

# Doping-Analytik

W. Schänzer und M. Thevis

## 1 Einleitung

Im Jahr 1967, nach dem spektakulären Todesfall von *Tom Simpson* bei der Tour de France, der in Zusammenhang mit der Einnahme von Amphetamin stand, wurden vom Internationalen Radsportbund (UCI) und dem Internationalen Olympischen Komitee (IOC) die ersten Anti-Doping-Regeln aufgestellt. Diese Regeln besagen, dass Doping im Sport verboten ist.

Damit die Regeln eingehalten werden, bedarf es einer Überprüfung. Dieses erfolgt durch die sogenannte Dopingkontrolle, bei der ein Athlet eine Urin- bzw. eine Blutprobe abgeben muss, die bezüglich der Anwesenheit von Doping-Substanzen analysiert wird. Gelingt der Nachweis eines oder mehrerer verbotenen Wirkstoffes bzw. einer verbotenen Methode, so wird der Athlet entsprechend den Regeln sanktioniert. Diese Sanktion kann von einer Disqualifikation bis hin zu einer zweijährigen Strafe führen.

Die spektakulären Vorkommnisse bei der Tour de France 1998 führten zu neuen Initiativen. Das IOC reagierte darauf mit einer Weltkonferenz zur Verbesserung des Anti-

Tab. 1: Dopingliste der Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA), Stand 1.1.2005

<b>I. Verbotene Substanzen und Methoden während und außerhalb des Wettkampfes</b>	
S1	Anabole Wirkstoffe Anabol Androgene Steroide (AAS) a) exogene AAS b) endogene AAS Andere anabole Wirkstoffe
S2	Peptidhormone
S3	$\beta_2$ -Agonisten
S4	Substanzen mit anti-estrogener Wirkung
S5	Diuretika u. a. Maskierende Substanzen
M1	Verbesserung des Sauerstofftransports
M2	Manipulationen
M3	Gendoping
<b>II. Verbotene Substanzen nur während des Wettkampfes</b>	
S6	Stimulanzien
S7	Narkotika
S8	Cannabinoide
S9	Glucocorticosteroide
<b>III. Verbotene Substanzen in speziellen Sportarten</b>	
	Alkohol Beta-Blocker
<b>IV. Spezifizierte Substanzen</b>	
Substanzen unter diesem Punkt können aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit und weiten Verbreitung in medizinischen Produkten u. U. unbeabsichtigt verwendet werden. Ein Dopingverstoß kann in diesem Fall zu einer reduzierten Sanktion führen. z. B. Ephedrin, Cannabinoide, Inhalierte $\beta_2$ -Agonisten, alle Beta-Blocker, alle Corticosteroide, Alkohol	

Doping-Kampfs im Februar 1999. Auf dieser Konferenz wurde die Bildung einer Welt Anti-Doping Agentur (WADA, World Anti-Doping Agency) beschlossen.

## 2 Doping-Definition

Damit die Anti-Doping-Regeln angewendet werden können, bedarf es einer genauen Definition des Begriffes Doping.

Was ist Doping? Ist der Genuss einer Tasse Kaffee oder die Anwendung eines Asthmamittels bereits Doping? In der Gesellschaft wird der Begriff anders verstanden als im Leistungssport. Hier werden beispielsweise Begriffe wie Medikamentenmissbrauch, „erlaubtes“ und „nicht erlaubtes“ Doping benutzt, die für die Beurteilung eines Dopingverstoßes wenig hilfreich sind.

Das IOC hatte bereits sehr früh eine pragmatische Definition von Doping gegeben.

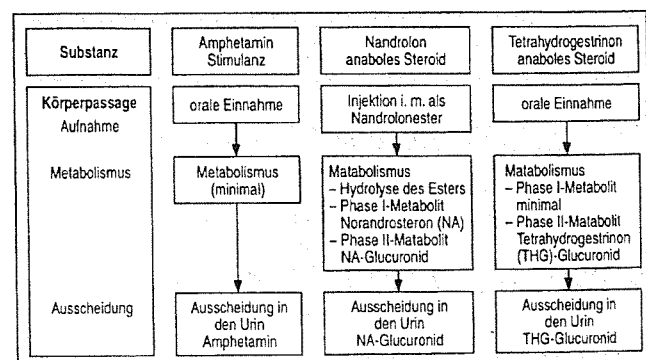
Diese Definition besagte: Doping ist verboten. Doping ist die Anwendung von verbotenen Wirkstoffen bzw. verbotenen Methoden. Eine Dopingliste führte die verbotenen Wirkstoffgruppen und verbotenen Methoden auf.

Die seit dem 1.1.2005 gültige Dopingliste der WADA ist in Tab. 1 zusammengestellt.

## 3 Doping-Analytik

Für den Nachweis eines Doping-Verstoßes wird eine Urin- bzw. Blutprobe des Athleten auf verbotene Wirkstoffe bzw. auf die Anwendung einer verbotenen Methode untersucht. Die angewendeten Methoden müssen zuverlässig und reproduzierbar sein. Die Identifizierung einer verbotenen Substanz muss nach anerkannten wissenschaftlichen Methoden erfolgen, da das Ergebnis einer juristischen Überprüfung standhalten muss.

