Dopinganalytik

Wilhelm Schänzer
Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln

Dopingkontrolle

Zur Überprüfung eines Dopingverstoßes müssen Athleten eine Urinprobe abgeben: Im Rahmen der Überprüfung von Erythropoietin, kurz EPO, wurden bei den Olmypischen Spielen in Sydney 2000 erstmals auch Blutproben entnommen. Die Athleten werden nach dem Reglement des Sportverbandes für die Dopingkontrolle ausgewählt. In der Doping-Kontrollstation geben die Athleten eine Urinprobe ab. Der Urin wird zu 2/3 in eine A-Probe und zu 1/3 in eine B-Probe aufgeteilt und die Probenflaschen versiegelt. Beide Proben werden in das Doping-Kontrolllabor transportiert, wo zuerst die Analyse der A-Probe durchgeführt wird. Ist das A-Ergebnis positiv, das heißt, es wurde ein verbotene Dopingsubstanz nachgewiesen, erfolgt die Benachrichtigung des Sportverbandes, der mit dem Labor und dem betroffenen Athleten einen Termin für die Analyse der B-Probe vereinbart. Zur B-Analyse kann der Athlet selber anwesend sein und/oder einen entsprechenden Gutachter bestellen. Erst, wenn die B-Analyse das Ergebnis der A-Analyse bestätigt, gilt die Probe als positiv, und der Verband kann eine Sanktion gegenüber dem Athleten verhängen.

Analytik

Abb.1 strukturiert das Vorgehen bei der Analytik. Zuerst erfolgt eine **Probenvorbereitung**, wobei die jeweiligen Wirkstoffe bzw. deren Metaboliten aus dem Urin isoliert werden. Im Anschluss kann eine **Derivatisierung** der Substanzen,

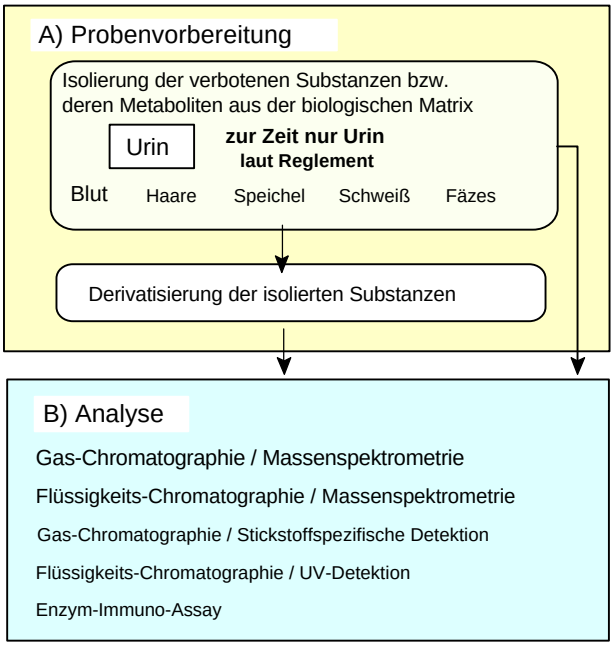
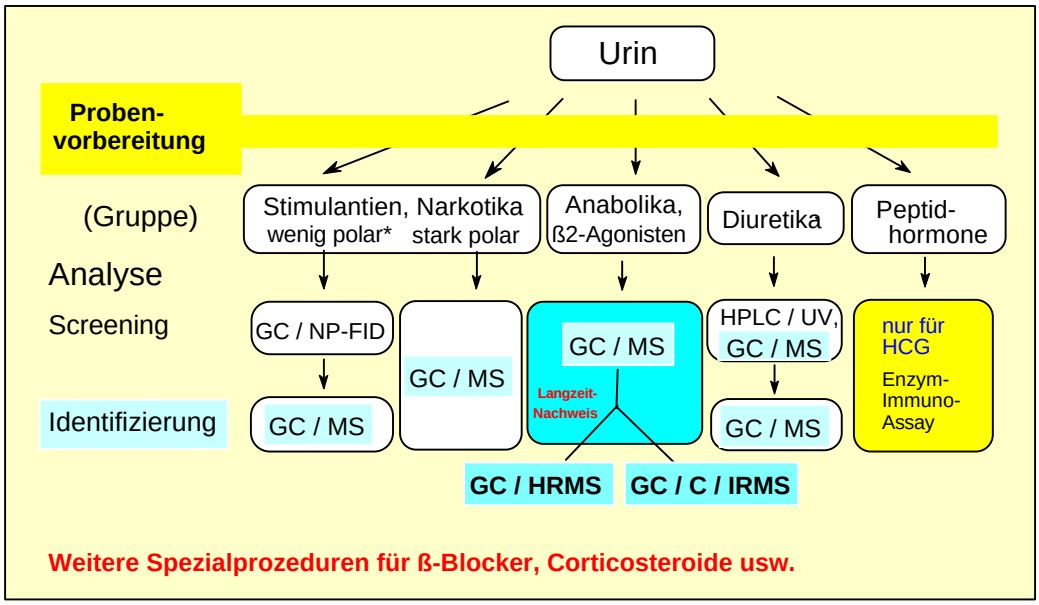


Abb.1 Überblick über die Analytik: Probenvorbereitung und analytische Messung

zur Verbesserung der gaschromatographischen Eigenschaften, vorgenommen werden. Dieses ist aber nicht unbedingt, wie z.B. bei Stimulanzien notwendig. Im Weiteren erfolgt die eigentliche **Analyse**, die in der Regel aus einem chromatographischen Trenn- und einem anschließenden Detektionssystem besteht. Bei der Gruppe der Peptidhormone wird mit substanzspezifischen Enzym-Immuno-Assays gearbeitet.

Bei der praktischen Durchführung im Rahmen einer großen Anzahl zu kontrollierender Proben wird weiterhin zwischen einer **Screening-Methode** und einer **Identifizierungs-Methode** unterschieden . Die **Screening-Methode** ist hierbei eine Methode, die im Idealfall mit möglichst wenig Aufwand alle Substanzen erfassen und dabei gleichzeitig empfindlich, schnell (mit einem hohen Probendurchsatz) und kostengünstig arbeiten soll. Dieses ist aber in der Regel, insbesondere beim Nachweis von anabolen Wirkstoffen, nicht möglich. Um die nötige Empfindlichkeit für alle Verbindungen zu gewährleisten, müssen für jede Substanzgruppe spezielle Methoden eingesetzt werden (Abb.2). Bei der Screening-Methode für anabole Wirkstoffe wird sogar mit einer extrem empfindlichen und kostenintensiven Technik der Hochauflösenden Massenspektrometrie analysiert. Werden mit der Screeningmethode verdächtige Substanzen aufgefunden, so erfolgt im Rahmen einer **Identifizierungs-Methode** eine zweite Isolierung und eine eindeutige Identifizierung des Wirkstoffes. Hierbei kann ein substanzspezifisches Isolierungsverfahren zur weiteren Reduzierung der biologischen Matrix und ein eindeutiges physikalisches Messprinzip eingesetzt werden. Die eindeutige Identifizierung von Dopingsubstanzen erfolgt zur Zeit hauptsächlich mit einer Kombination aus Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS). Analog hierzu kann auch eine flüssigkeits-chromatographische Trennung mit anschließender massenspektrometrischen Bestimmung erfolgen (LC/MS). Eine Ausnahme stellt hierbei das Peptidhormon Choriongonadotropin (HCG) dar, dessen Identifizierung mittels zweier verschiedener Enzym-Immuno-Assays, die auf unterschiedliche Antikörper zurück greifen, erfolgt, .



