dehydro-epiandrosteron (DHEA) en androst-4- α -3,17-dion. Omdat deze steroïden zelf geen anabole of androgene werking hebben, hebben ze de status van een voedingssupplement en mogen ze vrij verkocht worden. Na orale toediening worden deze steroïden echter in beperkte mate door de lever omgezet in testosteron. Tevens kwamen in vergelijkbare supplementen 19-norsteroïden op de markt die metabole precursors zijn van 19-nortestosteron (nandrolon). Gedurende de laatste jaren zijn diverse steroïden aangetroffen in urine van atleten als toevalsbevinding. Een bekend geworden voorbeeld is tetrahydrogestrinon (THG). Deze steroïden zijn waarschijnlijk specifiek geproduceerd voor ergoegen gebruik in de sport. Vandaar dat men vaak de kreet 'designer steroid' gebruikt, analoog aan de bekende 'designer drugs'.

Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven

Correspondentie: dr. D.H. van de Kerkhof, Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Postbus 1350, 5602 ZA Eindhoven
E-mail: daan.vd.kerkhof@catharina-ziekenhuis.nl

Testosteron, epitestosteron en de T/E-ratio

Het kwantificeren van testosteron in urine is ongeschikt voor het aantonen van testosterontoediening door de hoge intra- en interindividuele variabiliteit van de excretie. Donike (2) toonde aan dat de T/E-ratio een marker is met een veel hogere sensitiviteit. Epitestosteron (E) is een epimeer van testosteron waarvan de afkomst nog steeds niet volledig is opgehelderd. Epitestosteron vertoont hetzelfde excretiepatroon als testosteron, maar de twee zijn wel metafool onafhankelijk van elkaar (figuur 1).

Uit de eerste populatiestudie uitgevoerd door Donike et al. (3, 4) op Kaukasiërs bleek een gemiddelde T/E-ratio van 1-2 voor zowel mannen als vrouwen. Op basis van het 95%-betrouwbaarheidsinterval is door het IOC in 1982 een T/E-ratio van 6 aanvaard als afkapgrens voor het aantonen van testosteronmisbruik. Men heeft echter het gebruik van deze grenswaarde moeten nuanceren omdat er diverse gevallen naar voren kwamen waarbij een natuurlijke T/E-ratio groter dan 6 aangetoond werd, meestal door een idiopathisch verlaagde epitestosteronexcretie (5, 6).

Deze nuancering bestond uit het vaststellen van het individuele referentie-interval in een follow-up-onderzoek nadat bij een atleet een $T/E > 6$ vastgesteld was (7). Dit follow-up-onderzoek kon bestaan uit een longitudinaal onderzoek van de T/E-ratio door middel van analysehistorie en onaangekondigde dopingcontroles gedurende een aantal maanden (8). Testosterongebruik werd als bevestigd beschouwd indien een verdachte hoge waarde voor de T/E-ratio hoger was

dan de bovengrens van het individuele referentie-interval (gemiddelde + 3 x standaarddeviatie, bepaald uit minimaal 3 bepalingen). De intra-individuele variatie van de T/E-ratio is meestal kleiner dan 30%. Bij vrouwen, waarbij de excretie van androgenen lager is, kan deze variatie oplopen tot 60% (8, 9).

