

Open Access

Berl Münch Tierärztl Wochenschr
DOI 10.2376/0005-9366-17018

© 2017 Schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
robert.hertzsch@uni-leipzig.de

Eingegangen: 24.03.2017
Angenommen: 17.05.2017

Online first: 02.06.2017
[http://vetline.de/open-access/
158/3216/](http://vetline.de/open-access/158/3216/)

Zusammenfassung

Summary

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2017/17018 \$ 15.00/0

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Doping im Pferdesport: Metaanalyse zur Validierung internationaler Residue-Limits für die Tropan-Alkaloide Atropin und Scopolamin

Doping in equestrian sports: Meta-analysis to validate International Residue Limits for the tropane alkaloids atropine and scopolamine

Robert Hertzsch, Angelika Richter

Die Tropan-Alkaloide Atropin und Scopolamin werden im Pferdesport als dopingrelevante Stoffe betrachtet und dürfen daher während des Wettkampfs nicht im Pferd nachweisbar sein. Neben einer gezielten Verabreichung dieser Substanzen an Pferde können beide Alkaloide auch unbeabsichtigt über mit *Datura* spp. verunreinigte Futter von Pferden aufgenommen werden. Zur Unterscheidung zwischen einer gezielten, illegitimen Verabreichung und einer zufälligen, ungewollten Aufnahme über das Futter wurden von der International Federation of Horseracing Authorities für beide Substanzen internationale Residue-Limits (IRLs) in Höhe von je 60 ng/ml Urin eingeführt. Diese wurden bisher nicht unabhängig überprüft. In dieser Arbeit wurde zur wissenschaftlichen Validierung der IRLs für Atropin und Scopolamin eine strukturierte Metaanalyse durchgeführt. Im ersten Schritt wurden hierzu anhand definierter Such- und Inklusionskriterien die zur Thematik veröffentlichten Studien ermittelt und alle verwertbaren Daten extrahiert. Anschließend wurde geprüft, welche der vorhandenen Methoden zur Festlegung von Screening-Limits auf dieser Datenbasis angewendet werden konnten. Dies war für eine der vier üblicherweise verwendeten Methoden möglich. Unter Anwendung dieser Methode auf Grundlage der veröffentlichten Daten kann gezeigt werden, dass das IRL von Atropin in angemessener Höhe festgelegt wurde, während das IRL von Scopolamin nicht als wissenschaftlich valide bestätigt werden kann.

Schlüsselwörter: Futtermittelkontaminanten, Anti-Doping-Regularien, *Datura*, (\pm)-Hyoscyamin, IRL

The tropane alkaloids atropine and scopolamine are considered as substances relevant for doping in horses. Thus, they shall not be detectable in horses during competition. Both substances can enter the horse either due to intentional, illegitimate application or they can be accidentally ingested via *Datura* spp. contaminated feed. To facilitate the discrimination between these two causes for the presence of atropine or scopolamine in competition horses, the International Federation of Horseracing Authorities established International Residue Limits (IRLs) of 60 ng/ml urine respectively. These IRLs have not yet been independently validated. In this study, we performed a structured meta-analysis to scientifically validate these IRLs. Defined search and inclusion criteria were used to identify relevant studies, from which the usable data was extracted. The collected data was subsequently used to check which of the available methods for the determination of screening limits could be utilized, which was the case for one of the four usually applied methods. Using this method based on the available data, we concluded that the IRL for atropine has been set appropriately. In contrast, we could not confirm the IRL of scopolamine as scientifically valid.

Keywords: Feed contaminants, Anti-Doping Rules, *Datura*, (\pm)-Hyoscyamine, IRL

Einleitung

Doping tritt im Pferdesport in unterschiedlichen Ausprägungen auf (Kietzmann und Kluge, 2016). Neben den seit langer Zeit bedeutsamen Formen des Dopings auf Sieg und des Dopings zur Wiederherstellung der natürlichen Leistungsfähigkeit ist in den vergangenen Jahren das unbeabsichtigte Doping stärker in den Fokus der Pferdesportverbände gelangt (Hertzsch et al., 2015). Grund dafür waren wiederholt auftretende Dopingfälle bei Sportpferden, welche nachweislich durch die Aufnahme kontaminierten Futters hervorgerufen wurden. Bei den in diesen Fällen nachgewiesenen Stoffen handelte es sich um Alkaloide aus unterschiedlichen chemischen Gruppen, wie z.B. den Opioid-Alkaloiden Morphin und Oripavin (FEL, 2015), den Tropan-Alkaloiden Atropin und Scopolamin (FEL, 2016a) und den Methylxanthinen Koffein und Theophyllin (FEL, 2016b). Diese Stoffe wurden in den dokumentierten Fällen zumeist in einer sehr geringen Konzentration in der Größenordnung von wenigen ng je ml Urin nachgewiesen. Aufgrund der durch den technischen Fortschritt stetig empfindlicher werdenden Nachweismethoden für diese Substanzen (Badoud et al., 2011) stand zu befürchten, dass die Anzahl gleichartiger Fälle weiter an Bedeutung gewinnen würde (Brewer et al., 2014). Diese Entwicklung wurde von den internationalen Pferdesportorganisationen erkannt und entsprechende regulatorische Maßnahmen wurden eingeleitet. Während die FEI (Fédération Equestre Internationale) u.a. für die genannten Substanzen eine neue Kategorie, die sog. „Specified Substances“, in ihr Regelwerk aufnahm (FEL, 2016c), wurden von der International Federation of Horseracing Authorities (IFHA) konkrete Rückstandshöchstmengen, die International Residue Limits (IRL), etabliert (IFHA, 2014). Diese IRL dienen als Nachweisgrenzen für die beim Screening von Dopingproben eingesetzten Methoden. Nachweise von Stoffen in Konzentrationen unterhalb der IRL sollen zukünftig nicht mehr als Verstoß gegen die Anti-Doping-Regularien angesehen werden, da in diesem Fall keine relevante pharmakologische Wirkung zu erwarten ist und das Auftreten dieser Substanzen mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Aufnahme von kontaminiertem Futter hervorgerufen wurden (IFHA, 2014). Die von einer Expertenkommission der IFHA festgelegten konkreten IRLs wurden bislang keiner unabhängigen wissenschaftlichen Überprüfung unterzogen. In der vorliegenden Arbeit haben wir daher am Beispiel der Tropan-Alkaloide Atropin und Scopolamin überprüft, ob die hierfür festgelegten IRLs in Höhe von jeweils 60 ng/ml Urin als wissenschaftlich valide beurteilt werden können.

Die Tropan-Alkaloide Atropin und Scopolamin sind die Hauptalkaloide der Pflanzen aus der Gattung der Stechäpfel (*Datura*), welche der Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae) angehören (Griffin und Lin, 2000). Bedeutendster Vertreter dieser weltweit in der gemäßigten Klimazone vorkommenden Gattung ist der gemeine Stechapfel (*Datura stramonium*) (Brewer et al., 2014). Obwohl beide Alkaloide auch in anderen Pflanzenfamilien, wie z.B. den Windengewächsen (Convolvulaceae) und den Wolfsmilchgewächsen (Euphorbiaceae), vorkommen (Jirschitzka et al., 2012), scheinen nur Vertreter der Gattung *Datura* von quantitativer Relevanz für die betrachtete Fragestellung zu sein (Brewer et al., 2014).