* und unkonjugiert ausgeschieden

Abb.2 Überblick über die bei der Dopingkontrolle verwendeten Prozeduren

Stimulanzien und Narkotika

Nichtkonjugiert ausgeschiedene wenig polare Stimulanzien

Diese Bestimmungsmethode wurde im wesentlichen bereits für die Olympischen Spiele in München 1972 entwickelt [**1**]. Hierbei werden Stimulanzien aber auch Narkotika erfasst, die "frei" (ungebunden) in den Urin ausgeschieden werden und underivatisiert gaschromatographiert werden können [**2**]. Bei diesen Verbindungen handelt es sich in der Regel um basische bzw. neutrale Substanzen, die direkt aus dem Urin unter alkalischen Bedingungen mit einem organischen Lösungsmittel, das sich nicht mit Wasser mischt (z.B. Diethylether oder tert.Butylmethylether), extrahiert werden. Ein geringer Anteil (2-3 µl) der Etherphase wird dann direkt auf die gaschromatographische Trennsäule injiziert.

Abb.3A zeigt das Gaschromatogramm eines Standardgemisches von Stimulanzien, wobei mit einem stickstoff-, phosphorspezifischen Flammenionisationsdetektor (NP-FID) analysiert wurde. Abb.3B demonstriert ein typisches Chromatogramm eines Urinextraktes, wobei nur Coffein (11), das in fast allen Urinproben auffindbar ist, und ein verwendeter Interner Standard (12) (N-Dodecyl-N,N-diisopropylamin) angezeigt werden. Ein positiver Amphetaminfall ist in Abb.3C wiedergegeben, wobei ein deutliches Signal (2) mit der Retentionszeit von Amphetamin registriert wird.
Zur eindeutigen Identifizierung der Substanz (2) in Abb.3C reicht das GC/NP-FID-Chromatogramm nicht aus. Hier muss die massenspektrometrische Identifikation erfolgen. Abb.4A zeigt das Massenspektrum von Amphetamin nach Elektronenstoßionisation mit 70 eVolt, wobei die Intensität des Molekülions m/z 135 deutlich niedriger als 1% des Basispeaks ist. Das Spektrum wird nach einer α###-Spaltung zum Stickstoff (Abb.4a) vom Fragment m/z 44 (Basispeak) dominiert. Um intensivere und aussagekräftigere Fragmente im höheren Massenbereich zu erhalten, kann Amphetamin derivatisiert werden, wobei eine Trimethylsilylierung mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) (Abb.5 und Massenspektrum des Amphetamin-TMS in Abb.4B) bzw. mit Trifluoressigsäureanhydrid oder N-Methyl-bis-trifluoracetamid (MBTFA) erfolgen kann (Abb.6 und Massenspektrum in Abb.4C). Die Möglichkeit chemische Derivate zu bilden, wird in der Regel benutzt, wenn 1. die Substanz schlechte chromatographische Eigenschaften hat, 2. wenn charakteristische Ionen im niedrigen Massenbereich durch den von der biologischen Matrix erzeugten Untergrund extrem gestört werden (die Massenspektren werden durch die Derivatisierung zu Gunsten höhere Fragmentierungen verändert und erlauben somit eine eindeutigere Identifizierung der Verbindung), und 3. wenn eine Koelution mit einer anderen störenden Verbindung vorliegt und diese nicht durch die Probenvorbereitung bzw. durch die Verwendung einer anderen chromatographische Trennsäule abgetrennt werden kann.
Eines der am meisten verwendeten Derivatisierungsreagienzen für die gaschromatographische Spurenanalyse ist N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA), das erstmals 1969 von Manfred Donike [**3**] synthetisiert wurde.

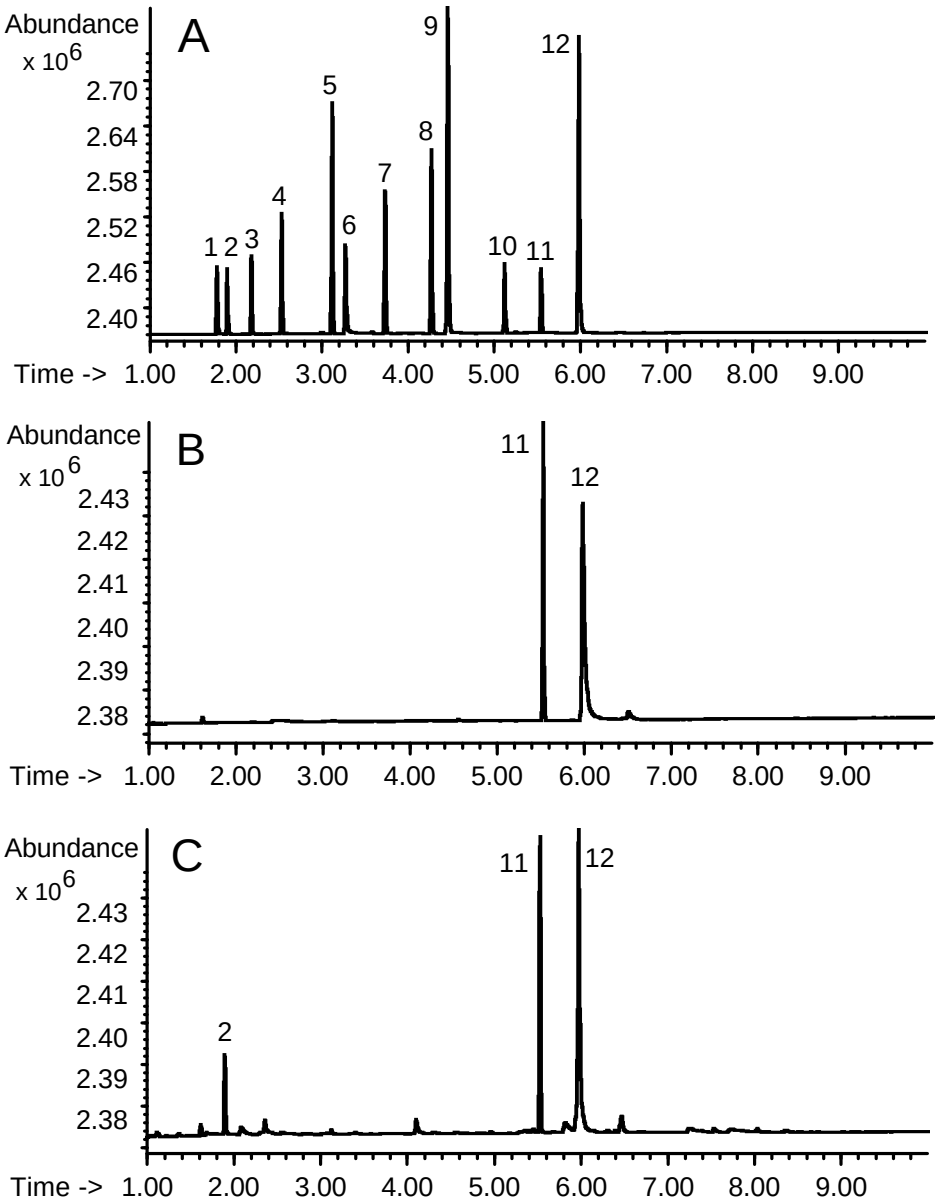


Abb.3 GC/NP-FID-Chromatogramme der Screeningmethode für flüchtige Stimulanzien: A) Standardgemisch mit Heptaminol (1), Amphetamin (2), Metamphetamin (3), Dimetamphetamin (4), Nikotin (5), Ephedrin (6), Phenmetrazin (7), Niketamid (8), Pentetrazol (9), Fencamfamin (10), 1-(N,N-Diisopropyl)-dodecylamin (Interner Standard) (11) und Coffein (12); B) Urinextrakt mit Coffein (12) und internem Standard (11) und C) Urinextrakt einer mit Amphetamin (2) positiven Probe.
Gerätebedingungen: Gerät: Hewlett-Packard MS 5971/GC 5890, Säule: Hewlett-Packard, HP1, 17m, I.D. 0.2mm, Filmdicke 0.11µm, Trägergas: Helium 1 ml/min split 1:20, Temperaturprogramm: 100°C - 20°C/min - 320°C.