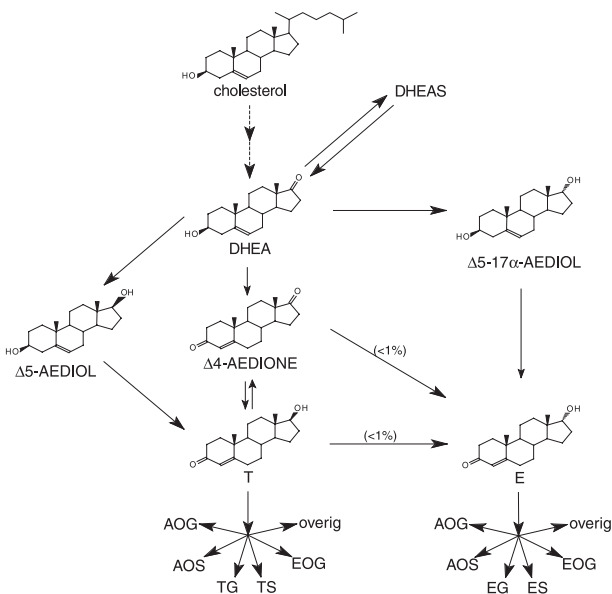
Tevens heeft men in het verleden endocrinologisch onderzoek in de vorm van de ketoconazoltest gebruikt bij mannelijke atleten, als middel om een verdachte T/E-ratio te bevestigen (10). Hierbij werd onder gecontroleerde omstandigheden een orale dosis ketoconazol toegediend. Dit antimycoticum heeft als neveneffect dat het de testiculaire steroïdsynthese tijdelijk remt door inhibitie van 17,20-lyase. Indien een hoge T/E-ratio een natuurlijke oorsprong heeft, zal de excretie van zowel testosteron als epitestosteron dalen. In geval van een verhoogde T/E door testosterontoediening, zal enkel de epitestosteronexcretie significant dalen en een stijging van de T/E-ratio veroorzaken. Mede gezien enige hepatotoxiciteit is het verwonderlijk dat deze methode acceptabel bevonden werd. Het toedienen van een medicament om een ander aan te tonen behoort zeker niet tot de meest stijlvolle methoden die in het verleden werden toegepast.

Bepaling van de T/E-ratio

Voor het bepalen van de T/E-ratio geldt nog steeds een redelijk gestandaardiseerde procedure (11). Hierbij worden steroïden op een specifieke wijze geïsoleerd uit de urinematrix door middel van vastefase-extractie (SPE). Omdat testosteron en epitestosteron voornamelijk als een glucuronideconjugaat worden uitgescheiden, wordt een enzymatische deconjugatie toegepast met β -glucuronidase. Na verwijdering van de gehydrolyseerde steroïden uit de enzymmatrix met vloeistof-vloeistofextractie, worden testosteron en epitestosteron gederivatisiseerd voor GC-MS-analyse. Hierbij worden chromatografische karakteristieken sterk verbeterd en wordt de fragmentatie beperkt tot een beperkt aantal specifieke fragmenten bij elektron-impactionisatie.

Bij dopingcontrole wordt van iedere geteste atleet een niet-geklokt urinemonster verzameld dat wordt verdeeld in twee porties. Beide porties worden verzegeld en verstuurd naar het laboratorium dat de analyse gaat uitvoeren. Een van de porties (B-monster) wordt met verzegeling opgeslagen in een afgesloten vriezer voor het geval er een contra-expertise nodig is. De andere portie (A-monster) wordt geanalyseerd. Doorgaans wordt eerst een screening uitgevoerd, waarbij met een hoge sensitiviteit een breed pakket dopinggeduide stoffen bepaald wordt. In het geval van de T/E-ratio vindt een screening meestal plaats door het monitoren van één ion met een geselecteerde m/z -waarde. Omdat de fragmentatie van testosteron en epitestosteron sterk analoog verloopt, wordt de oppervlakteverhouding van de twee steroïden in het chromatogram gemeten als maat voor de concentratieratio. Naast de T/E-ratio wordt de concentratie van beide geschat op basis van een standaard.

Indien een urinemonster verdacht uit de screening komt, wordt er een bevestigend onderzoek, met een