Abb. 1: Körperpassage von Dopingsubstanzen am Beispiel von Amphetamin, Nandrolon und Tetrahydrogestrinon (THG); zum Stoffwechsel von Nandrolon siehe auch Abb. 3



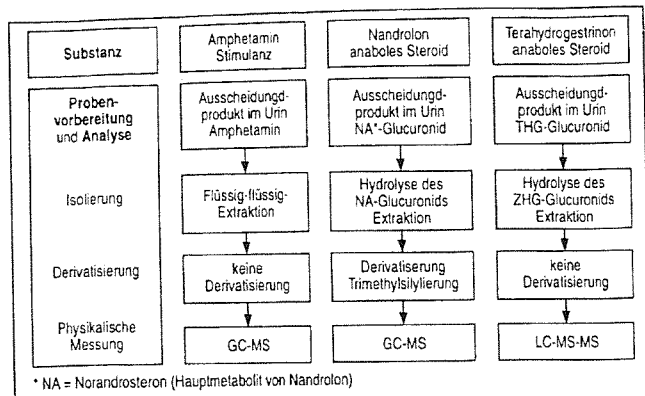


Abb. 2: Nachweisverfahren im Überblick am Beispiel von Amphetamin, Nandrolon und Tetrahydrogestrinon (THG); NA = Norandrosteron (Hauptmetabolit von Nandrolon)

In den Fällen, wo die missbräuchlich angewendete Doping-Substanz im menschlichen Organismus vollständig verstoffwechselt wird und deshalb im Urin nicht nachweisbar ist, kann auch sein Stoffwechsel-Abbauprodukt (Metabolit) bestimmt werden.

Abb. 1 fasst die Vorgänge bei der Körperpassage einer Doping-substanz im Vergleich für das Stimulanz Amphetamin und für die anabolen Steroidhormone Nandrolon und Tetrahydrogestrinon (THG) zusammen. Während Amphetamin in großen Mengen unverändert in den Urin eliminiert wird, muss bei den anabolen Steroidhormonen ihr Metabolismus berücksichtigt werden (siehe auch Probenvorbereitung).

Das Vorgehen bei der Dopinganalytik im Labor lässt sich in zwei Schritte gliedern:

### 3.1 Probenvorbereitung

Das Vorgehen bei der Probenvorbereitung ist in Abb. 2 im Überblick für die Substanzen Amphetamin (Stimulanz), Nandrolon und Tetrahydrogestrinon (anabol androgene Steroide) zusammengefasst. Dabei müssen die Kenntnisse über den Stoffwechsel der jeweiligen Verbindung berücksichtigt werden (s. Körperpassage in Abb. 1). Amphetamin wird überwiegend unverändert in den Urin ausgeschieden, so dass die Analytik Amphetamin nach Isolierung aus dem Urin bestimmt. Anders ist die Probenvorbereitung bei den Steroiden Nandrolon und Tetrahydrogestrinon. Nandrolon z. B. (Abb. 3) wird im menschlichen Organismus umfangreich verstoffwechselt, wobei das Steroid im Phase I Metabolismus durch Leberenzyme verändert wird (Metabolit: Norandrosteron). Hierbei sind drei Reaktionen zu berücksichtigen: 1. Reduktion der Doppelbindung in Position C-4,5 zu den beiden Isomeren mit 5 $\alpha$ - und 5 $\beta$ -Konfiguration am Steroidgrundgerüst (der analytische Nachweis beschränkt sich zur Zeit auf das 5 $\alpha$ -Isomere), 2. Reduktion der 3-Keto-Gruppe zu einer 3 $\alpha$ -Hydroxygruppe und 3. Oxidation der 17 $\beta$ -Hydroxyfunktion zur 17-Ketogruppe. Im folgenden Phase II Metabolismus erfolgt eine Konjugation der 3 $\alpha$ -Hydroxygruppe mit Glucuronsäure und das entsprechende Konjugat (Norandrosteron-3-glucuronid) wird in den Urin ausgeschieden. Die Analytik weist deshalb nicht Nandrolon selber, sondern dessen Metabolit (Norandrosteron) nach. Dazu wird u.a. das im Urin ausgeschiedene Konjugat hydrolysiert, das heißt die Glucuronsäure wird vom Steroid abgetrennt. Dieses ist notwendig, da das Norandrosteron-glucuronid selber viel schlechter analysiert werden kann als das nicht konjugierte Norandrosteron.

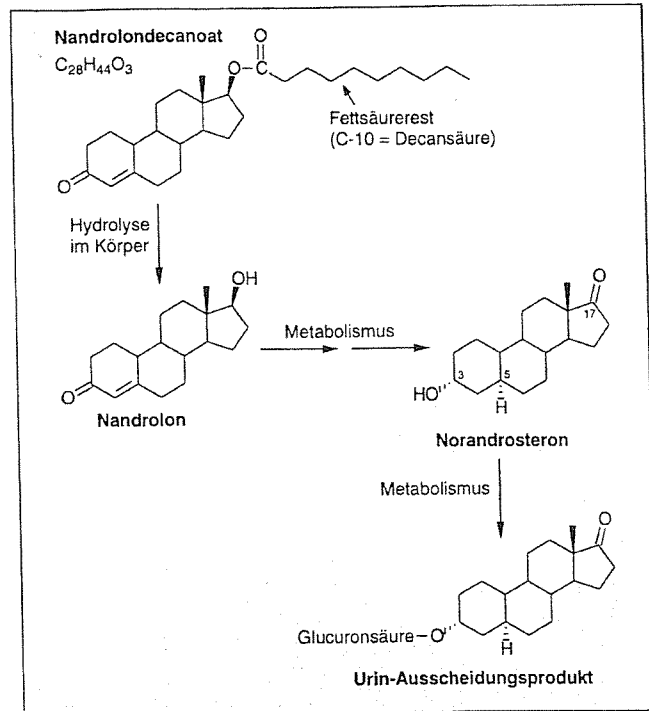


Abb. 3: Stoffwechsel von Nandrolon; Medikament: Nandrolondecanoat Applikationsart: intra-muskuläre (i. m.) Injektion

Im Gegensatz zu Nandrolon ist der Phase I Metabolismus von Tetrahydrogestrinon (THG) vernachlässigbar und nur die Konjugation von THG mit Glucuronsäure muss berücksichtigt werden.