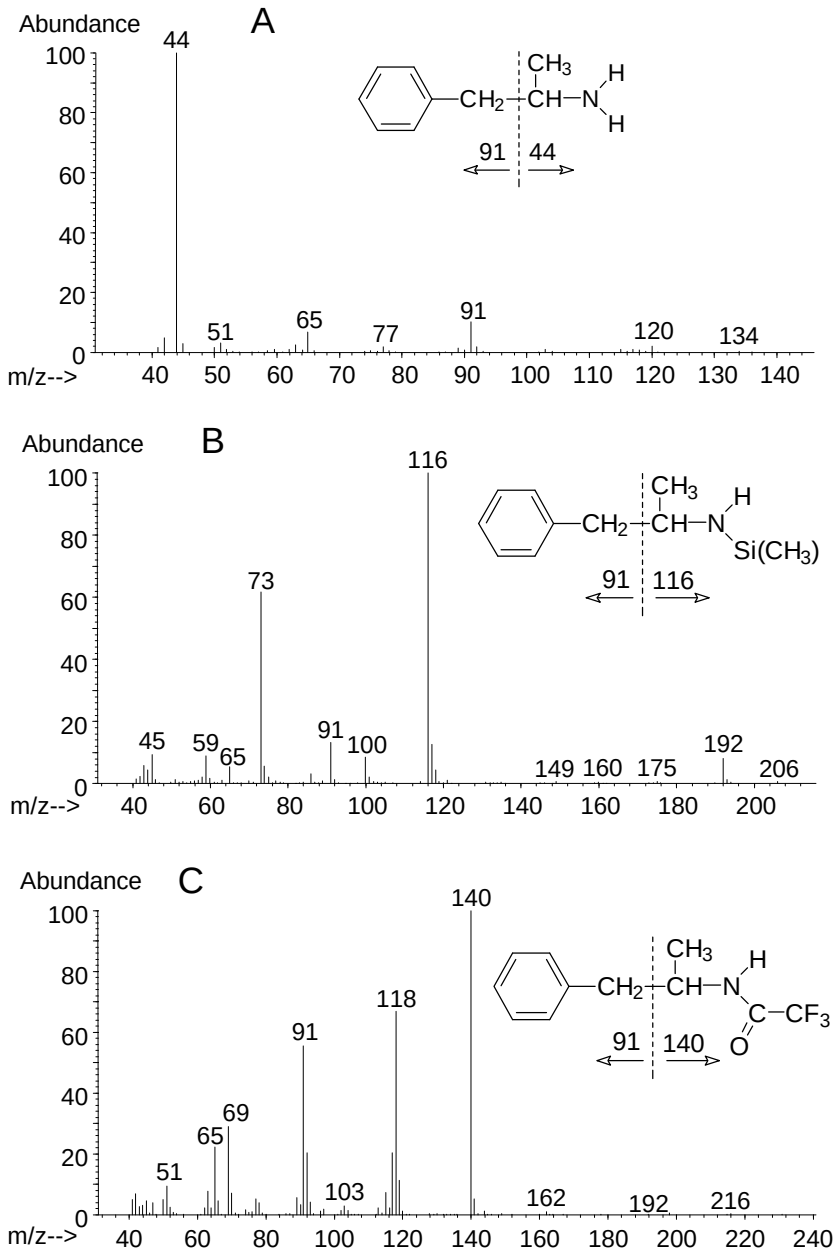


Abb. 4 Massenspektren von A) Amphetamin (M^+ 135), Amphetamin-TMS (M^+207) und Amphetamin-TFA (M^+231).

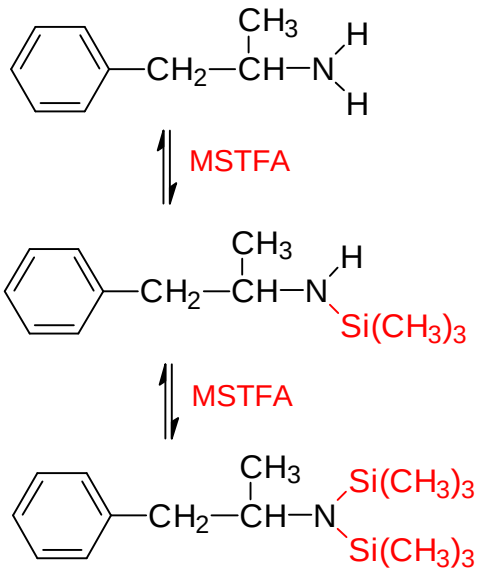


Abb.5 **Derivatisierung**
Trimethylsilylierung von Amphetamin mit MSTFA zum Amphetamin-TMS und Amphetamin-bis-TMS. (Anmerkung: Unter gaschromatographischen Bedingungen ergibt sich in der Regel ein Gemisch der obigen Derivate in Abhängigkeit von der Aktivität der GC-Säule, wobei Amphetamin-TMS als Hauptprodukt registriert wird)

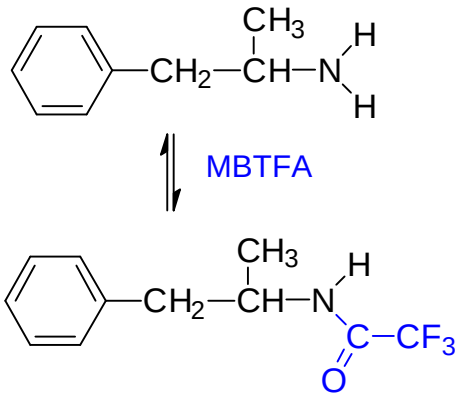


Abb.6 **Derivatisierung**
Trifluoracetylierung von Amphetamin mit MBTFA zum Amphetamin-TFA (Anmerkung: Gegenüber den N-TMS-Derivaten von Amphetamin ist das N-TFA-Derivat unter GC-Bedingungen absolut stabil)

Konjugiert ausgeschiedene und/oder stark polare Stimulanzien und Narkotika

Mit dieser Methode werden zum einen Dopingsubstanzen erfasst, die als Konjugate (an Schwefelsäure bzw. Glucuronsäure gebunden) ausgeschieden werden, und zum anderen Substanzen, die aufgrund stark polarer Eigenschaften schlecht bzw. nicht gas-chromatographisch analysiert werden können. Die Methode beinhaltet deshalb im Vergleich zu der vorhergehenden Methodik eine Hydroyse der Schwefelsäure- bzw. Glucuronsäure-Konjugate sowie eine Derivatisierung der polaren Gruppierungen. Hierbei erfolgt nach Donike [**4**] eine Umsetzung mit dem Derivatisierungsreagenz MSTFA (dargestellt am Beispiel der Silylierung von Synephrin in Abb.7, wobei sowohl ein bis-O-TMS-Derivat, Massenspektrum in Abb.8A, als auch ein bis-O-TMS-N-TMS-Derivat, Massenspektrum in Abb.8B, registriert werden kann), bzw. eine selektive

Derivatisierung, wobei nach der Trimethylsilylierung eine Trifluoracetylierung der Aminfunktion mit N-Methyl-bis-trifluoracetamid (MBTFA) folgt (siehe Abb.7 und Massenspektrum in Abb.8C) und ein bis-O-TMS-N-TFA-Derivat quantitativ gebildetet wird.