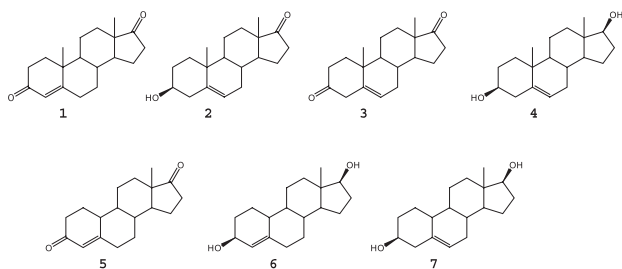


Figuur 1. Productie en metabolisme van testosteron (T) en epitestosteron (E). Cholesterol is de primaire precursor van alle steroïdhormonen. Relevante precursors van T en E zijn dehydro-epiandrosteron (DHEA), dehydro-epiandrosteronsulfaat (DHEAS), androst-4-ene-3,17-dion (Δ4-AEDIONE), androst-5-ene-3β,17α-diol (Δ5-17α-AEDIOL) en androst-5-ene-3β,17β-diol (Δ5-AEDIOL). Metabolieten van T en E zijn androsteronglucuronide (AOG), androsteronsulfaat (AOS), testosteronglucuronide (TG), testosteronsulfaat (TS), epitestosteronglucuronide (EG), epitestosteronsulfaat (ES) en etiocholanoloneglucuronide (EOG). Conversie van Δ4-AEDIONE of T naar E is minder dan 1% vergeleken met de alternatieve routes.

hogere specificiteit, uitgevoerd op hetzelfde A-monster. In het geval van testosteron wordt de T/E-ratio bevestigd door een volledige kwantificering van testosteron en epitestosteron met behulp van een kalibratielijns met gedeutereerd testosteron en epitestosteron als interne standaard en gecontroleerd door kwaliteitscontrolemonsters. Voor het beoordelen van de individuele concentraties wordt een correctie uitgevoerd naar een specifieke dichtheid van 1,020 zoals bepaald met een refractometer.

Omdat een urinemonster niet onder steriele condities afgenomen wordt, is er een risico op microbiële contaminatie van het monster. Deze is afhankelijk van de opslagtemperatuur en de tijdsduur tussen het verzamelen van het urinemonster en de analyse. Bij een dergelijke proliferatie van bacteriën in de urine zullen steroïden in eerste instantie gedeconjugueerd worden. Hierdoor neemt de concentratie gedeconjugueerde steroïden toe en glucuroniden en sulfaten af (12). In tweede instantie zullen de steroïden zelf omgezet worden door oxido-reductieve reacties. De World Anti-Doping Agency (WADA), waarin het IOC participeert, heeft vastgesteld dat de concentratie gedeconjugueerd T en/of E niet hoger dan 5% mag zijn dan de glucuronidefractie (13). Dit kan getest worden door het uitvoeren van een vloeistof-vloeistofextractie vóór de enzymatische deconjugatie, en het vergelijken van de concentraties in de twee fracties. Tevens worden 5 α - en 5 β -androst-3,17-dion bepaald als parameters van 'ex vivo'-steroïdafbraak (14, 15).

De laatste jaren zijn er verschillende procedurele varianten op de standaard-T/E-ratio bestudeerd. Deze zijn met name gericht op het vermijden van de hydrolyse- en/of derivatiseringsstappen, omdat deze tijds- en arbeidsintensief zijn en tot artefactvorming kunnen leiden. Met name heeft de bepaling met LC-MS/MS een hoge potentie, omdat hierbij steroïden rechtstreeks gemeten kunnen worden, zonder hydrolyse of derivatisering (16). Met chemische ionisatie onder atmosferische druk worden de te meten steroïden geprotoneerd. Via twee in serie geschakelde massaspectrometers kan door middel van een specifiek fragment het betreffende steroïd worden gekwantificeerd. Echter, momenteel wordt GC-MS nog steeds als standaard routinetechniek gebruikt vanwege de lagere detectiegrenzen voor steroïden.



Figuur 2. Steroïden aangetroffen in supplementen. 'Androgene' steroïden: androst-4-ene-3,17-dion (1), DHEA (2), androst-5-ene-3,17-dion (3) en androst-4-ene-3 β ,17 β -diol (4). 19-Norsteroiden: 19-norandrost-4-ene-3,17-dion (5), 19-norandrost-4-ene-3 β ,17 β -diol (6) en 19-norandrost-5-ene-3 β ,17 β -diol (7).