Im Rahmen der Probenvorbereitung werden Substanzen aus der Urinprobe isoliert, um sie für die analytische Messung vorzubereiten. Störsubstanzen, die die Analyse beeinflussen können, werden dabei entfernt bzw. abgereichert. Natürlich gilt hier die Faustregel, je konzentrierter eine Substanz in der Urinprobe vorhanden ist, umso einfacher ist der Nachweis. Für eine effektive Dopingbekämpfung müssen die Kontrolllaboratorien entsprechende Nachweisgrenzen erreichen. So gilt z. B. für Stimulanzien wie Amphetamin, dass eine Nachweisgrenze von 100 ng/ml (ng = 10<sup>-9</sup>g) Urin gewährleistet werden muss. Für anabole Steroide müssen Nachweisgrenzen bis zu 1 ng/ml Urin erreicht werden.

Um Nachweisgrenzen von 1ng/ml für anabol androgene Steroidhormone gewährleisten zu können, werden aus der Urinmatrix isolierte Steroide sowie deren Metaboliten derivatisiert. Die Derivatisierung ist allerdings nur notwendig, wenn mit dem analytischen Verfahren der Gaschromatographie gearbeitet wird. Polare Funktionen wie Amino-, Hydroxy- und Ketogruppen zeigen Wechselwirkungen mit Silanolgruppen der Trennphasen der verwendeten GC-Trennsäulen, womit hohe Adsorptionseffekte verbunden sind, die die Chromatographie verschlechtern. Als Folge können die notwendigen Nachweisgrenzen nicht erreicht werden. Im Rahmen einer Derivatisierung werden deshalb polare Funktionen wie Hydroxy- und Ketogruppen in Trimethylsilylether bzw. Trimethylsilylenolether überführt, um Adsorptionseffekte zu minimieren. Abb. 4 zeigt die Derivatisierung von Norandrosteron (Nandrolonmetabolit) zum bis-Trimethylsilylderivat, wobei die Hydroxygruppe in C-3-Position direkt und die Ketogruppe in C-17-Position unter Verwendung des Katalysators Trimethylsilylan (TMS) derivatisiert werden. Das generierte Derivat zeigt im anschließenden Analyseverfahren (Gaschromatogra-

phie-Massenspektrometrie) ein verändertes Massenspektrum (Abb. 5B) und vor allem ein symmetrisches Signal während der Gaschromatographie (Abb. 6B).

Wichtig für die Identifizierung einer Substanz ist, dass die aus dem Urin isolierte Verbindung hinsichtlich der Retentionszeit im GC-MS Chromatogramm und des Massenspektrums mit den Daten der Referenzverbindung (ein zertifizierter Referenzstandard z. B. von Norandrosteron, der unter den gleichen Bedingungen derivatisiert und analysiert wird) übereinstimmt. Zur Überprüfung der Übereinstimmung sind analytische Kriterien festgelegt worden, womit die Aussagefähigkeit des analytischen Ergebnisses abgesichert wird. Neben der gaschromatographischen Trennung von Substanzen werden zunehmend auch flüssigkeitschromatographische Verfahren eingesetzt. Für die Flüssigkeits-

chromatographie im Rahmen der Dopinganalytik sind keine Derivatisierungen der Substanzen notwendig.

### 3.2 Analytische Messung

In der Dopinganalytik werden aktuell folgende Verfahren eingesetzt, die sich in massenspektrometrische und komplementäre Verfahren (nicht-massenspektrometrische) Verfahren einteilen lassen (Tab. 2). Für die meisten Dopingwirkstoffe wird die Massenspektrometrie als Identifizierungsverfahren angewendet. In der Regel werden die massenspektrometrischen Detektoren mit einem vorgeschalteten Trennsystem in Kombination betrieben. Dieses Trennsystem kann eine Gaschromatograph (GC) bzw. ein Flüssigkeitschromatograph (LC für liquid chromatography) sein.

Tab. 2: Übersicht der Analyseverfahren in der Dopinganalytik

Analyseverfahren		Wirkstoffe
Massenspektrometrie	Gaschromatographie/Massenspektrometrie	Anabol Androgene Steroide β <sub>2</sub> -Agonisten, Stimulanzien Narkotika, Antiöstrogene, Narkotika, Cannabinoide, Glucocorticosteroide, Beta-Blocker, Substanzen zur Verbesserung des O <sub>2</sub> -Transportes, Peptidhormone (Insulin) Manipulation
	Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie	
Komplementäre Verfahren (nicht auf Massenspektrometrie basierend)	Isoelektrische Fokussierung	EPO
	Enzym-Immuno-Assays	HGH (Wachstumshormon), HCG (Schwangerschaftshormon)
	Flow-Cytometrie	Fremdbluttransfusion
	Blutbild	Peptidhormone (EPO)
	DNA-Profilung	Manipulation

Abb. 5: EI-Massenspektrum von Norandrosteron vor (A) und nach Trimethylsilylierung (B bis TMS-Derivat)