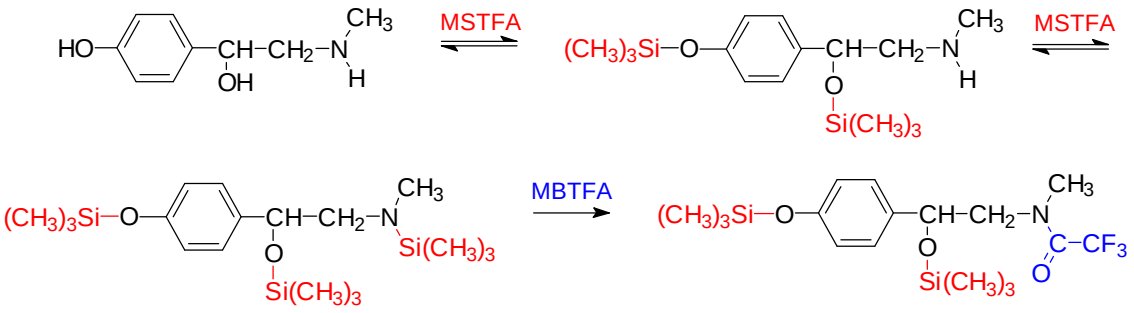


Abb.7 Selektive Derivatisierung von Synephrin (1-(4-Hydroxyphenyl)-2-methyl-amino-ethanol) mit MSTFA und MBTFA zum Synephrin-bis-TMS-N-TFA

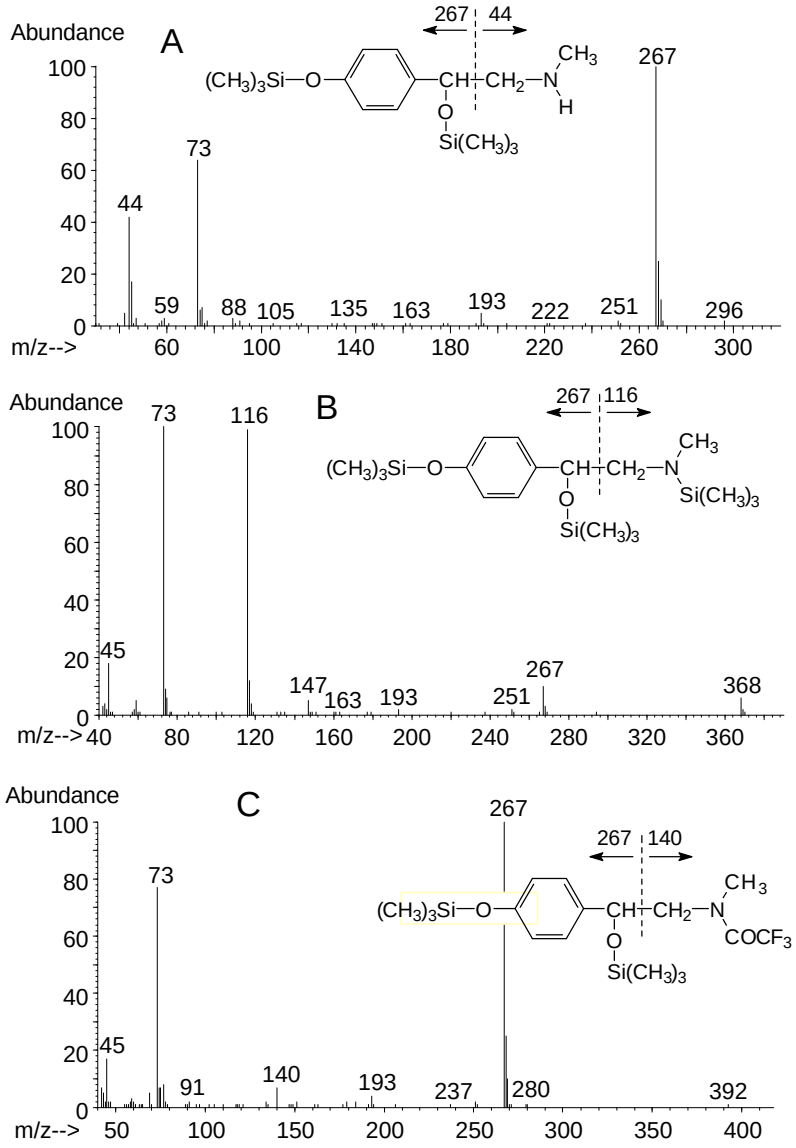


Abb.8 Massenspektrum von A) Synepfrin-bis-TMS (M^+ 311), B) Synepfrin-tris-TMS (M^+ 383) und C) Synephrin-bis-TMS-N-TFA (M^+ 407).

Anabol androgene Steroidhormone (Anabolika)
(am Beispiel Metandienon)

Aufgrund der Tatsache, dass anabole Wirkstoffe nicht unmittelbar für den Wettkampf, sondern in der Trainingsphase zur Verbesserung von Kraft und Schnellkraft Anwendung finden, werden Trainingskontrollen (in Deuschland seit 1990) vorgenommen. Hierbei wird von seitens der Analytik versucht, einen Missbrauch der anabolen Wirkstoffe solange wie möglich nach der letzten Einnahme nachzuweisen.
Voraussetzung für den Nachweis dieser Verbindungen ist dabei die Kenntnis ihres Metabolismus und ihrer Pharmakokinetik. Viele anabole Steroidhormone werden derart komplex metabolisiert, so dass die angewandte Substanz nicht unverändert in den Urin ausgeschieden wird [**5**]. Beispielhaft sind in Abb.9 die Hauptsoffwechselwege des anabol androgenen Steroids Metandienon wiedergegeben.

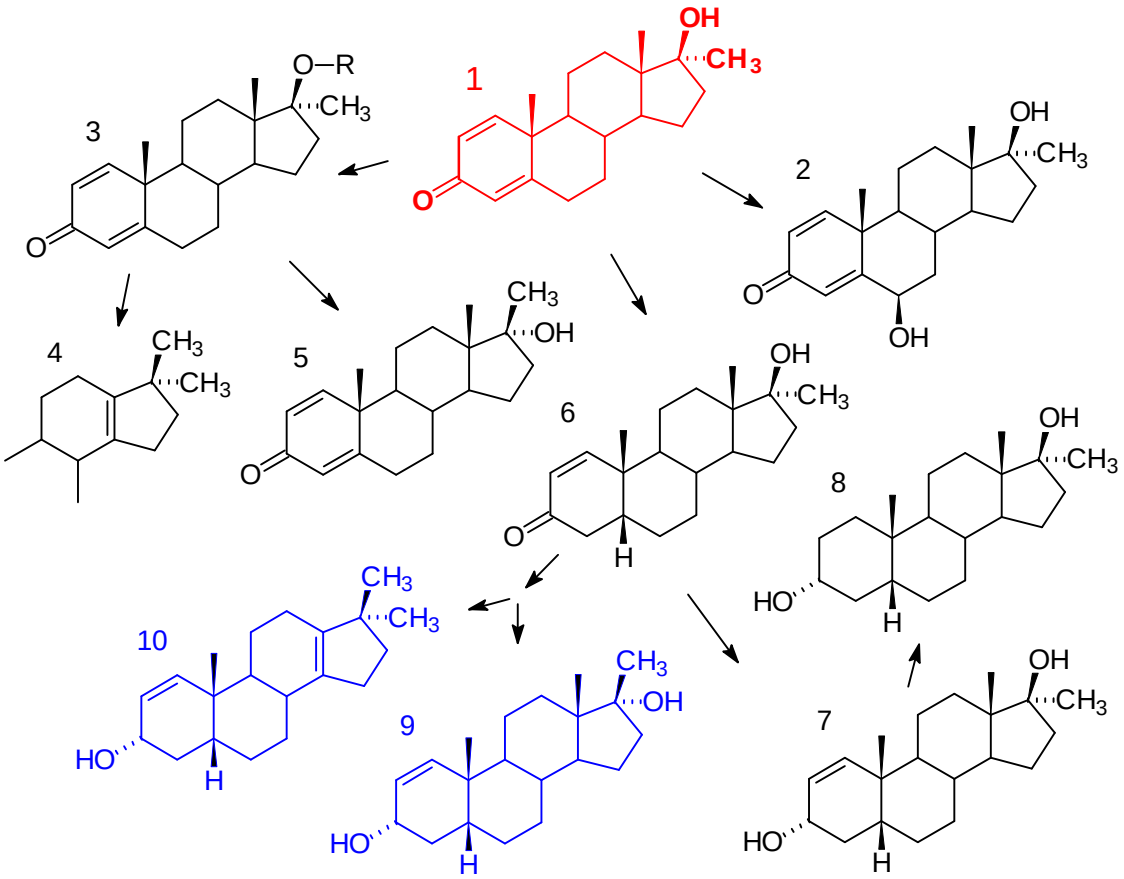


Abb.9
Hauptstoffwechselwege (Metabolismus) des anabolen Steroids Metandienon (1): 6ß-Hydroxymetandienon (2), Metandienon-17ß-sulfat (3), 18-Nor-17,17-dimethylderivat (4), 17-Epimetandienon (5), 17ß-Hydroxy-17α-methyl-5ß-androst-1-en-3-on (6), 17α-Methyl-5ß-androst-1-en-3α,17ß-diol (7), 17α-Methyl-5ß-androstan-3α,17ß-diol (8), 17ß-Methyl-5ß-androst-1-en-3α,17α-diol (9) und 18-Nor-17,17-dimethyl-5ß-androsta-1,13-dien-3α-ol (10).