Neben der akzidentellen oralen Aufnahme der Tropan-Alkaloide über kontaminiertes Futter ist ihr möglicher Einsatz als Arzneimittel, regelkonform oder missbräuchlich, zu bedenken. Atropin wird beim Pferd z.B. in der Ophthalmologie (Williams et al., 2000) und in der Narkoseprämedikation eingesetzt (Alitalo et al., 1986). Da in Deutschland keine für Tiere zugelassenen Atropin-Präparate vorhanden sind, müssen für diesen Zweck zugelassene Humanarzneimittel umgewidmet werden (Löscher et al., 2014). Scopolamin findet im Gegensatz dazu keine Verwendung in der Veterinärmedizin. Es existieren aber in Deutschland zugelassene Scopolamin-haltige Humanarzneimittel in Form von Augentropfen (DIMDI, 2017). Das in der Tiermedizin verwendete halbsynthetische N-Butylscopolamin, welches oft selbst auf Basis von aus Pflanzen gewonnenem Scopolamin hergestellt wird (Foley, 2006), kann analytisch sicher von Scopolamin unterschieden werden (John et al., 2010). Eine Verwendung beider parasympatholytisch wirkenden Stoffe zum Doping bei Pferden ist prinzipiell aufgrund der bronchospasmolytischen Wirkung und des beschriebenen stimulierenden Effekts auf das zentrale Nervensystem denkbar (Plumb, 2015). Die in höheren Dosierungen auftretenden Nebenwirkungen wie z.B. Ataxie, Photophobie als Folge der eintretenden Mydriasis sowie Tachykardie und tachykarde Arrhythmien (Plumb, 2015), stehen dem Zweck der Leistungssteigerung jedoch entgegen. Zum Metabolismus beider Substanzen beim Pferd sind nur wenige gesicherte Erkenntnisse vorhanden (Respondek et al., 2006). Bekannt ist lediglich, dass ein großer Anteil beider Alkaloide in Form konjugierter Metaboliten ausgeschieden wird, während nur ein sehr geringer Anteil unverändert mit dem Urin eliminiert wird (Galey et al., 1996). Weiterführende Studien zum Metabolismus von Atropin und Scopolamin bei anderen Tierarten, wie z.B. Ratten, bestätigen die Bedeutung konjugierter Metaboliten bei der Exkretion dieser Stoffe über den Urin (Chen et al., 2005; Chen et al., 2006).

Zur wissenschaftlich begründeten Festlegung von Grenzwerten und Screening-Limits im Pferdesport sind in der Literatur vier unterschiedliche Methoden beschrieben. Die Methode nach Lassourd und Toutain (2002) erlaubt die Berechnung von irrelevanten Plasma- und Urinkonzentrationen für pharmakologisch wirksame Stoffe, wenn pharmakokinetische und pharmakodynamische Daten hierfür vorliegen. Die Methode nach Tobin et al. (1999) beschreibt ein experimentelles Vorgehen zur Bestimmung der größten Dosis ohne Effekt mit anschließender Ableitung korrespondierender Urin- und Plasmakonzentrationen. Eine Verfahrensweise zur Ermittlung von Grenzwerten für endogen gebildete Stoffe und mit dem üblichen Futter durch Pferde aufgenommene Substanzen auf Basis populationsstatistischer Analysen beschreiben Lakhani et al. (2004) und Ho et al. (2015). Eine Methodik zur Festlegung von Grenzwerten für Kontaminanten von Futtermitteln, deren Auftreten im Pferdefutter nicht sicher ausgeschlossen werden kann, beschreibt Haywood et al. (1990) am Beispiel von Theobromin. In dieser Studie wurden vier Pferden definierte Mengen des untersuchten Stoffs zweimal täglich über vier Tage mit dem Futter verabreicht und die dabei auftretende maximale Urinkonzentration bestimmt. Auf Grundlage dieser Untersuchung wurde der international gültige Grenzwert für Theobromin von 2 µg/ml Urin festgelegt.

In der vorliegenden Arbeit sollte mithilfe einer umfassenden Literaturanalyse zuerst ermittelt werden, welche Methoden unter Verwendung der veröffentlichten Daten zur Validierung der IRLs für Atropin und Scopolamin eingesetzt werden können. Diese Methoden sollten anschließend auf Grundlage der extrahierten Daten angewendet werden.

Material und Methode

Literaturanalyse

Um in einer möglichst strukturierten, transparenten und nachvollziehbaren Art und Weise alle veröffentlichten Studien zu finden, die zur Bewertung des Residue-Limits (IRL) unter Verwendung einer der oben beschriebenen Methoden verwendbar sind, wurde die Recherche unter Orientierung am PRISMA-Statement von Moher et al. (2009) zur Qualitätssicherung von Meta-Analysen und systematischen Reviews durchgeführt. Dabei wurde insbesondere das dort veröffentlichte Flussdiagramm zur Beschreibung des Informationsflusses genutzt. Die Checkliste des PRISMA-Statements wurde beachtet, sie konnte aber aufgrund der Thematik dieser Arbeit, welche von der Art der Fragestellung nicht deckungsgleich mit der Intention des Statements ist, nur teilweise berücksichtigt werden.

Zur Identifikation potentiell relevanter Studien wurden die Literaturdatenbanken „PubMed“ „Web of Science“, „CABI“ und die Publikationsdatenbanken der deutschsprachigen Veterinärmedizinischen Hochschulen und Fakultäten verwendet. Die dabei verwendeten Suchbegriffe sind Tabelle 1 zu entnehmen. Im Rahmen

einer explorativen Voranalyse der vorhandenen Literatur wurden bei der Suche weitere Begriffe und Suchansätze, auch in französischer Sprache, getestet. Diese erlaubten jedoch keine relevante Erweiterung des Suchergebnisses und wurden daher nicht in die finale Literaturanalyse inkludiert. Berücksichtigt wurden Studien in deutscher oder englischer Sprache, die bis zum 31.07.2016 veröffentlicht waren. Eine weitere Einschränkung der Suchergebnisse fand bei der Nutzung der Literaturdatenbanken nicht statt. Zusätzlich zu den Literaturdatenbanken fanden die im Übersichtsartikel von Brewer et al. (2014) genannten relevanten Literaturstellen Beachtung. Alle nicht aus der Datenbankrecherche entnommenen Literaturstellen sind in Tabelle 2 als aus „sonstige Quellen“ stammend gekennzeichnet.

Studienauswahl und Datenextraktion

Auf Grundlage der vier Methoden zur Ermittlung von Grenzwerten nach Lassourd und Toutain (2002), Tobin et al. (1999), Ho et al. (2015) und Haywood et al. (1990) wurden Kriterien zum Einschluss von Studien aus der Literatursammlung in diese Arbeit definiert. Maßgeblich war dabei die potentielle Verwendbarkeit der in einer Studie enthaltenen Daten zur Auswertung mithilfe einer der beschriebenen Methoden. Für die beiden untersuchten Stoffe konnten Studien zur Auswertung nach der Methode von Haywood et al. (1990) identifiziert werden, für welche die folgenden Inklusionskriterien verwendet wurden:

- Die Studie wurde an der Tierart Pferd durchgeführt.
- Die Tiere waren mindestens zwei Jahre alt. Dies entspricht dem jüngsten Alter von im Vollblutspport eingesetzten Tieren. Jüngere Tiere weisen oft ein deutlich abweichendes Ausscheidungsverhalten auf (Kietzmann und Löscher, 1990).
- Den Tieren wurde eine definierte Menge eines oder mehrerer der untersuchten Alkaloide über das Futter oder über direkte orale Eingabe appliziert. Wurde mehr als ein Alkaloid gleichzeitig verabreicht, wurde die Studie nur berücksichtigt, wenn diese Alkaloide nicht im Stoffwechsel des Pferdes ineinander umgewandelt werden.
- Die verabreichte Dosis entspricht einer Stoffmenge, die über kontaminiertes Futter aufgenommen werden kann und nicht offensichtlich zur Leistungsbeeinflussung von Pferden geeignet oder bestimmt ist.
- Die maximale erreichte Konzentration des Stoffes und/oder seiner Metaboliten im Urin und/oder im Plasma wurde angegeben.