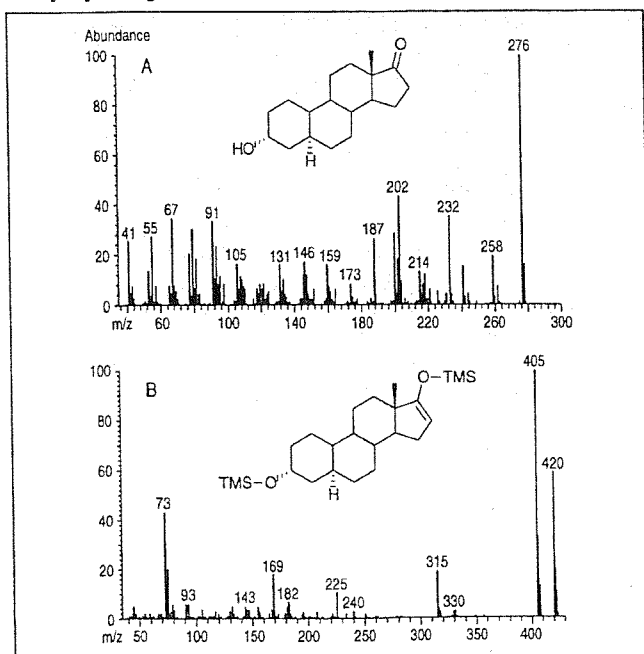
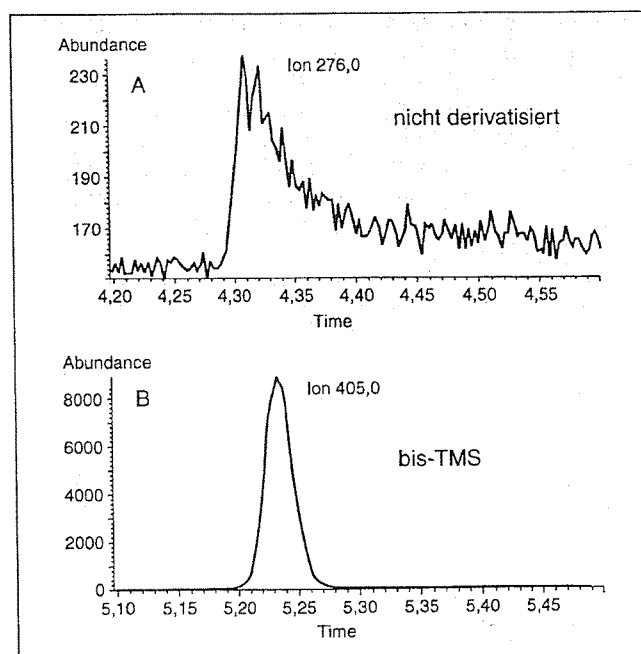
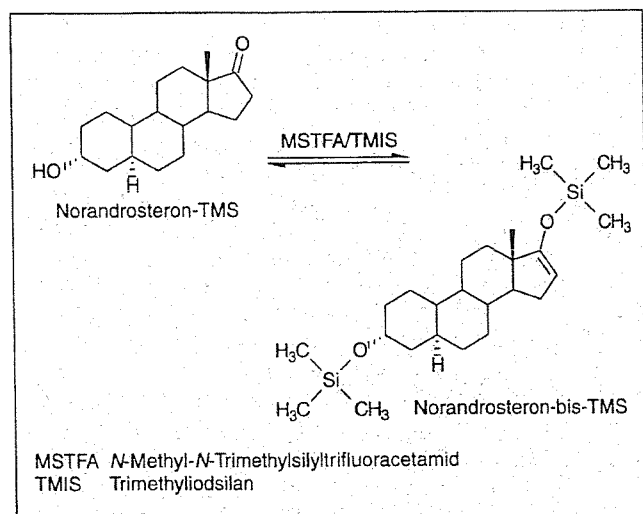


Abb. 4 (oben): Derivatisierung von Norandrosteron (Trimethylsilylierung)

Abb. 6 (unten): GC/MS-Chromatogramm von Norandrosteron vor (A) und nach Trimethylsilylierung (B) Ionenspuren der intensivsten Ionen A) 276 Molekülon des nicht derivatisierten Norandrosteron (NA) und B) 405 Molekülon minus CH<sub>3</sub> des bis-TMS Derivats