Die Analytik versucht dabei, Metaboliten zu identifizieren, deren Eliminations-halbwertszeiten am längsten sind, so dass ein möglichst langer Nachweis nach der letzten Applikation geführt werden kann. Generell kann festgehalten werden, dass

Steroidhormone, die als Depotpräparte, z.B. Nortestosteron in Form von Estern mit langkettigen Fettsäuren, intramuskulär (in die Muskulatur) oder subkutan (unter die Haut) injiziert werden, auch lange im Urin nachgewiesen werden können. Hierbei sind unter Umständen Nachweiszeiten von über drei Monaten möglich. Die Verwendung dieser Substanzen finden wir deshalb nur noch bei sogenannten "unerfahrenen Dopinganfängern". Dagegen sind die Ausscheidungszeiten bei oral eingesetzten Substanzen in der Regel deutlich kürzer. Konkrete Angaben zu den Nachweiszeiten der einzelnen Verbindungen können nur ungenau angegeben werden und schwanken in der Regel aufgrund individueller Einflüsse, Höhe der Dosierung und Dauer der Anwendung. Metaboliten die bei dem oralen Präparat Metandienon am länsten nachweisbar sind, sogenannte Langzeitmetaboliten, sind z.B. die Metaboliten 9 und 10 in Abb.9. Zur genauen Identifizierung der aus Urin isolierten Anabolikametaboliten wurden die meisten Metaboliten als Referenzverbindungen synthetisiert [**6**].
Um Nachweisgrenzen dieser Verbindungen bis zu 1ng/ml Urin und besser zu erreichen, werden die Steroide, ähnlich wie bei den Stimulanzien beschrieben, mit MSTFA derivatisiert (Abb.10). Hierbei wird mit Trimethyliodsilan (TMIS) katalysiert [**7**], so dass sekundäre und auch tertiäre Hydroxyfunktionen (Abb.10A) quantitativ in Trimethylsilylether und Ketofunktionen wie in Testosteron (Abb.10B) und 6ß-Hydroxymetandienon (Abb.10C), einem Metaboliten von Metandienon, in Trimethylsilylenolether überführt werden.

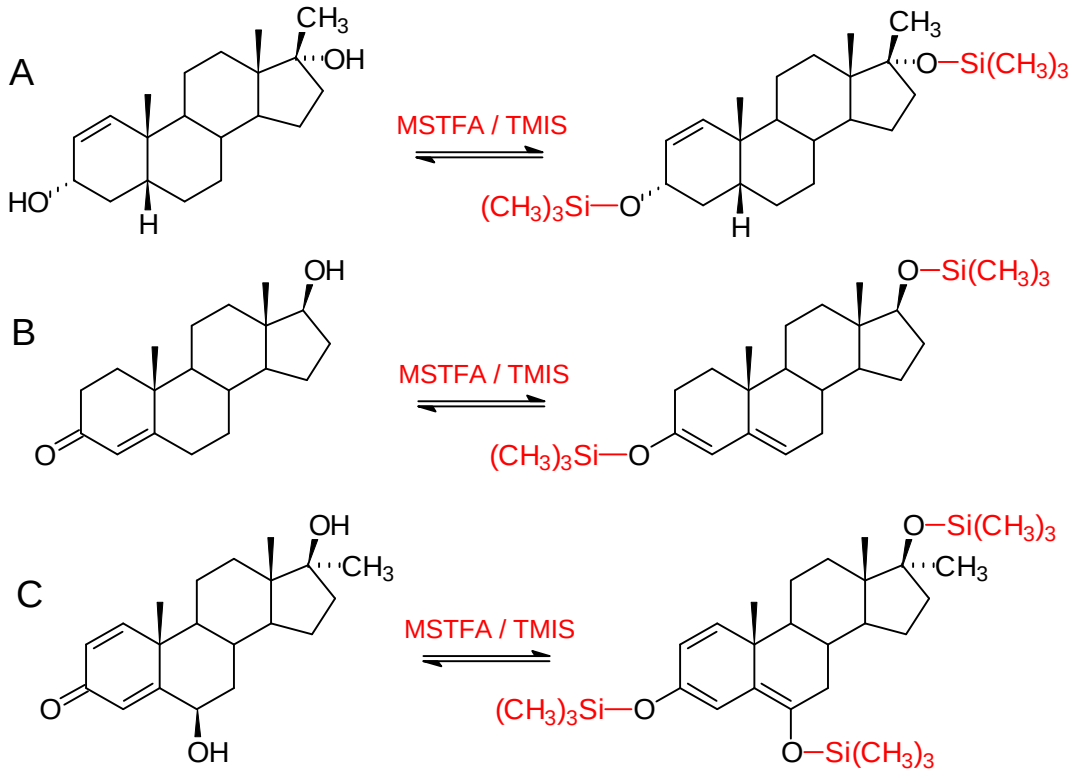


Abb.10
Trimethylsilylierung von Hydroxy- und Ketofunktionen mit MSTFA und Trimethyliodsilan (TMIS) als Katalysator: A) 17ß-Methyl-5ß-androst-1-en-3α,17α-diol (Metandienonmetabolit) zum Bis-TMS-ether, B) Testosteron zum 17-TMS-ether-3-TMS-enolether und C) 6ß-Hydroxymetandienon zum 17-TMS-ether-3-TMS-enolether.

So zeigt nach Trimethylsilylierung von 17ß-methyl-5ß-androst-1-en-3α,17α-diol (Abb.10A), ein Langzeitmetabolit von Metandienon mit dem Molekulargewicht von 304, das entsprechende Massenspektrum (Abb.11) ein Molekülion von m/e 448 und liefert damit den Beweis, dass zwei Trimethylsilylgruppen mit dem Steroid reagiert haben. Für die Screeningmethode als auch für die Identifizierung wird dann mit mehreren substanzspezifischen Ionen detektiert, wobei die Intensitäten der Hauptfragmente im Spektrum der verdächtigen Substanz mit den Intensitäten der Fragmente der Referenzsubstanz übereinstimmen müssen. Liegt die Verbindung im höheren Konzentrationsbereich vor, kann auch ein volles Massenspektrum zur weiteren Absicherung des Ergebnisses aufgenommen werden.