TABELLE 1: Bei der Literaturrecherche verwendete Suchbegriffe

Atropin	Scopolamin
Atropin Horse	Scopolamine Horse
Atropine Horse Urine	Tropane Alkaloids Horse
Atropine Horse Plasma	Scopolamine Horse Urine
Atropine Horse Pharmacokinetics	Scopolamine Horse Plasma
Hyoscamine Horse	Scopolamine Horse Intoxication
Atropine Horse Doping	Scopolamine Horse Feed
Atropine Horse Intoxication	Scopolamine Horse Doping
Tropane Alkaloids Horse	Scopolamine Horse Pharmacokinetics
Atropine Horse Feed	Scopolamin Pferd
Atropin Pferd	

TABELLE 2: Ergebnisse der Literatursammlung

	Atropin	Scopolamin
Identifizierte Publikationen (Datenbanken/Sonstige Quellen)	634/2	222/4
Anzahl Publikationen ohne Doppel	411	213
Anzahl überprüfter Publikationen	411	213
Anzahl bei Vorauswahl ausgeschlossener Publikationen	404	205
Anzahl vorausgewählter Publikationen	7	8
Anzahl der im Volltext auf Eignung geprüften Publikationen	7	8
Nicht geeignete Publikationen	4	5
Geeignete Publikationen	3	3

Die in der Literaturrecherche gefundenen Quellen wurden im ersten Schritt um alle Mehrfachnennungen bereinigt. Anschließend wurden in einer Vorauswahl alle Studien, die anhand des Titels und des Abstracts als offensichtlich für die weitere Analyse ungeeignet einzuschätzen waren, von der weiteren Verwendung ausgeschlossen. Die vorausgewählten Studien wurden abschließend im Volltext unter Verwendung der Inklusionskriterien geprüft und als für die weitere Verwendung geeignet oder ungeeignet klassifiziert.

Aus den als geeignet klassifizierten Studien wurden anschließend alle relevanten Daten extrahiert. Waren die Messwerte der Studien, insbesondere Konzentrations-Zeit-Verläufe, nicht in numerischer, sondern in grafischer Form angegeben, wurden die relevanten Daten mithilfe des webbasierten Programms WebPlotDigitizer

(<http://arohatgi.info/WebPlotDigitizer/citation.html>) in numerische Werte überführt. Für die Auswertung nach der Methode von Haywood et al. (1990) wurden die Werte der folgenden Parameter für Atropin und Scopolamin extrahiert:

- Verfütterte/eingegebene Dosis in mg je Tier,
- Dosierungsintervall,
- Maximale Plasma- und/oder Urinkonzentration nach Aufnahme der Dosis,
- Anzahl der untersuchten Tiere.

Statistische Analyse der gesammelten Daten

Die aus den inkludierten Studien entnommenen Daten zur aufgenommenen Dosis des untersuchten Stoffs und die damit korrespondierende Urinkonzentration wurden zuerst in ein Koordinatensystem eingetragen, wobei die x-Achse die Dosis des verabreichten Alkaloids und die y-Achse die nach der Verabreichung dieser Dosis gemessene maximale Urinkonzentration repräsentiert. Ließ sich aus der graphischen Darstellung eine lineare Beziehung zwischen den Datenpunkten vermuten, wurde mithilfe des Programms Sigma-Plot Version® 11 (Systat Software Inc., USA) eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Die je Tier und Tag verabreichte Dosis wurde dabei als unabhängige Variable benannt, die maximal bestimmte Urinkonzentration als abhängige Variable. Zur Erhöhung der statistischen Aussagekraft der Analyse wurde jeweils der Datenpunkt 0,0 in die Regressionsanalyse integriert, da es sich bei den beiden untersuchten Stoffen um Alkaloide handelt, die nicht endogen gebildet werden (Respondek et al., 2006).

Vergleichsmaßstab

Für die Bewertung der IRLs nach der Methode von Haywood et al. (1990) wurde neben den mittels der Literaturanalyse gesammelten Informationen zum Ausscheidungsverhalten der betrachteten Stoffe ein geeigneter Vergleichsmaßstab zum Gehalt der Stoffe in Pferdefutter benötigt. Um solch einen Vergleichsmaßstab zu erhalten, wurden vorhandene rechtliche Grenzwerte für den Höchstgehalt der Stoffe bzw. der diese beinhaltenden Pflanzen in der Europäischen Union berücksichtigt. Diese wurden ergänzt durch in der Literatur veröffentlichte botanisch-chemische Analysen zum Gehalt von Atropin und Scopolamin in den relevanten Pflanzenarten.

Ergebnisse

Ergebnisse der Literatursammlung und Datenextraktion

Wie in Tabelle 2 zusammengefasst, wurden 411 Veröffentlichungen für Atropin und 213 Publikationen für Scopolamin auf ihre Eignung für die Zwecke dieser Arbeit geprüft. Der Großteil der identifizierten Publikationen konnte in dieser Arbeit keine Verwendung finden, da die Inklusionskriterien nicht erfüllt waren. Grund dafür waren zumeist die Frage- und Zielstellungen der Publikationen, welche die Suchbegriffe u.a. aus den folgenden Gründen enthielten:

- Anwendung der untersuchten Stoffe als Arzneimittel zu klinischen Zwecken, wie z.B. der Behandlung von Augenerkrankungen oder Einsatz während der Narkose,

- Durchführung physiologischer Untersuchungen z.B. zur Funktion des Parasympathikus im Herz-Kreislauf-System,
- In-Vitro-Studien z.B. zur Funktionsweise muskarinergere Rezeptoren.

Schließlich konnten von diesen Studien jeweils nur drei für Atropin und Scopolamin in die Analyse inkludiert werden.