### 3.2.1 Chromatographische Trennung – Gaschromatographie (GC)

Kernstück einer GC-Trennung ist die GC-Säule. Wurden vor 30 Jahren noch kompakte Glassäulen mit einer Länge von 60–100 cm und einem Innendurchmesser von etwa 2–4 mm, die mit einem porösen Trennmateriale gefüllt waren, eingesetzt, so werden heute Kapillarsäulen verwendet. Zur Herstellung einer Kapillarsäule wird ein hohles Quarzglas (Quarzrohr) auf ca. 25–50 m Länge und einen Innendurchmesser von etwa 0,1–0,2 mm ausgezogen. Von außen ist die feine Quarzsäule mit einem Kunststoff überzogen, so dass sie stabil ist und auf einem Drahthalter mit einem Durchmesser von ca. 20 cm aufgewickelt werden kann. Die Säule selber wird in einem geschlossenen beheizbaren System betrieben und von einem inneren Trägergas (z. B. Helium) durchströmt. Daher auch der Name Gaschromatographie. Die zu analysierende Probe wird in einem organischen Lösungsmittel z. B. Methanol, Ethylacetat oder in einem Derivatisierungsmittel (z. B. MSTFA = N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid) angelöst (Volumen z. B. 50 µl) und ein Aliquot der Lösung (1–3 µl) über ein automatisches Injektionssystem bei Temperaturen um 280–300 °C in den Gasstrom auf die GC-Trennsäule eingeführt. Der GC-Ofen wird bei niedriger Anfangstemperatur betrieben und im Laufe der analytischen Messung (z. B. von 100–300 °C) hochgeheizt. Die mit dem Lösungsmittel in das System injizierten Substanzen werden im Injektionssystem zuerst verdampft und kondensieren dann auf der Trennsäule im GC-Ofen, da hier beispielsweise eine niedrigere Temperatur vorliegt (z. B. 100 °C) als im Injektionsblock. Beim Erhitzen des GC-Ofens werden die Substanzen verdampft und mit dem Gasstrom weitertransportiert. Im weiteren Verlauf werden die unterschiedlichen Komponenten der Probe aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften auf der GC-Säule getrennt. Dieses ist allerdings nur möglich, da an der Innenwand der Trennsäule eine Trennphase (Dicke etwa 0,1–0,2 µm) aufgetragen ist, die entsprechend mit den Substanzen in der Gasphase wechselwirkt. Ergebnis bei optimaler Phasenwahl ist das Verlassen der Substanz von der Säule (Elution) in Form einer symmetrischen Substanzverteilung. Im Detektor wird in Abhängigkeit von der Zeit ein entsprechendes Signal detektiert (Abb. 6, GC/MS-Chromatogramme von Norandrosteron). Die Zeit zwischen der Injektion und der Registrierung der Substanz wird als Retentionszeit einer Substanz definiert. Sie ist natürlich abhängig von vielen Parametern wie Wahl der Trennsäule, Gasdruck, Heizrate des GC-Ofens. Unter festgelegten Bedingungen ist sie jedoch konstant. Das heißt, wenn eine biologische Probe injiziert wird und beispielweise nach 5,23 min eine Substanz registriert wird, deren Massenspektrum identisch mit dem Massenspektrum von Norandrosteron (bis-TMS-Derivat) ist, dann muss bei der folgenden Injektion eines Referenzstandards von Norandrosteron (bis-TMS-Derivat), diese Verbindung die gleiche Retentionszeit aufweisen.

Vorraussetzung für die Anwendung der GC ist, dass die zu bestimmende Substanz verdampfbar ist, dass sie unter den gegebenen GC-Bedingungen stabil ist, und dass sie von dem Trennmateriale der GC-Säule nicht vollständig absorbiert wird. Letzteres ist oft der Fall, wenn eine Substanz zu viele polare Funktionen aufweist und eine Derivatisierung nicht erfolgreich ist. Hier bietet sich dann ein flüssigkeitschromatographisches Trennverfahren an, womit polare Verbindungen problemlos erfasst werden können.

### 3.2.2 Chromatographische Trennung – Flüssigkeitschromatographie (LC)

Bei der Flüssigkeitschromatographie (LC = liquid chromatography) wird im Gegensatz zur Gaschromatographie als Laufmittel kein Gas, sondern Flüssigkeiten verwendet. In der Regel werden im Rahmen der Dopinganalytik Gemische aus Wasser/Acetonitril mit Zusätzen von Säuren (z. B. mit Ameisensäure, Essigsäure) bzw. entsprechenden Pufferlösungen (z. B. Ammoniumacetat) eingesetzt. Die LC-Trennsäulen sind entsprechend der Tatsache, dass Flüssigkeiten durch die Säule geleitet werden müssen, kompakt gebaut, bestehend aus einem Stahlzylinder mit einer Länge von ca. 5 bis 25 cm bei einem Innendurchmesser von 2–4 mm. Sie müssen einem maximalen Druck von bis zu 400 bar standhalten.

Die Säulen sind vollständig mit einer Trennphase gefüllt, die entsprechend der zu bestimmenden Analyten ausgewählt werden. Für die Wirkstoffe, die im Rahmen der Dopinganalytik bestimmt werden, haben sich überwiegend Reversed Phase Säulen durchgesetzt. Dabei ist das Trennmateriale auf der Basis von Kieselgel mit n-Alkanketten (C-8 bzw. C-18-Ketten) verknüpft. Die Trennphase hat damit hohe apolare Eigenschaften und das Laufmittel wird im Laufe der chromatographischen Trennung in seiner Zusammensetzung startend mit einem hohen polaren Anteil (z. B. Wasser/Acetonitril 90:10) kontinuierlich verändert und apolarer (z. B. innerhalb von 15 min wird das Gemisch Wasser/Acetonitril kontinuierlich auf ein Verhältnis von 20:80 verändert). Entsprechend ist die zeitliche Elutionsfolge der getrennten Substanzen abhängig von der Polarität einer Verbindung. Beispielsweise wird ein Hydroxymetabolit eines anabol androgenen Steroids früher von der Trennsäule eluiert als das unveränderte Steroid.

*Vorteile der Flüssigkeitschromatographie im Vergleich zur Gaschromatographie:* Substanzen, die sehr polar sind, können optimal chromatographiert werden. Damit werden vor allem Substanzen, die thermisch nicht stabil und schwer derivatisierbar sind, für die Analytik zugänglich.

*Nachteil der Flüssigkeitschromatographie im Vergleich zur Gaschromatographie:* Die Trennleistungen der LC-Säulen sind im Vergleich zur GC zum Teil schlechter, das heißt die Signale sind breiter und damit die Nachweisgrenzen schlechter. Letzteres wird mittlerweile allerdings durch verbesserte Ionisierungstechniken und Massenanalytoren kompensiert. Für die anschließende Massenspektrometrie müssen die Substanzen gut ionisierbare Gruppen aufweisen, in der Regel konjugierte Elektronensysteme. So ist beispielsweise der Metabolit von Nandrolon Norandrosteron mit der vorliegenden C-3-Hydroxy- und C-17-Ketogruppe nur schlecht ionisierbar, während Nandrolon selber aufgrund des konjugierten Systems zwischen der Ketogruppe (C-3) und der Doppelbindung (C-4,5) (Abb. 3) eine sehr gute Ionisierbarkeit aufweist. Das Problem der Ionisierbarkeit hängt hauptsächlich von der Art der Ionenbildungstechnik ab, die in Abhängigkeit von der Trenntechnik nämlich Gaschromatographie oder Flüssigkeitschromatographie verfügbar ist.