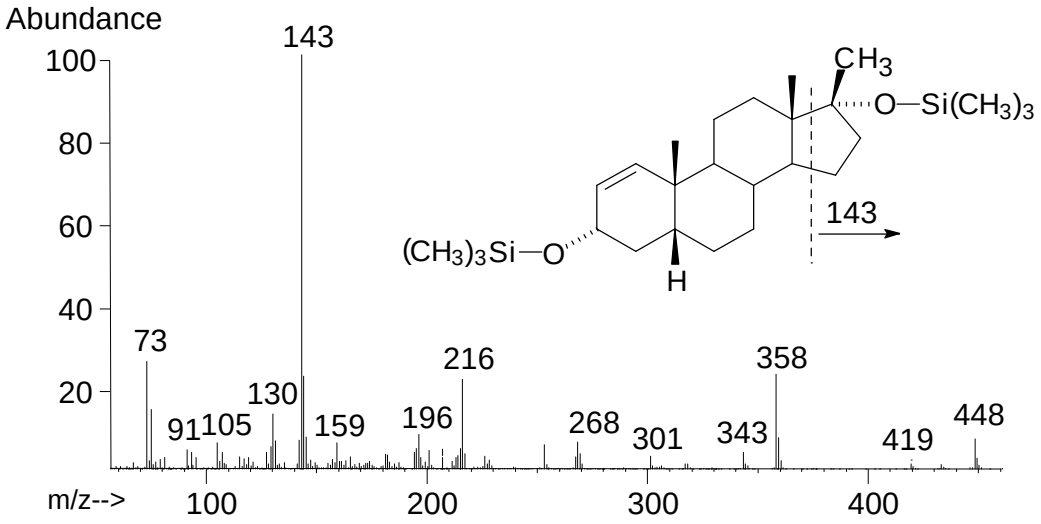


Abb.11 Massenspektrum von 17ß-Methyl-5ß-androst-1-en-3α,17α-diol-bis-TMS (M^+ 448), ein Langzeitmetabolit von Metandienone

Hochauflösende Massenspektrometrie
(HRMS = high resolution mass spectrometry)

Um die Nachweiszeiten weiterhin zu steigern, wurde in den letzten Jahren die Hochauflösende Massenspektrometrie für den Routineeinsatz als Screeningmethode angewendet. Abb.12 zeigt das Screeningresultat für den Metandienonmetaboliten 9 (s.Abb.9), wobei mit einer Auflösung von R = 3000 auf zwei intensive Ionen (Massenspektrum s. Abb.11) empfindlich gescreent wird. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie eine höhere Empfindlichkeit als die GC/MS mit niedriger Auflösung aufweist, und dass sie bei einer erhöhten Auflösung mit einer verbesserten Selektivität den biologischen Untergrund aus der mitisolierten Matrix deutlich reduziert. Dadurch wird das Signal-Rausch-Verhältnis und damit der Nachweis einer Verbindung deutlich verbessert [**8**]. Die Voraussetzung für die Anwendung der Hochauflösenden Massenspektrometrie ist die Tatsache, dass die genauen Atommassen keine ganzzahligen Werte sind. Laut Konvention hat nur Kohlenstoff die Masse 12 während Wasserstoff die genaue Masse 1.007825, Stickstoff die Masse 14.003074 und Sauerstoff die Masse 15.994914. Diese Massen sollten nicht verwechselt werden mit den durchschnittlichen Atomgewichten, wobei der Anteil der natürlichen Isotope mitberechnet wird.

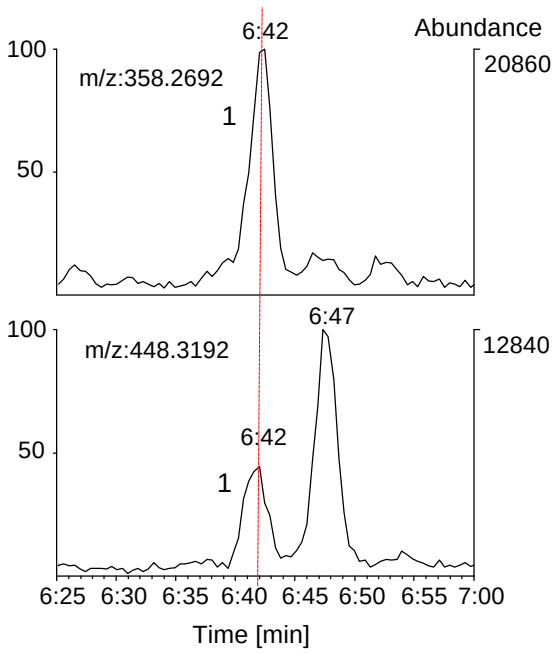


Abb.12
GC/HRMS-Chromatogramm (Auflösung R=3000) Screening-probe für den Metandienonmetaboliten 17ß-Methyl-5ß-androst-1-en-3α,17α-diol (1) als bis-TMS-Derivat mit den Ionen m/e 448.3192 (M^+) und m/e 358.2692 (M^+ -90, M^+ - $Si(CH_3)_3OH$) mit 2 ng/ml Urin.
Gerät: MS: Finnigan MAT 95, GC: Hewlett-Packard 5890, Säule: Hewlett-Packard, Ultra1, 17m, I.D. 0.2mm, Filmdicke 0.11µm, Trägergas: Helium 1 ml/min split 1:20, Temperaturprogramm: 185°C - 5°C/min - 240°C.

Das folgende Beispiel zeigt wie zwei unterschiedliche Massenfragmente, die beide die gleiche Masse von 58 aufweisen, mit der Hochauflösung getrennt werden können:

Fragment	Masse	genaue Masse
$C_3H_6O^+$	58	58,041864
$C_3H_8N^+$	58	58,065674

Berechnung der Auflösung **R**

R = m / Δm = 58,05 / (58,065674-58,041864) = **2436**

Eine Trennung dieser beiden Fragmente ist mit einer Auflösung von etwa 2500 möglich. Dieses bedeutet veranschaulicht, dass mit einer Auflösungseinstellung von 2500 und einer Messung mit der Masse m/e 58,0419 für Fragment 1, keine Signal für eine vorhandene Verbindung mit der Masse m/e 58,0657 für Fragment 2 , das nur einen Unterschied von 0,024 Massen aufweist, angezeigt wird.
Mit dieser Technik wurden 1995 im Kölner Labor bei Routinekontrollen für internationale Sportverbände (vor allem des Internationalen Gewichtheber-Verbandes) 65 positive Fälle zusätzlich festgestellt, die sonst unentdeckt geblieben wären.
Die Identifizierung der verdächtigen Proben erfolgt dann nach weitergehenden Isolierungsmethoden, so dass ein eindeutiges Massenspektrum registriert werden

kann. Hierbei können zur Zeit je nach Verbindung Nachweisgrenzen bis zu 100 pg/ml Urin erreicht werden.

Körperidentische Steroidhormone (Beispiel Testosteron)

Der Nachweis der körpereigenen Steroidhormonen wie Testosteron erfolgt ebenso mit der GC/MS-Technik. Auch Testosteron wird entsprechend derivatisiert (Abb.10B), wobei quantitativ ein bis TMS-Derivat erhalten wird (Abb.13 zeigt die entsprechenden Massenspektren des freien und des vollständig trimethylsilylierten Testosterons).