Die erste Studie von Galey et al. (1996) wurde an fünf adulten Stuten durchgeführt. Vier Pferden wurden einmalig unterschiedliche Mengen einer aus *Datura stramonium* hergestellte Paste mit definiertem Scopolamin- und Atropingehalt oral verabreicht. Das fünfte Pferd erhielt eine einmalige Gabe von *Datura stramonium* - Samen mit definiertem Atropin- und Scopolamingehalt über das Futter. Nach der Verabreichung wurde die Verlaufskonzentration beider Alkaloide im Urin gemessen. Die Urinproben wurden hierfür zuerst unter Verwendung von β -Glucuronidase enzymatisch hydrolysiert, da ohne diese Aufarbeitung kein Nachweis der Alkaloide im Harn möglich war. Die so bearbeiteten Urinproben wurden nach weiterer methodenbedingt notwendiger Vorbereitung mittels einer Gaschromatographie mit Massenspektrometrikopplung (GC/MS) unter Einsatz des Einzelionennachweis-Modus (Single-Ion-Monitoring - SIM) untersucht. Die Quantifizierung von Atropin und Scopolamin wurde unter Verwendung einer internen Kalibrationskurve durchgeführt. Eine weitergehende Validierung der in dieser Studie eingesetzten Methode wurde nicht beschrieben. Die zweite Studie von Respondek et al. (2006) wurde an insgesamt 24 Pferde durchgeführt. Diese wurde in Gruppen von 3 bis 6 Tieren aufgeteilt und erhielten zweimal täglich über einen Zeitraum von 3 Tagen Kombinationen aus zwei metabolisch voneinander unabhängigen Alkaloiden. Die Alkaloide wurden den Pferden dabei über Kapseln gefüttert, welche in Karotten eingearbeitete waren. Neben der Kombination Atropin und Scopolamin, welche bei fünf Pferden untersucht wurden, fanden Versuche mit weiteren Alkaloiden wie z.B. Morphin und Bufotenin statt. Jede Tiergruppe erhielt nacheinander zwei unterschiedliche Dosierungen, wobei die beiden Phasen durch eine Auswaschperiode von 7 Tagen getrennt waren. Die Urinproben wurden i.d.R. drei Stunden nach der morgendlichen Fütterung während der spontanen Miktion gewonnen. Die so gewonnenen Proben wurden unmittelbar nach der Probennahme tiefgefroren und in einem FEI-Referenzlabor untersucht. Zur Analyse der Proben auf Atropin und Scopolamin wurde dort mit einer enzymatischen Hydrolyse unter Einsatz von β -Glucuronidase begonnen. Anschließend wurden die Proben weiterbearbeitet und mittels GC-MS gemessen. Die verwendete Analytik wies eine Nachweisgrenze (Limit of Detection – LOD) von 1-5 ng/ml Atropin und 5-10 ng/ml Scopolamin auf. Zur Quantifizierung wurde deuteriertes Atropin und Scopolamin genutzt. Von einer weiteren Validierung der Messmethodik wird nicht berichtet. Die dritte Studie wurde von Bonnaire et al. (2008) an sechs Pferden durchgeführt. Je zwei Tieren wurden einmal täglich über zwei Tage gleichzeitig zwei metabolisch voneinander unabhängige Alkaloide oral mit einer Spritze verabreicht. Morphin wurde gemeinsam mit Koffein, Atropin gemeinsam mit Theophyllin und Scopolamin zusammen mit Theobromin eingegeben. Urinproben wurden am Tag der letzten

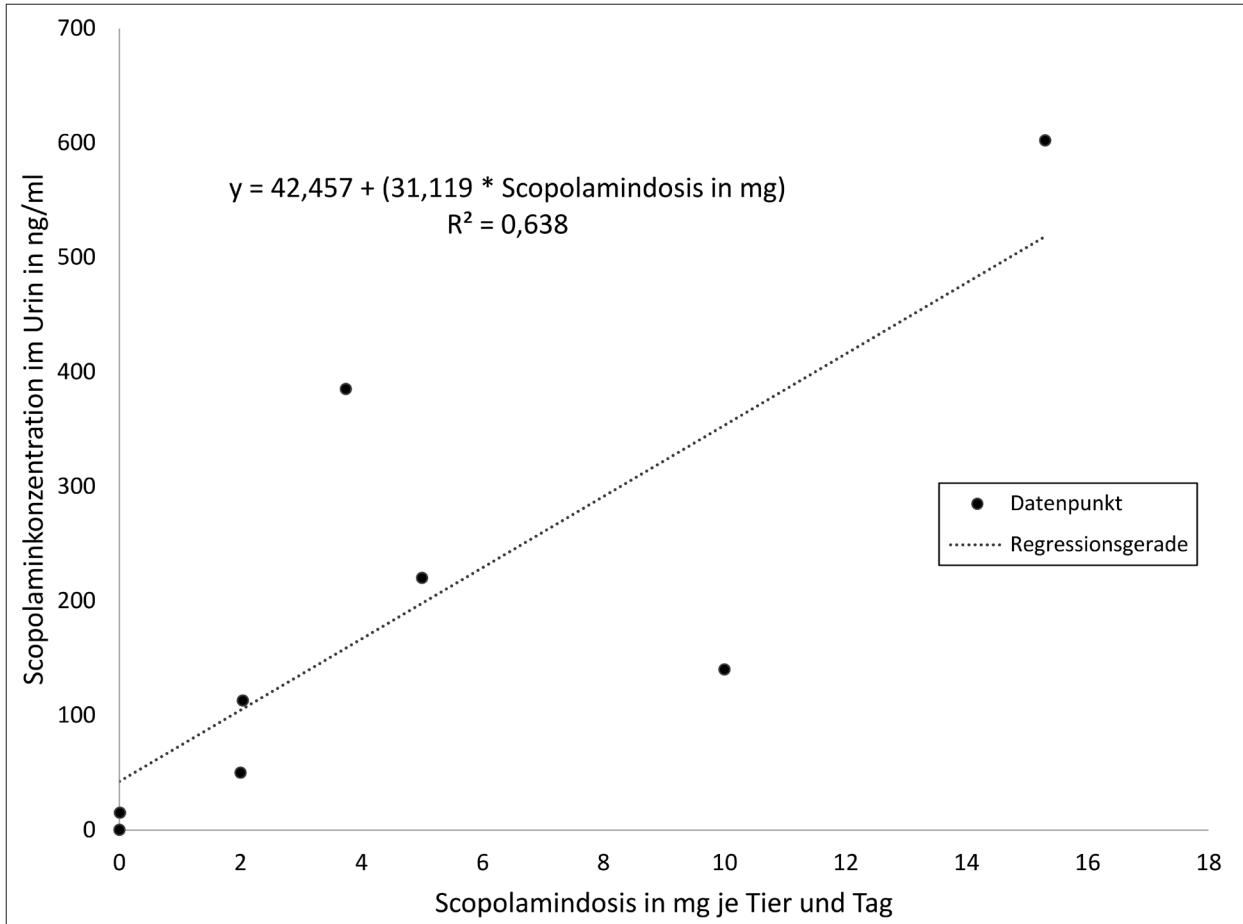


ABBILDUNG 1: Dosis-Urinkonzentrationsverhältnis Scopolamin

Verabreichung zwei bis drei Stunden nach der Alkaloidgabe und noch einmal 24 Stunden später gewonnen. Die bei der spontanen Miktion gesammelten Proben wurden nach der Gewinnung sofort eingefroren und an einem FEI-Referenzlabor untersucht. Die Analyse wurde dort wie von Respondek et al. (2006) beschrieben durchgeführt. Die Studien von Respondek et al. (2006) und Bonnaire et al. (2008) bestimmten die Urinkonzentration von Atropin und Scopolamin semiquantitativ und berichten daher jeweils nur den Konzentrationsbereich, der in der untersuchten Tiergruppe für beide Stoffe im Urin gemessen wurde. Für die weitere Betrachtung der maximal nach der Aufnahme bestimmter Alkaloidmengen zu erwartenden Urinkonzentrationen wurden

daher jeweils nur die veröffentlichten Höchstwerte je applizierter Dosis berücksichtigt.

Die aus den für Atropin ausgewählten Studien entnommenen Daten sind in Tabelle 3 dargestellt. Insgesamt wurde das Ausscheidungsverhalten von Atropin nach oraler Aufnahme bei 13 Pferden untersucht. Die geprüften Dosierungen liegen in einem Bereich von 5 mg je Tier bis zu 15 mg je Tier einmalig oder wiederholt einmal bzw. zweimal täglich für bis zu drei Tage. Die größte dabei gemessene Urinkonzentration beträgt 25 ng/ml Urin.

In Tabelle 4 sind die gesammelten Daten für Scopolamin verzeichnet, welche Untersuchungen bei insgesamt 16 Tieren umfassen. Die verabreichten Dosen lagen zwischen 0,01 mg je Tier bis zu 15,3 mg je Tier einmalig oder wiederholt einmal bzw. zweimal täglich für bis zu drei Tage. Die dabei gemessenen maximalen Urinkonzentrationen umfassen einen Bereich von 25 ng/ml Urin bis 602 ng/ml Urin.