### 3.2.3 Ionisierungsart – Elektronenstoß-Ionisation (EI)

Die Elektronenstoß-Ionisation (EI) ist die am meisten verwendete Ionisierungstechnik, die in Kombination mit der Gaschromatographie in der Doping-Analytik angewendet wird. Bei dieser Technik werden die mit der Gasphase eluierten Substanzen direkt im Massenspektrometer im Hochvakuum ionisiert. Dabei werden mittels eines Primär-

elektronenstrahls, der von einer Glühkathode bei einer Spannung von 70 V erzeugt wird, die Moleküle ionisiert (Abb. 7). Bei der EI-Ionisation wird ein Elektron aus dem zu analysierenden Molekül gestoßen, so dass eine positive Ladung aufweist. Dieses im ersten Ionisierungsprozess gebildete positive Ion wird als Molekülion ( $M^+$ ) bezeichnet. Die Ionisierungsausbeute soll bei etwa 0,0001 % liegen, was bedeuten würde, dass nur jedes 10000ste Molekül einer Substanz ionisiert wird. Das entstandene Molekülion ist aber nicht stabil, es kann entsprechend seiner Struktur mehr oder weniger stark fragmentieren (Abb. 7). Die Abbildung 7 zeigt diesen Vorgang vereinfacht, wobei das Molekül  $M$ , das nach Elektronenstoß zu  $M^+$  ionisiert wird, in die Ionen  $F1^+$  bis  $F3^+$  fragmentiert. Dabei ist dieser Fragmentierungsvorgang so zu verstehen, dass es eine statistische Verteilung der gebildeten Ionen gibt. Das gebildete Molekülion kann mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in die Fragmente  $F1^+$  bis  $F3^+$  zerfallen. Bei einer Annahme, dass alle Ionen einschließlich des Molekülions nach der Fragmentierung in einem gleichen Verhältnis vorliegen, so bedeutet dieses, dass von 1000 ionisierten Molekülen 250 Moleküle als  $M^+$  und je 250 Moleküle als  $F1^+$ ,  $F2^+$  und  $F3^+$  vorliegen.

Die Fragmentierung ist aber nicht nur substanz-, sondern auch energieabhängig. Je mehr Energie bei der Ionenerzeugung aufgewendet wird, desto größer ist auch das Fragmentierungsverhalten einer Substanz. In der Regel wird bei 70 eV ionisiert, so dass die Ergebnisse der verschiedenen im Einsatz befindlichen Massenspektrometer vergleichbar sind. Die nach Elektronenstoß-Ionisation aufgetretene Fragmentierung einer Verbindung wird im Massenspektrometer in Abhängigkeit von der Fragmentmasse und der registrierten Intensität in einem Massenspektrum dargestellt, wobei das intensivste Ion mit 100 % gesetzt wird. Natürlich kann auch das im ersten Ionisierungsansatz gebildete Molekülion das intensivste Ion sein, nämlich dann, wenn die Verbindung nach Ionisation ein ausgewiesenes stabiles System bildet. So ist zum Beispiel beim Testosteron nach Derivatisierung zum bis-TMS-Testosteron das Molekülion (Masse 432) das intensivste Ion. Bei Amphetamin, das nicht derivatisiert gemessen

wird, ist die Fragmentierung so stark, dass das Molekülion (Masse 135) mit weniger als 1 % registriert wird.

Abb. 5 zeigt das EI-Massenspektrum von Norandrosteron als bis-TMS-Derivat mit einem Molekülion von 420 und charakteristischen und intensiven Fragmentionen mit den Massen 169, 225, 315 und 405.

### 3.2.4 Ionisierungsart – Elektro-Spray-Ionisation (ESI)

Die Elektro-Spray-Ionisation wird nach flüssigkeitschromatographischer Trennung angewendet. ESI ist eine erfolgreiche Technik, womit es optimal gelingt, die zu analysierenden Substanzen vom Lösungsmittel abzutrennen. Dieses war in der Entwicklung der massenspektrometrischen Analyse nach flüssigkeitschromatographischer Trennung im Vergleich zur Massenspektrometrie in Kombination mit der Gaschromatographie die große Herausforderung. Das Problem lässt sich einfach verdeutlichen: Die massenspektrometrische Analyse einer Substanz erfolgt immer nach Ionisierung in einem Hochvakuum. Dazu muss das Laufmittel bei der Flüssigkeitschromatographie (Wasser/Acetonitril-Gemisch) bzw. bei der Gaschromatographie (Helium) abgetrennt werden. Bei der GC gelingt dieses direkt im Massenspektrometer durch ein Hochvakuum, das mittels leistungsfähiger Turbopumpen gewährleistet wird. Bei einem Gasfluss von ca 1 ml Helium pro Minute entspricht dieses einer Masse von etwa 0,18 mg Helium, die pro Minute entfernt werden. Würde ein Flüssigkeitschromatograph mit einem Wasser/Acetonitril-Gemisch bei einem Fluss von 1 ml/min analog mit einer Massenspektrometer wie bei der GC-Kopplung betrieben, so müsste vergleichbar eine Masse von etwa 1 g Wasser/Acetonitril pro Minute entfernt werden, also etwa 5.000 mal mehr Laufmittelsubstanz als bei der GC. Eine vergleichbare Technologie mit der Erzeugung eines entsprechenden Hochvakuaums und vergleichbarer Ionenausbeute wie bei der EI-Ionisation konnte nach der Flüssigkeitschromatographie nicht entwickelt werden.