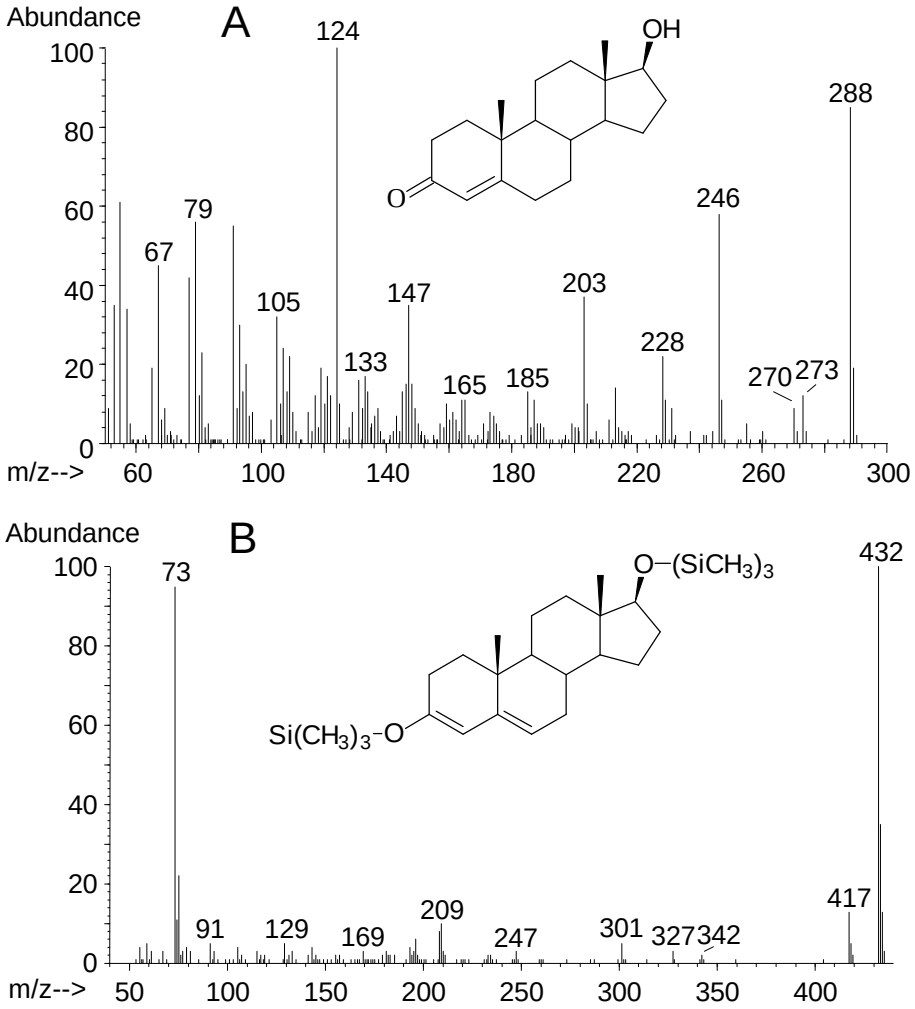


Abb.13 Massenspektrum von A) Testosteron (M^+ 288) und
B) Testosteron-bis-TMS (M^+ 432)

Die GC/MS-Bestimmung kann aber nur zeigen, dass die isolierte Verbindung tatsächlich Testosteron ist, sie kann nicht unterscheiden, ob Testosteron vom Körper selber synthetisiert bzw. von außen zwecks Doping zugeführt wurde. Um den Missbrauch von Testosteron, trotzdem kontrollieren zu können, wurde von Donike und Zimmermann der Testosteron/Epitestosteron-Quotient (T/E-Quitoent) bestimmt [**9**]. Hierbei zeigte sich, dass dieser Quotient bei einer Person relativ konstant ist, und sich erst nach einer Applikation von Testosteron erhöht. Bei dieser Bestimmung kann Epitestosteron, ein Stereoisomeres von Testosteron, als Referenzsteroid benutzt werden, da es kein direktes Stoffwechselprodukt von Testosteron ist, und sich bei

einer Testosteronapplikation nicht erhöht. In Abb.14 sind GC/MS-Chromatogramme der Testosteron-Bestimmung wiedergegeben. Die MS-Aufnahme registriert hierbei das Molekülion m/e 432. Abb.14A zeigt das Ergebnis einer negativen Probe mit einem T/E-Quotienten von 1.65 und Abb.14B einen positiven Testosteronfall mit einem Quotienten von 14.5 (Diese positive Probe wurde auch mit der weiter unten beschriebenen Isotopenmethode bestätigt: Ergebnis in Abb.15). Dieses Verfahren funktioniert aber nur, wenn a) die natürliche Verteilung des T/E-Quotienten bei Athleten nur in engen Grenzen schwankt, so dass statistische Referenzbereiche mit Obergrenzen berechnet werden können, und b) wenn der Quotient unter physiologischen und pathologischen Bedingungen bei einer Person konstant ist. Hat ein Athlet bei einer Kontrollprobe einen T/E-Quotienten, der oberhalb von sechs liegt, so wird er weiter untersucht. Er wird erst dann positiv bewertet, wenn der Kontrollwert eindeutig oberhalb des individuellen Referenzbereiches des Athleten liegt.

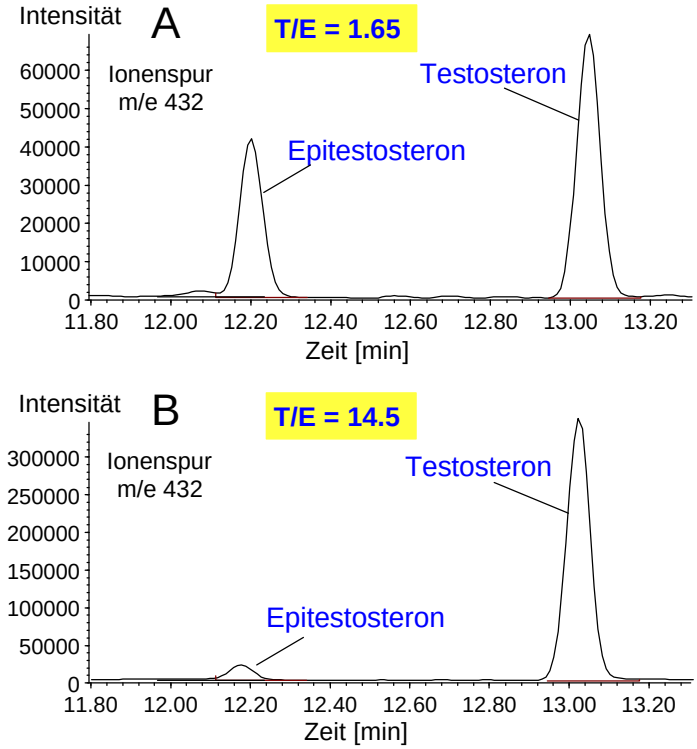


Abb.14
Bestimmung des Testosteron/Epitestosteron-Quotienten: GC/MS-Chromatogram (Ionenspur m/e 432) A) einer negativen Probe mit einem T/E-Quotienten von 1.65 und B) einer positiven Proben mit einem T/E-Quotienten von 14.5,
Gerät: Hewlett-Packard MS 5971/GC 5890, Säule: Hewlett-Packard, Ultra 1, 17m, I.D. 0.2mm, Filmdicke 0.11µm, Trägergas: Helium 1 ml/min split 1:10, Temperaturprogramm: 180°C - 3°C/min - 230°C.

Isotopenmassenspektrometerie des Kohlenstoffs
(Gaschromatographie/Combustion/ Isotope Ratio Mass Spektrometry - GC/C/IRMS)

Das Testostern-Nachweisverfahren, das relativ aufwendig und zudem nur eine indirekte Methode darstellt, wird seit neustem durch ein direktes Bestimmungsverfahren mittels der $^{13}C/^{12}C$-Isotopen-Massenspektrometrie abgesichert [**10-12**]. Die $^{13}C/^{12}C$-Isotopen-Massenspektrometrie ermöglicht einen eindeutigen Nachweis eines Dopings mit endogenen Steroidhormonen wie Testosteron, Dihydrotestosteron und Dehydroepiandrosteron. Das $^{13}C/^{12}C$-Isotopenverhältnis synthetischer Steroidhormone, die z.T. aus pflanzlichen Vorläufern isoliert und chemisch verändert werden, unterscheidet sich deutlich von dem der im Körper synthetisierten Hormone. Für diese Methode werden die körpereigenen Hormone sowie ihre Hauptmetaboliten isoliert und gaschromatographiert. Nach der GC-Trennung werden die Hormone vollständig in einer Oxidationskammer katalytisch zu CO_2 umgesetzt (combustion = Verbrennung) und anschließend in einem Massenspektrometer bestimmt. Hierbei werden lediglich die Massen m/e 44 für $^{12}CO_2$, m/e 45 für $^{13}CO_2$ und m/e 46 für $^{12}C^{18}OO$ benötigt (m/e 46 wird für die Korrektur von m/e 45 berechnet, das auch aus $^{12}C^{17}OO$ gebildet wird). Mit dieser Methode kann das $^{13}C/^{12}C$-Verhältnis, das natürlich bei ca. 1,11% (^{12}C 98,89%, ^{13}C 1,11%) liegt, auf 0.0002% genau bestimmt werden.
Die gemessenen Isotopenverhältnisse werden dabei in promill [$\delta^{13}C(^0/_{00})$] zu dem Isotopenverhältnis eines geeichten CO_2-Gases angegeben. Die Reproduzierbarkeit der Messungen liegt z.B. bei einem Wert von -24,4 $^0/_{00}$ bei +/- 0,2 $^0/_{00}$. In Abb.15 ist das Ergebnis der $^{13}C/^{12}C$-Isotopen-Bestimmung von körpereigenen Steroidhormonen anhand einer positiven Testosteronprobe im Vergleich zu einer Urinprobe während einer endokrinologischen Studie des gleichen Athleten zusammenfassend dargestellt. Dabei wird anhand des Syntheseweges von Testosteron deutlich, dass Vorläufer im Stoffwechsel von Testosteron wie Cholesteron oder Pregnenolon sowohl bei der positiven als auch bei der normalen Probe keine Veränderung zeigen. Dagegen zeigen bei der positiven Probe Testosteron als auch dessen Metaboliten Androsteron und Etiocholanolon eindeutig negativere Werte, die vergleichbar zu den Werten synthetischer Testosteronprodukte (-28 bis -31 $^0/_{00}$) sind.