Isotoopratio-massaspectrometrie

Gedurende de geschiedenis van dopinganalyse is de T/E-ratio de meest bediscussieerde parameter geweest (12). Tegenstanders claimen een hoog risico op fout-positieve en fout-negatieve resultaten. Deze discussie speelt tegenwoordig wat minder na de introductie van GC gekoppeld aan combustion-isotoopratio-massaspectrometrie (GC-C-IRMS) voor de Olympische Winterspelen van 1998 in Nagano, Japan. Deze techniek geldt tegenwoordig als de gouden standaard voor het aantonen van steroïden van lichaamseigen oorsprong (17-23).

Bij GC-C-IRMS worden na de GC-scheiding de componenten verbrand in een oven. Het verbrandingsproduct CO₂ wordt bepaald in de gekoppelde massaspectrometer. Deze meet de verhouding van ¹³CO₂/¹²CO₂ (uitgedrukt in ‰). Doordat synthetische steroïden afgeleid zijn van sojaproducten en endogene steroïden van cholesterol uit de voeding, worden verschillende waarden voor hun ¹³CO₂/¹²CO₂-ratio gemeten. Met GC-C-IRMS is men in staat om, afhankelijk van het endogene steroïd dat men verdenkt toegediend te zijn, te bepalen: T, E, androsteron, etiocholanolon, androstaandiolepimeren, DHEA en 19-norandrost-3,17-dion (24-26). Een monster is positief indien de ¹³CO₂/¹²CO₂ van een steroïd meer dan een bepaald aantal ‰-eenheden afwijkt van de ¹³CO₂/¹²CO₂ van een endogeen referentiesteroïd zoals bijvoorbeeld pregnandiol.

Momenteel wordt door de WADA geadviseerd dat dopinglaboratoria een urinemonster nader onderzoeken met GC-C-IRMS indien (13):

- T/E-ratio is ≥ 4
- De concentratie van testosteron of epitestosteron ≥ 200 mg/ml
- De concentraties van androsteron en etiocholanolon (allebei metaboliëten van testosteron en epitestosteron) zijn ≥ 10 μ g/ml
- De concentratie van dehydro-epiandrosteron (DHEA; metabole precursor van testosteron) is ≥ 100 ng/ml.

Indien GC-C-IRMS een verhoogde T/E-ratio niet kan bevestigen, zal men zich beroepen op longitudinale studies zoals hierboven beschreven.

'Androgene' steroïden in supplementen

Gedurende de tweede helft van de jaren '90 kwamen steroïden-bevattende supplementen op de markt. De belangrijkste steroïden hierin waren DHEA, androst-4-ene-3,17-dion, androst-5-ene-3,17-dion en androst-4-ene-3 β ,17 β -diol (figuur 2). Het kenmerk van deze steroïden is dat ze metabole precursors van testosteron zijn, terwijl ze zelf een verwaarloosbare anabole of androgene werking hebben. Deze steroïden worden daarom vaak ook wel prohormonen genoemd. Na inname via capsule of tablet worden deze steroïden via het 'first-pass effect' grotendeels tot inerte metaboliëten afgebroken als androsteron en etiocholanolon (figuur 1) (27-30). Slechts een kleine fractie wordt omgezet naar testosteron (31, 32). Populariteit van deze producten was met name te danken aan de gemakkelijke verkrijgbaarheid door de verkoop via internet. De prestatiebevorderende werking van deze middelen is echter nooit wetenschappelijk aangetoond.

19-norsteroiden in supplementen

Gelijktijdig met de bovengenoemde prohormonen vond de opkomst van 19-norsteroiden in de sport plaats. Via vergelijkbare supplementproducten kwamen steroïden beschikbaar als 19-norandrost-4- α -3,17-dion, 19-norandrost-4- α -3 β ,17 β -diol en 19-norandrost-5- α -3 β ,17 β -diol (figuur 2). Deze steroïden hebben geen eenduidige endogene oorsprong zoals bovengenoemde prohormonen en er is geen anabole werking van deze stoffen bekend. Echter, een kleine fractie wordt gemetaboliseerd naar 19-nortestosteron (tevens bekend als het anabole steroïd nandrolon). Kwantitatief zijn de metabolieten 19-norandrosteron, 19-noretiocholanolon het meest relevant (33, 34). Deze steroïden werden al van oudsher gebruikt als screeningsparameters voor nandrolongebruik.