Mit dem in Abb. 8 dargestellten Prinzip der Elektro-Spray-Ionisation (ESI), einer Ionisierungsart, die räumlich vor dem Eintreten der Ionen in das eigentliche Massenspektrometer und damit nicht im Hochvakuum des MS-Gerätes erfolgt, konnte dieses Problem gelöst werden.

Abb. 8 zeigt die Bildung positiver Ionen bei der ESI-MS. Es können bei umgekehrter Polung auch negative Ionen erzeugt werden. ESI verläuft bei normalem Atmosphärendruck in drei Abschnitten: 1. Bildung ladungstragender Tropfen (durch eine entsprechende Hochspannung und eine Stickstoffzufuhr wird ein stabiles Spray erzeugt, das entsprechend der Polung zur Bildung positiver oder negativer Ionen führt entsprechend der Polung), 2. Verkleinerung der Tropfen und 3. Bildung gasförmiger Ionen. Die gebildeten Ionen werden durch eine Öffnung in der Gegenelektrode

Abb. 7: Prinzip der Elektronenstoß-Ionisation (EI)

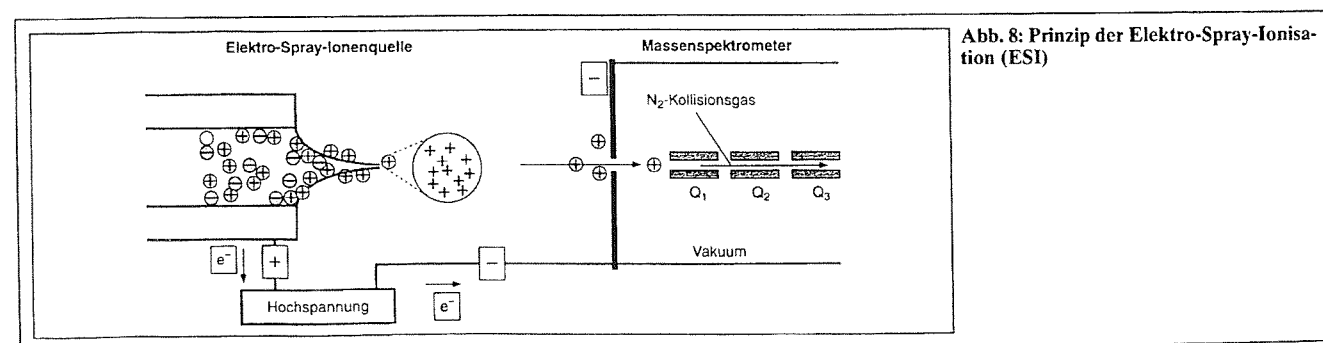
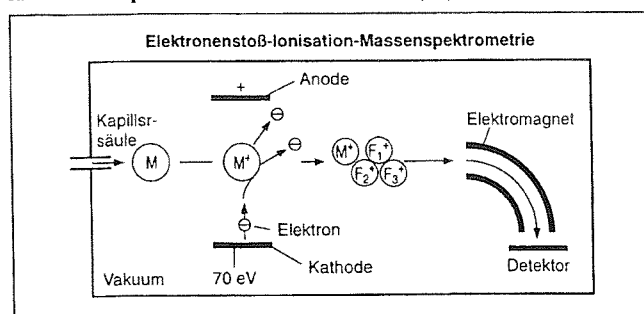


Abb. 8: Prinzip der Elektro-Spray-Ionisation (ESI)

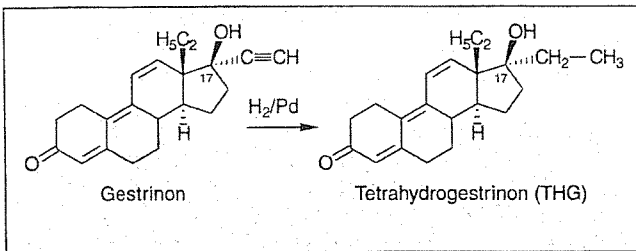
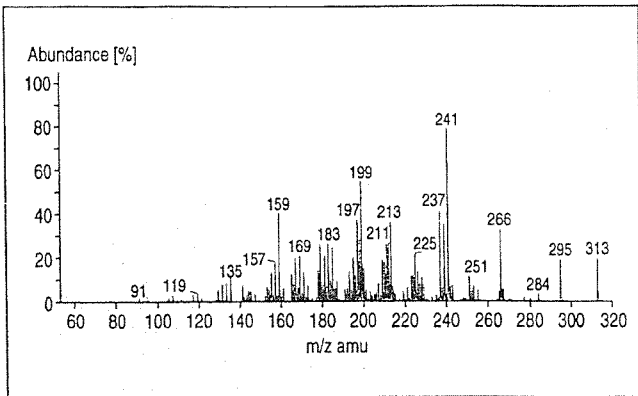


Abb. 9 (oben): ESI-Spektrum von Tetrahydrogestrinon (M+H)<sup>+</sup> = 313 nach positiver Ionisierung und kollisionsinduzierter Fragmentierung mit Stickstoff

Abb. 10 (unten): Synthese von Tetrahydrogestrinon (THG) durch katalytische Hydrierung von Gestrinon

in den Massenanalysator eingeführt und die nichtionisierten Moleküle (überwiegend Wasser und Acetonitril) werden durch das gebildete Spray und der fehlenden Ladung nicht abgelenkt und gelangen daher nicht ins MS. Bei der positiven Ionisierung entstehen protonierte (M+H)<sup>+</sup> Moleküle aber auch Addukt-Ionen (z. B. M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>. Dieses ist in der Regel substanzabhängig und kann durch Lösungsmittelzusätze beeinflusst werden. Substanzen mit basischen Gruppen werden bevorzugt positiv ionisiert. Bei der negativen Ionisierung werden (M-H)<sup>-</sup> Ionen erzeugt, wobei Substanzen mit sauren Funktionen begünstigt negative Ionen bilden.