TABELLE 3: Literaturangaben zu Atropin zur Bewertung nach der Methode Haywood et al. (1990)

Studie	Tierzahl	Tagesdosis	Dosierungsschema	Cmax Urin
Respondek et al. (2006)	5	5 mg	Dosis aufgeteilt auf 2 Einzelgaben für 3 Tage	< 5 ng/ml
Respondek et al. (2006)	5	15 mg	Dosis aufgeteilt auf 2 Einzelgaben für 3 Tage	< 5 ng/ml
Galey et al. (1996)	1	5,46 mg	Einmalig	2,6 ng/ml
Bonnaire et al. (2008)	2	10 mg	1 x tägl. für 2 Tage	25 ng/ml

Statistische Auswertung

Eine statistische Auswertung der zu Atropin extrahierten Daten war aufgrund der geringen Zahl an vorhandenen Datenpunkten nicht möglich. Für Scopolamin konnte sie vorgenommen werden. Die aus den Studien in Tabelle 4 entnommenen Daten und der Datenpunkt 0,0 wurden in das Koordinatensystem von Abbildung 1 eingetragen. Auf der y-Achse wurde jeweils die maximal gemessene Urin-Konzentration von Scopolamin aufgetragen, auf der X-Achse die an das Tier verabreichte Gesamttagesdosis.

Mittels einfacher Regressionsanalyse, die acht Werte einschloss, konnte folgende Regressionsgerade errechnet werden: Scopolamin in ng/ml Urin = 42,457 + (31,119 x Scopolamindosis in mg).

Die Regressionsgerade wird durch folgende statistische Parameter beschrieben: R = 0,799; R² = 0,638; p = 0,017. Die Beziehung zwischen der Scopolamindosis und der Scopolaminkonzentration ist mit einem p-Wert < 0,05 als signifikant zu beurteilen. Der R²-Wert von 0,638 zeigt, dass die maximale Urinkonzentration von Scopolamin hauptsächlich von der aufgenommenen Scopolamindosis bestimmt wird. Ohne Berücksichtigung des Datenpunkts 0,0 ergibt sich eine Regressionsgerade mit der Gleichung: Scopolamin in ng/ml Urin = 55,749 + (29,792 x Scopolamindosis in mg)

und einem Bestimmtheitsmaß von R² = 0,5896 sowie einem p-Wert von 0,044. Die Einbeziehung dieses Datenpunkts verbessert somit vor allem das Bestimmtheitsmaß und den p-Wert der Regressionsgeraden, während ihr Anstieg und ihre Lage im Koordinatensystem nur geringfügig verändert werden.

Vergleichsmaßstab

Die Hauptquelle für die unbeabsichtigte Aufnahme von Atropin und Scopolamin durch Pferde sind, wie bei Brewer et al. (2014) beschrieben, Pflanzen der Gattung *Datura*. Der Gehalt von Samen und Früchten dieser Pflanzen in Futtermitteln ist in der EU durch die Richtlinie 2009/141/EG auf einen maximal zulässigen Wert von 1 g je kg Futter mit einem Feuchtigkeitsanteil von 12 % begrenzt. Futter, welches diesen Wert übersteigt, ist in der EU nicht regelkonform und darf damit nicht an Tiere verfüttert werden. Der Gehalt von Atropin und Scopolamin in Pflanzen der Gattung *Datura* unterliegt einer großen Schwankungsbreite und ist von verschiedenen Faktoren, wie z.B. der jeweiligen Pflanzenart, dem Vegetationsstadium und dem untersuchten Pflanzenteil, abhängig (Miraldi et al., 2001). Die Abschätzung der in einem regelkonformen Futter vorhandenen Menge Atropin und Scopolamin kann daher nur als Extremwertschätzung vorgenommen werden. Jakobova et al. (2012) hat für verschiedene *Datura*-Arten den Alkaloidgehalt unterschiedlicher Pflanzenteile in verschiedenen Vegetationsstadien bestimmt. Die dort gemessenen Konzentrationen liegen zwischen 0,02 mg und 5,91 mg Atropin je g Trockensubstanz und zwischen 0,01 mg und 4,53 mg Scopolamin je g Trockensubstanz, wobei für eine Mischprobe aus Früchten und Samen eine Konzentration von 0,53 mg je g Atropin und 3,44 mg je g Scopolamin bestimmt wurden. Spezifische Untersuchungen des Atropin- und Scopolamingehalts von Samen der Art *Datura stramonium* wurden z.B. von Miraldi et al. (2001) und von Dugan et al. (1989) durchgeführt. Dabei wurden Atropin- und Scopolaminkonzentrationen im Bereich von 0,17–2,71 mg je g bzw. 0,012–0,66 mg je g gemessen. Unter der Annahme einer täglichen Trockenmasseaufnahme eines adulten Sportpferdes von 10 kg kann ein Pferd über ein den Regularien entsprechendes Futter bis zu 10 g *Datura*-Samen und Früchte aufnehmen. Werden Samen und Früchte mit den höchsten gemessenen Konzentrationen aufgenommen, entspricht dies einer Tagesdosis von bis zu 27,1 mg Atropin je Tier und Tag und 34,4 mg Scopolamin je Tier und Tag. Wird der gesetzlich festgelegte Gewichtsanteil von 1/1000 für Samen und Früchte auf alle Pflanzenbestandteile von *Datura*-Arten angewendet, kann unter Beachtung der

TABELLE 4: Literaturangaben zu Scopolamin zur Bewertung nach der Methode Haywood et al. (1990)

Studie	Tierzahl	Tagesdosis	Dosierungsschema	Cmax Urin
Respondek et al. (2006)	5	2 mg	Dosis aufgeteilt auf 2 Einzelgaben für 3 Tage	50 ng/ml
Respondek et al. (2006)	5	5 mg	Dosis aufgeteilt auf 2 Einzelgaben für 3 Tage	220 ng/ml
Bonnaire et al. (2008)	2	10 mg	1 x tägl. für 2 Tage	140 ng/ml
Galey et al. (1996)	1	2,04 mg	Einmalig	113 ng/ml
Galey et al. (1996)	1	0,01 mg	Einmalig	25 ng/ml
Galey et al. (1996)	1	15,3 mg	Einmalig	602 ng/ml
Galey et al. (1996)	1	3,74 mg	Einmalig	385 ng/ml

zitierten Daten eine noch größere Menge von bis zu 59,1 mg Atropin je Tier und Tag bzw. 45,3 mg Scopolamin je Tier und Tag aufgenommen werden.

Das IRL für Atropin von 60 ng/ml Urin wurde in den in Tabelle 3 aufgelisteten Studien nicht überschritten. Die maximal gemessene Urinkonzentration von 25 ng/ml wurde bei einer Menge von 10 mg je Tier und Tag erreicht.

Das IRL für Scopolamin von 60 ng/ml wird bei Interpolation auf der ermittelten Regressionsgerade bei einer Dosis ab 0,56 mg Scopolamin je Tier und Tag überschritten. Die erste Überschreitung des IRL in den in Tabelle 4 angegebenen Daten wurde bei einer Dosis von 2,04 mg mit einer maximalen Urinkonzentration von 113 ng/ml Urin gemessen.