Men heeft gezocht naar een verklaring voor het hoge aantal positieven voor 'nandrolon' sinds deze categorie van supplementen op internet beschikbaar kwamen. Men kwam tot een aantal opvallende bevindingen.

Het bleek dat frequent kleine hoeveelheden norsteroiden aangetoond konden worden in supplementen waar geen dopinggeduide stoffen in verwacht zouden worden (35-39). Deze norsteroiden konden na toediening aangetoond worden in urine als sporen norandrosteron en noretiocholanolon. Dit probleem was te wijten aan het slordige productieproces van deze supplementen, waarbij meerdere supplementen bereid werden met dezelfde apparatuur met een onvoldoende tussentijdse reiniging om de zuiverheid van de volgende batch te kunnen garanderen.

Tegenwoordig is het concept dat 19-norsteroiden als endogene steroïd in lage concentraties in urine aangetroffen kunnen worden algemeen geaccepteerd (40). Norandrosteron wordt in lage concentraties uitgescheiden via de urine van zowel vrouwen als mannen. De concentratie bij mannen is lager dan 0,1 ng/ml en bij vrouwen lager dan 1 ng/ml (41-43). De concentratie bij vrouwen is maximaal na de ovulatie en de excretie correleert met die van oestrogenen. Tevens kan 19-norandrosteron aangetroffen worden tijdens de zwangerschap en als metaboliet van norethisteron (44-46).

De gecompliceerde achtergrond van 19-norandrosteron blijkt duidelijk uit het feit dat dit metaboliet tevens is waargenomen na het eten van vlees van niet-gecastrateerde varkens (47). Het voorkomen van dergelijke gevallen in de praktijk zal beperkt zijn, omdat dit vlees niet bekend staat als smakelijk.

Hiermee was de onduidelijkheid compleet bij het aantreffen van lage concentraties norandrosteron en noretiocholanolon in urine. Als reactie hierop heeft de WADA een grenswaarde ingesteld voor 19-norandrosteron van 2 ng/ml voor zowel vrouwen als mannen. De gevonden concentratie in een urinemonster wordt daarbij gecorrigeerd op basis van specifieke dichtheid. Bij een verdacht monster moet het laboratorium aantonen dat de betreffende atleet niet zwanger is ($hCG < 5$ IU/l) en dat het steroïd niet afkomstig kan zijn van norethisteron door analyseren van tetrahydronorethisteron.

Recentelijk heeft men kunnen aantonen dat 19-norandrosteron tevens 'ex vivo' gevormd kan worden als artefact van androsteron (48, 49). Men ondervond dat

dit artefact met name terug te vinden was in urinemonsters met hoge soortelijke massa en hoge concentratie endogene steroïden en waarbij de transporttijd naar het laboratorium langer dan 2 dagen was. De conclusie was gebaseerd op een simulatie-experiment, waarbij gedeuteerd androsteron werd ge'spiked' aan urine die niet bacterieel gecontamineerd was en vervolgens langdurig werd opgeslagen bij kamertemperatuur. De concentratie van 19-norandrosteron bleef echter lager dan 1 ng/ml en de omzetting was gedeeltelijk te inhiberen door het toevoegen van EDTA of natriumazide. Het is onduidelijk in hoeverre de 'ex vivo'-vorming van 19-norandrosteron daadwerkelijk een significante rol kan spelen bij dopinganalyse. Het illustreert echter hoe gecompliceerd de bron van 19-norsteroiden in urine is.