Die Ionenausbeute bei der ESI nach LC-Trennung wird mit etwa 0,1 bis 0,01 % angegeben und liegt damit um einen Faktor 100 bis 1000 höher als bei der EI-Ionisation nach GC-Trennung.

Abb. 8 zeigt weiterhin das Prinzip der massenspektrometrischen Analyse bei der Anwendung eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers, wobei das Gerät drei mit Q1–Q3 bezeichnete Massenanalysatoren verwendet. Im Q1 wird das gebildete (M+H)<sup>+</sup> Ion isoliert, das dann im Q2 mit einem Kollisionsgas (Stickstoff) fragmentiert wird. Die gebildeten Fragmentationen werden im Q3 hinsichtlich ihrer Masse und Intensität registriert. Ein entsprechendes ESI-Produkt-Ionen-Massenspektrum ist in Abb. 9 für das anabol androge Steroid Tetrahydrogestrinon\* dargestellt.

In den letzten zehn Jahren werden deshalb zunehmend hochleistungsfähige Massenspektrometer angeboten, die an Flüssigkeitschromatographen gekoppelt werden können. Im Rahmen der Doping-Analytik wird diese Technologie zunehmend eingesetzt und erweitert damit das analytische Spektrum auch zur massenspektrometrischen Bestimmung von Peptidhormonen.

\*Anmerkung zu Tetrahydrogestrinon: Mitte Oktober 2003 teilte der Direktor der neu gegründeten Anti-Doping-

Agentur der USA (USADA, United States Anti-Doping Agency) mit, dass in einer A-Probe ein neues Steroid (Anabolikum) nachgewiesen wurde. Bei diesem Steroid handelt es sich um Tetrahydrogestrinon (THG), das bisher nicht bekannt war.

Die Weitergabe der Substanz durch einen Trainer an die USADA führte unter Mitarbeit des IOC/WADA akkreditierten Labors in Los Angeles zu der Identifizierung dieser Substanz. THG wurde illegal von der kalifornischen Firma Balco für Athleten entwickelt, um das Doping-Kontroll-System zu umgehen.

THG ist kein medizinisches Produkt, und es existierten keine Daten über Tierversuche, klinische Studien und über mögliche Nebenwirkungen der Substanz. THG wird als ein Designer-Steroid bezeichnet. Es wurde von Gestrinon ausgehend modifiziert, wobei mit Wasserstoff, wahrscheinlich unter Verwendung eines geeigneten Katalysators 4 Wasserstoffatome an die Ethinylgruppe an Position C-17 des Steroids addiert wurden (Abb. 10)

#### 4 Zusammenfassung

Die Doping-Analytik wendet zum Nachweis des Missbrauchs von im Sport verbotenen Substanzen und Methoden modernste analytische Techniken an. Neben der Technik der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), die bereits 1972 effektiv bei den Olympischen Spielen in München eingesetzt wurde, werden zunehmend Substanzen mit der Flüssigkeitschromatographie in Kombination der Massenspektrometrie (LC-MS) detektiert. Damit wird das Spektrum der Nachweismöglichkeiten deutlich erweitert. Neben massenspektrometrischen Methoden werden komplementäre Methoden eingesetzt, die überwiegend auf der Basis von selektiven Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen. Diese Methoden, die zum Nachweis von Peptidhormonen wie Erythropoietin (EPO) und Wachstumshormon (HGH) im Einsatz sind, werden hier nicht weiter ausgeführt.

Weitere Informationen zur Analytik sind in Spezialartikeln publiziert und sind in ihrer Übersicht auch auf der Webseite des Instituts für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln [www.dopinginfo.de](http://www.dopinginfo.de) abrufbar.

#### Literatur

- Übersichtsartikel
- H. Budzikiewicz, Massenspektrometrie – Eine Einführung, 5. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2005
- H. Kienitz, Massenspektrometrie, Verlag Chemie, Weinheim, 1968
- F. Lottspeich und H. Zorbas, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998
- Übersichtsartikel – Doping und Dopinganalytik
- M. Thevis und W. Schänzer, Mass spectrometry in doping control analysis, Current Organic Chemistry 9, 825–848 (2005)
- M. Thevis und W. Schänzer, Analysis of low molecular weight substances in doping control. In: Kraemer, W.J., Rogol, A.D. (eds.) The Endocrine system in sports and exercise. Blackwell Publishing, Oxford (2005), 47–68
- W. Schänzer und M. Thevis, Doping und Dopinganalytik. Chemie in unserer Zeit 38, 230–41 (2004)
- W. Schänzer, Doping und Dopinganalytik. Chemie in unserer Zeit 31, 218–28 (1997)

#### Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. Wilhelm Schänzer und Privatdozent Dr. Mario Thevis, Zentrum für Präventive Dopingforschung, Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln, Carl-Diem-Weg 6, D-50933 Köln, E-Mail: [schaenzer@biochem.dshs-koeln.de](mailto:schaenzer@biochem.dshs-koeln.de)