Diskussion

Nachweisgrenzen für Stoffe, die als Futterinhaltsstoffe oder Futtermittelkontaminanten von Pferden aufgenommen werden können, sollen ein Instrument zur Unterscheidung zwischen dem missbräuchlichen Einsatz der Substanzen zum Zwecke des Dopings und der ungewollten, oft zufälligen Aufnahme geringer Mengen dieser Stoffe mit dem Futter sein (IFHA, 2014). Diese Unterscheidung ist von großer Bedeutung, da jeder Verstoß gegen die Anti-Doping-Regularien für den Betroffenen zu weitreichenden Konsequenzen führen kann. Dies können z.B. Wettkampfsperren (Pheasant, 2016), Aberkennung sportlicher Erfolge oder Zahlung von Strafgeldern (FEL, 2008) sein. Verantwortlichen Personen sollen gemäß dem juristischen Prinzip *nulla poena sine culpa* nicht für Sachverhalte bestraft werden, bei denen sie selbst keine Schuld trifft. Gleichzeitig muss sichergestellt werden, dass das Doping im Pferdesport effektiv bekämpft werden kann und durch Grenzwerte und Nachweisgrenzen keine Regelungslücken entstehen, die von Personen mit unlauteren Absichten ausgenutzt werden können. Die hierfür geltenden Regularien sollten daher eine möglichst solide wissenschaftliche Grundlage besitzen.

In der hier durchgeführten Arbeit wurde mithilfe der Literatursammlung versucht, alle öffentlich zugänglichen Informationen zu finden, die für eine wissenschaftliche Validierung der IRL für Atropin und Scopola-

min verwendbar sind. Dabei konnten jedoch nur Studien berücksichtigt werden, die in deutscher oder englischer Sprache verfasst waren und die in einer der verwendeten Literaturdatenbanken verzeichnet waren. Trotz der großen Zahl der insgesamt betrachteten Studien und des verwendeten systematischen Ansatzes kann nicht ausgeschlossen werden, dass ggf. noch weitere relevante Daten zur Problematik existieren. Die in dieser Arbeit gefundenen Studien ermöglichten eine wissenschaftliche Validierung nur nach der Methode von Haywood et al. (1990) und somit lediglich anhand einer der vier prinzipiell beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Screening-Limits und Grenzwerten. Insbesondere das Fehlen jeglicher Daten zu einer Dosis-Effekt-Beziehung für beide Wirkstoffe verhindert Aussagen zu mit bestimmten Plasma- und Urin-Konzentrationen korrespondierenden pharmakologischen Effekten. Die in den letzten Jahren (z.B. Machnik et al., 2016; Tabbert, 2015) bevorzugte Methode nach Lassourd und Toutain (2002) zur Festlegung irrelevanter Urin- und Plasmakonzentrationen sowie die Methode nach Tobin et al. (1999) konnten aufgrund des Mangels der hierfür benötigten Daten somit nicht zur Validierung herangezogen werden. Die nach der Methode von Haywood et al. (1990) durchgeführte Analyse beruht aufgrund der wenigen zur Verfügung stehenden Untersuchungen auf einer eingeschränkten Datenbasis. Eine statistische Auswertung konnte für Scopolamin, nicht aber für Atropin, vorgenommen werden. Für Scopolamin wurde eine statistisch signifikante Regressionsgerade für die nach der Aufnahme definierter Scopolamin-Mengen maximal auftretenden Urin-Konzentrationen errechnet. Da die zitierten Studien von Respondek et al. (2006) und Bonnaire et al. (2008) leider keine individuellen Tierdaten, sondern nur den in der jeweiligen Untersuchungsgruppe gemessenen Konzentrationsbereich berichten, konnte keine statistische Wichtung auf Basis der unterschiedlichen Tierzahlen der Versuche vorgenommen werden. Die aus diesen Studien entnommenen maximalen Urinkonzentrationen gingen deshalb in die Berechnungen mit der gleichen Wichtung wie die von Galey et al. (1996) bei Einzeltieren gewonnenen Daten ein. Bei der Datenauswertung wurden außer der verabreichten Tagesdosis viele bekannten Einflussfaktoren wie z.B. der pH-Wert des Urins, das Gewicht und Geschlecht der Tiere, das spezifische Gewicht des Urins und ggf. vorhandene Rasseunterschiede auf die Urinkonzentration nicht berücksichtigt (Tobin et al., 2013). Aus diesem Grund wurde nur eine schwache Korrelation zwischen den beiden Parametern erwartet. Trotz dieser Tatsache beschreibt die Regressionsgerade allein auf Basis der aufgenommenen Scopolamin-Menge mit einem R^2 von 0,638 eine überraschend deutliche Korrelation zur gemessenen maximalen Urin-Konzentration. Dies bedeutet, dass ca. 63,8 % der Varianz der maximalen Scopolaminkonzentration im Urin durch die verabreichte Scopolamin-Tagesdosis erklärt werden können. Die verbleibenden 36,2 % der Varianz werden durch andere Faktoren bestimmt, für die oben Beispiele genannt wurden. Dieser Ansatz ermöglicht die Abschätzung erwarteter maximaler Scopolamin-Konzentrationen im Urin nach oraler Aufnahme von Scopolamin mittels Interpolation und wird hier erstmalig vorgestellt.

Trotz der bestehenden Einschränkungen ist eine Bewertung der IRL auf Grundlage der hier erarbeiteten Daten hinsichtlich ihrer Zweckmäßigkeit zur Verhin-

derung positiver Dopingbefunde durch Aufnahme von kontaminiertem Futter durch Pferde möglich. Das IRL für Atropin von 60 ng/ml Urin wurde in den oben dargestellten Studien auch bei zum Teil wiederholter Verabreichung von bis zu rund 55 % der maximal mit EU-rechtskonformem Futter aufnehmbaren Tagesdosis höchstens zu ca. 40 % ausgeschöpft. Die in den experimentellen Studien gemessenen Werte überschreiten aufgrund der dort durchgeführten Verabreichung der Tagesdosis in einer einmaligen oder zweimaligen Gabe wahrscheinlich die Maximalkonzentrationen, welche bei einer schrittweisen, protrahierten Aufnahme von kontaminiertem Futter unter Praxisbedingungen zu erwarten wären. Eine Kumulation scheint in Anbetracht der von Galey et al. (1996) berichteten Urin-Halbwertszeit von Atropin von 1,7 h nur von geringer Relevanz zu sein. Das IRL der IFHA von 60 ng/ml Atropin im Urin kann auf Grundlage der vorhandenen Daten als geeignet beurteilt werden, um positive Dopingbefunde durch die Aufnahme von im rechtlich zulässigen Rahmen kontaminiertem Futter durch Sportpferde zu vermeiden. Keine Aussage kann darüber getroffen werden, ob diese Urinkonzentrationen einen bestehenden pharmakologischen Effekt nach therapeutischer Anwendung, z.B. lokal am Auge, ausschließen können oder nicht. Hierzu sind weitere experimentelle Untersuchungen notwendig.