Conclusie

Door de jaren heen hebben zowel de dopinggeduide middelen als de technieken om deze aan te tonen een snelle ontwikkeling doorgemaakt. De hoge frequentie waarbij 19-norsteroiden aangetroffen worden in urine van atleten illustreert dat endogene steroïden nog steeds een belangrijke rol spelen bij dopinganalyse. De detectie van endogene stoffen als aparte tak van sport, zal daarom in de toekomst een zeer belangrijke rol blijven spelen.

Literatuur

1. Todd T. Anabolic steroids: The gremlins of sport. *J. Sports History* 1987; 14: 87-107.
2. Donike M, Barwald K-R, Klostermann K, Schanzer W, Zimmermann J. Nachweis von exogenem testosteron in sport: Leistung und gesundheit. In: Heck H, Hollmann W, Liesen H, Rost R (eds). *Deutscher Arzte Verlag Köln*, 1983; 293.
3. Donike M, Rauth S, Mareck-Engelke U, Geyer H, Nitschke R. Evaluation of longitudinal studies, the determination of subject based reference ranges of the T/E ratio. In: Donike M, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U, Rauth S (eds). *Proceedings of the 11th Cologne Workshop on doping analysis. Sport und Buch Strauß, Köln*, 1994; 33.
4. Donike M. Steroid profile in Cologne. In: Donike M, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U, Rauth S (eds). *Proceedings of the 10th Cologne Workshop on dope analysis. Sport und Buch Strauß, Köln*, 1993; 47.
5. Garle M, Ocka R, Palonek E, Bjorkhem I. Increased urinary testosterone/epitesterone ratios found in Swedish athletes in connection with a national control program. *J Chromatogr B* 1996; 687: 55-59.
6. Raynaud E, Audran M, Brun JF, Fedou C, Chanal JL, Orsetti A. False-positive cases in detection of testosterone doping. *Lancet (Letter)* 1992; 340: 1468-1469.
7. Geyer H, Mareck-Engelke U, Schanzer W, Donike M. The Cologne protocol to follow up high testosterone/epitesterone ratios. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds). *Recent advances in doping analysis (4)*. Sport und Buch Strauß, Köln, 1997; 139.
8. Donike M, Mareck-Engelke U, Rauth S. Statistical evaluation of longitudinal studies, part 2: The usefulness of subject based reference values. In: *Proceedings of the 12th Cologne workshop on dope analysis, Köln*, 1995; 157.
9. Geyer H, Schanzer W, Mareck-Engelke U, Donike M. Factors influencing the steroid profile. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds). *Recent advances in doping analysis (3)*. Sport und Buch Strauß, Köln, 1996; 95.