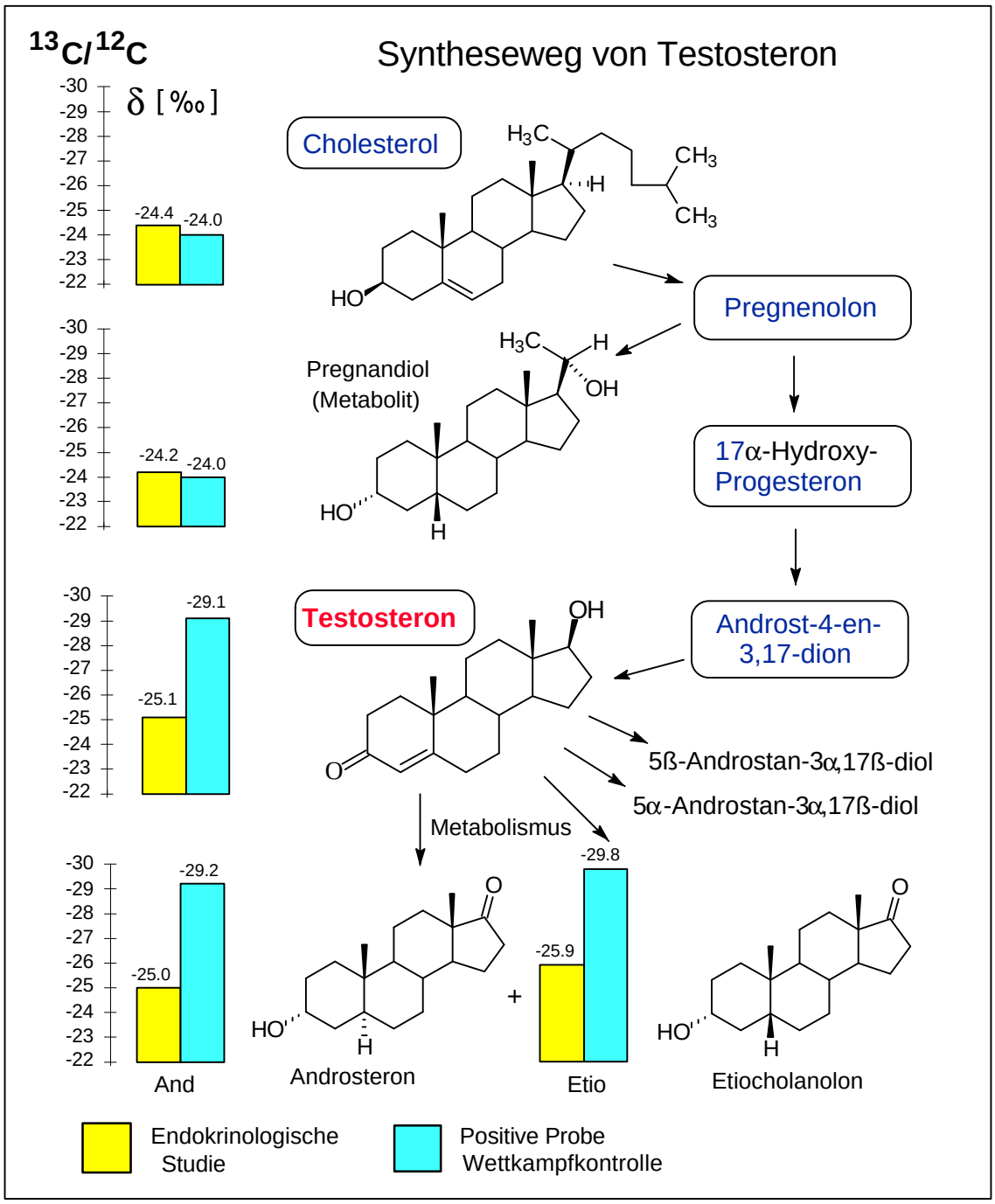


Abb.15

$^{13}C/^{12}C$-Isotopenverhältnisse endogener Steroidhormone eines Athleten, während einer endokrinologischen Studie und nach einem positiven Befund für Testosteron, im Vergleich zum Stoffwechselweg des Testosterons.

Literatur

[1] Donike M, Jaenicke L, Stratmann D, Hollmann W: Gas-chromatographischer Nachweis von stickstoffahltigen Pharmaka in wässrigen Lösungen mit dem Stickstoffdetektor. J Chromatogr, 52 (1970) 237.

[2] Hemmersbach P, de la Torre R: Stimulants, narcotics and beta-blockers: 25 years of development in analytical techniques for doping control.J.Chromatogr B Biomed Appl, 687 (1996) 221-38. Review.

[3] Donike M: N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid, ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe der silylierten Amide. J Chromatogr, 42 (1969) 103.

[4] Donike M: Acylierung mit Bis(Acylamiden): N-Methyl-bis(trifluoracetamid) und Bis(trifluoracetamid), zwei neue Reagenzien zur Trifluoracetylierung. J Chromatogr, 78 (1973) 273.

[5] Schänzer W: Metabolism of anabolic androgenic steroids. Clin Chem, 42 (1996) 1001-20. Review.

[6] Schänzer W, Donike M: Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. Anal Chim Acta, 275 (1993) 23-48.

[7] Donike M, Zimmermann J: Zur Darstellung von Trimethylsilyl-, Triethylsilyl und tert. Butyl-dimethylsilyl-enoläthern von Ketosteroiden für gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen. J Chromatogr, 202 (1980) 483.

[8] Schanzer W, Delahaut P, Geyer H, Machnik M, Horning S: Long-term detection and identification of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas chromatography-high-resolution mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Appl, 687(1) (1996) 93-108.

[9] Donike M, Bärwald K-R, Klostermann K , Schänzer W, Zimmermann J: Nachweis von exogenem Testosteron. In Sport: Leistung und Gesundheit (Hrsg. Heck H, Hollmann W, Liesen H, Rost R), Deutscher Ärzte Verlag, Köln, 1983, 293.

[10] Brand WA: High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. J Mass Spectrom, 31(3) (1996) 225-35.

[11] Becchi M, Aguilera R, Farizon Y, Flament MM, Casabianca H, James P:Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport. Rapid Commun Mass Spektrom, 8(4) (1994) 304-8.

[12] Horning S, Geyer H, Machnik M, Schänzer W, Hilkert H, Oeßelmann J: Detection of exogenous testosterone $^{13}C/^{12}C$ analyiss. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds.), Recent advances in doping analysis (4). Sport und Buch Strauß, Köln , (1997) 275-284.