Im Gegensatz zu Atropin wurde das IRL der IFHA für Scopolamin von 60 ng/ml Urin in den vorhandenen Studien mehrfach überschritten (Tabelle 4). Diese Überschreitungen traten bereits sehr deutlich bei Mengen auf, die nur 6 % bzw. 4,5 % der Scopolamin-Menge entsprechen, die maximal mit EU-rechtskonformen Futter von Pferden täglich aufgenommen werden kann. Unter Verwendung der ermittelten Regressionsgerade ist mit einer Überschreitung des IRL ab einer Aufnahme von 1,6 bzw. 1,2 % dieser Menge zu rechnen. Bei der Aufnahme ähnlicher Mengen von Scopolamin und Atropin treten also deutlich größere maximale Urinkonzentrationen von Scopolamin auf. Da beide Alkaloide im Futter in Konzentrationen ähnlicher Größenordnung auftreten können, erscheint das IRL für Scopolamin somit deutlich zu niedrig gewählt zu sein. Es ist auf Grundlage der hier akkumulierten Literaturdaten nicht geeignet, um positive Dopingbefunde bei Sportpferden nach der Aufnahme von im rechtlich zulässigen Rahmen mit Scopolamin kontaminiertem Futter zu verhindern. Ein IRL, welches dieser Anforderung entsprechen soll, müsste mindestens um den Faktor zehn höher gewählt werden. In Anbetracht der bei klinisch manifesten Scopolamin-Intoxikationen gemessenen Urin-Konzentrationen von 10.000 ng/ml Urin (Brewer et al., 2014) erscheint die Größenordnung dieses Vorschlags nicht zu hoch gewählt zu sein. Aufgrund der fehlenden Daten zu bei der Anwendung von Scopolamin als Arzneimittel beim Pferd auftretenden Urin-Konzentrationen kann auch hier keine Aussage dazu getroffen werden, welcher Grenzwert geeignet wäre, um eine mögliche pharmakologische Wirkung von Scopolamin auszuschließen. Diese Erkenntnis deutet auf ein grundsätzliches Problem bei der Festlegung von IRLs im Pferdesport hin. Anspruch der Anti-Doping-Regularien im Pferdesport muss stets sein, dass kein Pferd an einem Turnier teilnehmen darf, welches unter der Wirkung verbotener pharmakologisch aktiver Substanzen steht. Aus diesem Grund sind Atropin und Scopolamin bei den großen Pferdesportverbänden

wie z.B. der FEI (2016c) und der Deutschen Reiterlichen Vereinigung FN (2012) im Wettkampf verboten. Wie aus den Untersuchungen von Galey et al. (1996) und Brewer et al. (2014) hervorgeht, ist ein pharmakologischer Effekt nach systemischer Aufnahme von Atropin und Scopolamin bei Urinkonzentrationen in der Größenordnung des jeweiligen IRL beim Pferd nicht zu erwarten. Dies gilt jedoch wahrscheinlich nicht für pharmakologische Effekte bei lokaler Anwendung beider Stoffe. Für das im klinischen Einsatz häufig verwendete Atropin konnten Davis et al. (2003) nach einmaliger okulärer Applikation von 2 mg Atropin in Form von Augentropfen eine für über 14 Tage andauernde Mydriasis nachweisen, die z.B. für die Therapie der Uveitis klinisch genutzt werden kann (Sandmeyer et al., 2013). Die lange Wirkdauer wird von den Autoren auf eine Bindung von Atropin an Melanin-Pigmente in der Iris zurückgeführt, aus welcher der Wirkstoff nur langsam abgegeben wird. Aufgrund der geringen benötigten Dosis, der sehr langen lokalen Wirkungsdauer und der kurzen Halbwertszeit von Atropin besteht die Möglichkeit, dass die Urinkonzentration von Atropin trotz der bestehenden lokalen Wirkung deutlich unterhalb des IRLs liegt. Ein Pferd, bei dem dies der Fall wäre, könnte somit bei einer Doping-Probe unentdeckt bleiben. Obwohl hierzu beim Pferd keine Studien existieren, ist ein ähnliches Problem für Scopolamin nicht auszuschließen. Die Einführung von IRLs für Stoffe, die auch ohne systemisch wirksame Plasmakonzentrationen und die damit korrespondierenden Urinkonzentrationen lokale Effekte erzielen können, bedingt die Gefahr, dass ein regelwidriger Einsatz bei Anti-Doping-Kontrollen unentdeckt bleibt. Um die prinzipiell begrüßenswerte Zielstellung der IRLs erreichen zu können ohne gleichzeitig eine ungewollte Regelungslücke zu schaffen, sollte daher nach Alternativmethoden gesucht werden. Ein vielversprechender Ansatz hierfür kann die Untersuchung des Urins auf Begleitalkaloide und deren Metaboliten sein. Für *Datura stramonium* werden von Soni et al. (2012) 46 bekannte Begleitalkaloide beschrieben, die neben den Hauptalkaloiden Atropin und Scopolamin in dieser Pflanzenart vorkommen. Paterson et al. (2005) beschreibt am Beispiel des Morphins, wie unter Beachtung typischer Begleitalkaloide relativ sicher ermittelt werden kann, ob im Urin von Menschen nachgewiesenes Morphin aus der Anwendung von Arzneimitteln oder aus anderen Quellen wie z.B. Mohnsamen stammt. Obwohl diese Methode erheblich durch die natürlichen Schwankungen der relativen Anteile der Alkaloide in Pflanzen erschwert wird (Jakabova et al., 2012), könnte Sie besser zur Doping-Kontrolle geeignet sein als die Festlegung pauschaler IRLs.

Unabhängig von dieser diskutierten Problematik zeigt unsere Arbeit trotz geringer Datenlage, dass das IRL von Atropin offenbar in angemessener Höhe festgelegt wurde um den damit verbundenen Zweck zu erreichen. Im Gegensatz dazu ließ sich das IRL von Scopolamin nicht als wissenschaftlich valide bestätigen.

Conflict of interest

Es bestehen keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder anderen persönlichen Interessen an einem Produkt, Service und/oder einer Firma, welche die in diesem Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

Literatur

- Alitalo I, Vainio O, Kaartinen L, Raekallio M (1986):** Cardiac effects of atropine premedication in horses sedated with detomidine. *Acta Vet Scand Suppl* 82: 131–136.
- Badoud F, Guillaume D, Boccard J, Grata E, Saugy M, Rudaz S, Veuthey J-L (2011):** Analytical aspects in doping control: challenges and perspectives. *Forensic Sci Int* 213: 49–61.
- Bonnaire Y, Maciejewski P, Popot MA, Pottin S (2008):** Feed contaminants and anti doping tests. In: Saastamoinen MT, Martin-Rosset W (Hrsg.), *Nutrition of the exercising horse*. EWEN - European Workshop on Equine Nutrition, held in Forssa, Finland, 23rd-25th July, 2008. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 399–415.
- Brewer K, Dirikolu L, Hughes CG, Tobin T (2014):** Scopolamine in racing horses: trace identifications associated with dietary or environmental exposure. *Vet J* 199: 324–331.
- Chen H, Chen Y, Du P, Han F, Wang H, Zhang H (2006):** Sensitive and specific liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for atropine and its eleven metabolites in rat urine. *J Pharm Biomed Anal* 40: 142–150.
- Chen H, Chen Y, Wang H, Du P, Han F, Zhang H (2005):** Analysis of scopolamine and its eighteen metabolites in rat urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 67: 984–991.
- Davis JL, Stewart T, Brazik E, Gilger BC (2003):** The effect of topical administration of atropine sulfate on the normal equine pupil: influence of age, breed and gender. *Vet Ophthalmol* 6: 329–332.
- DIMDI (2017):** Arzneimittelinformationssystem AMIS. Verfügbar unter: www.dimdi.de (Zuletzt geprüft am 08.02.2017).
- Dugan GM, Gumbmann MR, Friedman M (1989):** Toxicological evaluation of jimson weed (*Datura stramonium*) seed. *Food Chem Toxicol* 27: 501–510.
- FEI (Fédération Equestre Internationale) (2008):** Decision of the FEI Tribunal dated 22 December 2008. Verfügbar unter: <https://inside.fei.org/system/files/23%20-%20CAMIRO%20-%20Tribunal%20Final%20Decision%20-%2022%20dec%2008.pdf> (Zuletzt geprüft am 06.03.2017).
- FEI (Fédération Equestre Internationale) (2015):** Case Status Table - Horses 14.08.2015. Verfügbar unter: https://www.fei.org/system/files/Case%20Status%20Table%20Horses_0.pdf (Zuletzt geprüft am 06.02.2017).
- FEI (Fédération Equestre Internationale) (2016a):** Decision of the FEI Tribunal dated 08 February 2016. Verfügbar unter: http://www.fei.org/system/files/Case_2015_-_CM06_-_OFFSHORE%20D%27AMAURY%20-Final_Tribunal_Decision_-_8%20February%202016.pdf (Zuletzt geprüft am 06.02.2017).
- FEI (Fédération Equestre Internationale) (2016b):** Decision of the FEI Tribunal dated 19 April 2016. Verfügbar unter: <http://www.fei.org/system/files/Case%202015-CM04%20-%20WAKANA%20-%20Final%20Tribunal%20Decision%20-%2019%20April%202016%20.pdf> (Zuletzt geprüft am 11.01.2017).
- FEI (Fédération Equestre Internationale) (2016c):** Equine Anti-Doping and Controlled Medication Regulations 2016. Verfügbar unter: https://inside.fei.org/sites/default/files/2016%20EAD-CMRs%20-%20Effective%201%20January%202016%20-%20Clean%20Version_0.pdf (Zuletzt geprüft am 07.01.2017).
- FN (Deutsche Reiterliche Vereinigung e.V.) (2012):** Listen der verbotenen Substanzen sowie der verbotenen Methoden. Verfügbar unter <https://www.pferd-aktuell.de/fairersport/listen-der-verbotenen-substanzen-und-methoden/listen-der-verbotenen-substanzen-und-methoden> (06.05.2013).