10. Kicman AT, Oftebro H, Walker C, Norman N, Cowan DA. Potential use of ketoconazole in a dynamic endocrine test to differentiate between biological outliers and testosterone use by athletes. *Clin Chem* 1993; 39: 1798-1803.
11. Steroid profiling in doping analysis [Proefschrift]. D.H. van de Kerkhof, Universiteit Utrecht, 2001.
12. Kerkhof DH van de, Boer D de, Thijssen JHH, Maes RAA. Steroid profiling in doping analysis. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 102-115.
13. WADA Technical Document TD2004EAAS, version 1.0. Reporting and evaluation guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids. WADA Laboratory Committee; Augustus 2004.
14. Ayotte C, Charlebois A, Lapointe S, Barriault D, Sylvestre M. Validity of urine samples: Microbial degradation. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds). Recent advances in doping analysis. Sport und Buch Strauß, Köln, 1997; 127-137.
15. Hemmersbach P, Birkeland KI, Norli JR, Ringertz SH. Urine storage conditions and steroid profile analysis. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds). Recent advances in doping analysis (4). Sport und Buch Strauß, Köln, 1997; 99.
16. Kuuranne T, Kotiaho T, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, Leinonen A, Westwood S, Kostianen R. Feasibility of a liquid-phase microextraction sample clean-up and liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for selected anabolic steroid glucuronides in biological samples. *J. Mass Spectrom* 2003; 38: 16-26.
17. Aguilera R, Becchi M, Casabianca H, Hatton CK, Catlin DH, Starcevic B. Improved method of detection of testosterone abuse by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids. *J. Mass Spectrom* 1996; 31: 169-176.
18. Aguilera R, Catlin DH, Becchi M, Phillips A, Wang C, Swerdloff RS, Pope HG, Hatton CK. Screening for exogenous testosterone by isotope ratio mass spectrometric analysis of one pregnanediol and two androstanediols. *J Chromatogr B* 1999; 727: 95-105.
19. Aguilera R, Chapman TE, Catlin DH. A rapid screening assay for measuring urinary androsterone and etiocholanolone $\delta^{13}\text{C}$ (‰) values by gas chromatography/combustion/ isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; 14: 2294-2299.
20. Aguilera R, Chapman TE, Starcevic B, Hatton CK, Catlin DH. Performance characteristics of a carbon isotope ratio method for detecting doping with testosterone based on urine diols: controls and athletes with elevated testosterone/epitestosterone ratios. *Clin Chem* 2001; 47: 292-300.
21. Becchi M, Aguilera R, Farizon Y, Flament M, Casabianca H, James P. Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sports. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1994; 8: 304-308.
22. Horning S, Geyer H, Machnik M, Schänzer W, Hilkert A, Oebelmann J. Detection of exogenous testosterone by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ analysis. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds). Recent advances in doping analysis (4). Sport und Buch Strauß, Köln, 1997; 275.
23. Shackleton CHL, Phillips A, Chang T, Li Y. Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstanediols. *Steroids* 1997; 62: 379-387.
24. Mathurin J-C, Herrou V, Bourgogne E, Pascaud L, de Ceaurriz J. Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry analysis of 19-norsteroids: application to the detection of a nandrolone metabolite in urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 759: 267-275.
25. Shackleton CHL, Rootman E, Phillips A, Chang T. Androstanediol and 5-androstenediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone and dehydroepiandrosterone: Potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry. *Steroids* 1997; 62: 665-673.
26. Ueki M, Okano M. Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999; 13: 2237-2243.
27. Leder BZ, Catlin DH, Longcope C, Ahrens B, Schoenfeld DA, Finkelstein JS. Metabolism of orally administered androstenedione in young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3654-3658.
28. Garle M, Palonek E. Androstenedione: excretion studies from single and multiple dose experiments. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds). Recent advances in doping analysis (6). Sport und Buch Strauß, Köln, 1998; 181.
29. Kazlauskas R. Effects of DHEA on urinary steroids. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds). Recent advances in doping analysis (5). Sport und Buch Strauß, Köln, 1997, 83.
30. Eenoo P van, Delbeke FR, Desmet N, Backer P de. Excretion studies with 4-androstene-3,17-dione. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds). Recent advances in doping analysis (6). Sport und Buch Strauß, Köln, 1998; 171.
31. Bosy TZ, Moore KA, Poklis A. The effect of oral dehydroepiandrosterone (DHEA) on the urine testosterone/epitestosterone (T/E) ratio in human male volunteers. *J Anal Toxicol* 1998; 22: 455-459.
32. Bowers LD. Oral dehydroepiandrosterone supplementation can increase the testosterone/epitestosterone ratio. *Clin Chem* 1999; 45: 295-297.
33. Uralets VP, Gillette PA. Over-the-counter anabolic steroids 4-androsten-3,17-dione; 4-androsten-3 α ,17 α -diol and 19-nor-4-androstene-3,17-dione: Excretion studies in men. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 257-266.
34. Uralets VP, Gillette PA. Over-the-counter delta-5 anabolic steroids 5-androsten-3,17-dione; 5-androsten-3 α ,17 β -diol, dehydroepiandrosterone and 19-nor-5-androstene-3,17-dione: Excretion studies in men. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 188-193.
35. Kamber M, Baume N, Saugy M, Rivier L. Nutritional supplements as a source for positive doping cases? *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2001; 11: 258-263.
36. Cock KJ de, Delbeke FT, Eenoo P van, Desmet N, Roels K, Backer P de. Detection and determination of anabolic steroids in nutritional supplements. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 25: 843-852.
37. Geyer H et al. The analysis of 'non-hormonal' nutritional supplements for pro-hormones. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds). Recent advances in doping analysis (8). Sport und Buch Strauß, Köln, 2001; 63.
38. Catlin DH, Leder BZ, Ahrens B, Starcevic B, Hatton CK, Green GA, Finkelstein JS. Trace contamination of over-the-counter androstenedione and positive urine test results for a nandrolone metabolite. *JAMA* 2000; 284: 2618-2621.
39. Tseng YL, Kuo F-H, Sun K-H. Quantification and profiling of 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone in human urine after consumption of a nutritional supplement and norsteroids. *J Anal Toxicol* 2005; 29: 124-134.
40. WADA Technical Document TD2004NA, version 1.0. Reporting norandrosterone findings. WADA Laboratory Committee; May 2004.
41. Hemmersbach P, Hågensen AH, Misund J. Determination of urinary norandrosterone excretion in females during one menstrual cycle by gas chromatograph/mass spectrometry. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds). Recent advances in doping analysis (7). Sport und Buch Strauß, Köln, 2000; 141.
42. Dehennin L, Bonnaire Y, Plou P. Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man: Quantitative analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1999; 721: 301-307.
43. Bizec B le, Monteau F, Gaudin I, André F. Evidence for the presence of endogenous 19-norandrosterone in human urine. *J Chromatogr B* 1999; 723: 157-172.

44. Eenoo P van, Delbeke FT, Jong FH de, Backer P De. 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 Mol Biol* 2001; 78: 351-357.
45. Dehennin L, Jondet M, Scholler R. Androgen and 19-norsteroid profiles in human preovulatory follicles from stimulated cycles: An isotope dilution-mass spectrometric study. *J Steroid Biochem* 1987; 26: 399-405.
46. Reznik Y, Herrou M, Dehennin L, Lemaire M, Leymarie M, Leymarie P. Rising plasma levels of 19-nortestosterone throughout pregnancy: Determination by radioimmunoassay and validation by gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Endocr Metabol* 1987; 64: 1086-1088.
47. Bizec B le, Gaudin I, Monteau F, André F, Impens S, Wasch K de, Brabander H de. Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profiles of nandrolone metabolites. I. Mass spectrometric detection and quantification of 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone in human urine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; 14: 1058-1065.
48. Thieme D, Anielski P, Grosse J, Hemmersbach P, Lund H, Rautenberg C. Kinetic of in-situ demethylation of deuterated endogenous steroids in urine samples. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U (eds). *Recent advances in doping analysis (12)*. Sport und Buch Strauß, Köln, 2004; 177.
49. Grosse J, Anielski P, Hemmersbach P, Lund H, Mueller RK, Rautenberg C, Thieme D. Formation of 19-norsteroids by in-situ demethylation of endogenous steroids in stored urine samples. *Steroids* 2005; 70: 499-506.

Summary

Endogenous steroids: a different kind of sport. Kerkhof DH van de. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 41-46.

This article describes the development of endogenous steroid abuse in addition to the development of the analytical techniques to determine these steroids. There is still an increasing number of steroids of endogenous origin being used as doping agents in sports. During the eighties of the last century, mainly testosterone was used. At present, precursors of testosterone such as dehydroepiandrosterone and androst-4-ene-3,17-dione are encountered, in addition to several 19-norsteroids. Methods to detect these endogenous steroids in urine have evolved simultaneously to the development of steroid abuse. Formerly, the use of testosterone was detected by means of the testosterone/epitestosterone (T/E) ratio. At present, more complicated analytical techniques such as isotope ratio mass spectrometry are applied.

Key words: doping analysis; endogenous steroids; testosterone; T/E ratio; isotope ratio mass spectrometry; supplements