- Foley P (2006):** *Duboisia myoporoides*. The Medical Career of a Native Australian Plant. *Hist Rec Aust Sci* 17: 31.
- Galey FD, Holstege DM, Francis T, Hyde W, Jack R (1996):** Residues of *Datura* species in horses. Proceedings of the 11th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians: 333–337.
- Griffin WJ, Lin G (2000):** Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry* 53: 623–637.
- Haywood PE, Teale P, Moss MS (1990):** The excretion of theobromine in Thoroughbred racehorses after feeding compounded cubes containing cocoa husk –establishment of a threshold value in horse urine. *Equine Vet J* 22: 244–246.
- Hertzsch R, Emmerich IU, Lachenmeier DW, Sproll C, Monakhova YB, Aboling S, Bachmann U, Vervuert I (2015):** Alimentäre Aufnahme von Opioid-Alkaloiden durch Pferde. Gefahren durch mohnhaltige Futtermittel. *Tierärztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 43: 35–43.
- Ho ENM, Chan GHM, Wan TSM, Curl P, Riggs CM, Hurley MJ, Sykes D (2015):** Controlling the misuse of cobalt in horses. *Drug Test Anal* 7: 21–30.
- IFHA (2014):** Recommendations for Control of Feed Contaminants and Environmental Substances. Verfügbar unter: http://www.ifhaonline.org/resources/Feed_Contaminants_Environmental_Substances_Guidelines.pdf (Zuletzt geprüft am 14.03.2017).
- Jakabova S, Vincze L, Farkas A, Kilar F, Boros B, Felinger A (2012):** Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography-mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *J Chromatogr A* 1232: 295–301.
- Jirschitzka J, Schmidt GW, Reichelt M, Schneider B, Gershenzon J, D’Auria JC (2012):** Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 10304–10309.
- John H, Binder T, Höchstetter H, Thiermann H (2010):** LC-ESI MS/MS quantification of atropine and six other antimuscarinic tropane alkaloids in plasma. *Anal Bioanal Chem* 396: 751–763.
- Kietzmann M, Kluge K (2016):** Doping im Pferdesport. In: Brehm W, Gehlen H, Ohnesorge B, Wehrend A (Hrsg.), *Handbuch Pferdepraxis*. Enke Verlag 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart, 1186–1206.
- Kietzmann M, Löscher W (1990):** Besonderheiten der Pharmakokinetik beim Jungtier. *Berl Munch Tierärztl Wochenschr* 103: 277–282.
- Lakhani KH, Lambert M, Sluyter F, Devolz R, Maylin G, Higgins AJ (2004):** Estimation of the critical threshold value for presence of salicylic acid in the urine of thoroughbred horses. Proceedings of the 15th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians: 67–77.
- Lassourd V, Toutain PL (2002):** Pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to assess irrelevant plasma or urine drug concentrations in postcompetition samples for drug control in the horse. *Equine Vet J* 34: 242–249.
- Löscher W, Richter A, Potschka H (2014):** Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Enke, 9., aktualisierte und erw. Aufl., Stuttgart.
- Machnik M, Kaiser S, Koppe S, Kietzmann M, Schenk I, Due M, Thevis M, Schanzer W, Toutain P-L (2016):** Control of methylxanthines in the competition horse: pharmacokinetic/pharmacodynamic studies on caffeine, theobromine and theophylline for the assessment of irrelevant concentrations. *Drug Test Anal*, doi: 10.1002/dta.2097, 04.November 2016.
- Miraldi E, Masti A, Ferri S, Barni Comparini I (2001):** Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia* 72: 644–648.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG (2009):** Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS medicine* 6: e1000097.
- Paterson S, Lintzeris N, Mitchell TB, Cordero R, Nestor L, Strang J (2005):** Validation of techniques to detect illicit heroin use in patients prescribed pharmaceutical heroin for the management of opioid dependence. *Addiction (Abingdon, England)* 100: 1832–1839.
- Pheasant J (2016):** Feed, supplements and contamination risks under FEI Rules: Insight from the Guerdat and Bichsel decisions. *Equine Vet J* 48: 135–137.
- Plumb DC (2015):** Plumb’s veterinary drug handbook. PharmaVet Inc; Distributed by John Wiley & Sons, Inc, Eighth edition, Stockholm, Wisconsin, Ames, Iowa.
- Respondek F, Lallemand A, Julliard V, Bonnaire Y (2006):** Urinary excretion of dietary contaminants in horses. *Equine Vet J* 38: 664–667.
- Sandmeyer LS, Bauer BS, Grahn BH (2013):** Diagnostic ophthalmology. Anterior uveitis of the right eye. *Can Vet J* 54: 897–898.
- Soni P, Siddiqui AA, Dwivedi J, Soni V (2012):** Pharmacological properties of *Datura stramonium* L. as a potential medicinal tree. An overview. *Asian Pac J Trop Biomed* 2: 1002–1008.
- Tabbert N (2015):** Nachweis- und Karenzzeiten sowie In-vitro-Untersuchung zur Wirkung Nicht-steroidaler Antiphlogistika beim Pferd. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Diss.
- Tobin T, Dirikolu L, Brewer K, Hughes CG (2013):** A clinician’s guide to factors affecting withdrawal times for equine therapeutic medications. *Vet J* 198: 313–321.
- Tobin T, Harkins JD, Sams RA (1999):** Testing for therapeutic medications: analytical/pharmacological relationships and limitations’ on the sensitivity of testing for certain agents. *J Vet Pharmacol Ther* 22: 220–233.
- Williams MM, Spiess BM, Pascoe PJ, O’Grady M (2000):** Systemic effects of topical and subconjunctival ophthalmic atropine in the horse. *Vet Ophthalmol* 3: 193–199.

Korrespondenzadresse:

Robert Hertzsch
 Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
 Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
 An den Tierkliniken 15
 04103 Leipzig
 robert.hertzsch@uni-leipzig.de