

Wilhelm Schänzer

## Dopingkontrollen und aktueller Stand der Nachweismethoden

### *Doping controls and current status of detection methods*

Institut für Biochemie der DSHS Köln

#### Zusammenfassung

Nach Todesfällen im Radsport in den 60er Jahren in Verbindung mit der Einnahme von Stimulantien aus der Reihe der Amphetamine wurden 1967 Antidoping-Regeln vonseiten der Sportverbände erlassen. Das Verbot umfasste zuerst nur Stimulantien und Narkotika und wurde im Laufe der Jahre auf die Anwendung von Anabolika, Diuretika, Peptidhormone und  $\beta$ -Blocker ausgeweitet.

Die Dopingregeln werden durch systematische Dopingkontrollen nach dem Wettkampf oder außerhalb des Wettkampfes überprüft, wobei mit der Ausnahme der Peptidhormone alle verbotenen Wirkstoffe gut kontrollierbar sind. Für EPO wird eine neue direkte Nachweismethode aktuell diskutiert.

Vom IOC zugelassenen Bestimmungsmethoden basieren mit der Ausnahme der Bestimmung von Peptidhormonen, wobei Enzym-Immuno-Assays angewendet werden, auf chromatographische Trennverfahren in Verbindung mit einer massenspektrometrischen Detektion (GC/MS = Gaschromatographie/Massenspektrometrie oder LC/MS = Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie). Insbesondere im Bereich der effektiv wirksamen anabol androgenen Steroide (AAS), auch Anabolika genannt, konnte die Analytik deutliche Fortschritte durch Einführung der Hochauflösenden Massenspektrometrie zum Langzeitnachweis von körperfremden AAS und der Kohlenstoff-Isotopen-Massenspektrometrie zum Nachweis von Doping mit körpereigenen AAS wie z.B. Testosteron erzielen.

**Schlüsselwörter:** Dopingsubstanzen, Nachweisverfahren, anabole Steroide, Peptidhormone

#### Einleitung

Dopingverbote wurden erstmals in den 60er Jahren nach spektakulären Todesfällen im Radsport aufgestellt. Hierbei war der Internationale Radsportbund und das Internationale Olympische Komitee ab 1967 maßgeblich richtungswesend. Wurden zu diesem Zeitpunkt nur Substanzen aus der Gruppe der Stimulantien, z.B. Amphetamin, und Substanzen aus der Gruppe der Narkotika, z.B. Morphin, verboten, so ist die Liste der verbotenen Substanzen im Laufe der Zeit zunehmend umfangreicher geworden: 1974 wurden synthetische anabole AAS wie Metandienon und Stanozolol auf die Liste gesetzt, ab 1984 das körpereigene Testosteron, aber

#### Summary

After the deaths which occurred in cycling in the 1960s in conjunction with taking amphetamines, the sports leagues set up antidoping rules in 1967. The ban included at first only stimulants and narcotics and has been expanded over the years to include the use of anabolics, diuretics, peptide hormones and  $\beta$ -blockers.

The doping rules are checked by systematic doping controls after competitions or outside competitions, whereby all of the forbidden substances with the exception of the peptide hormones are easily controlled. A new direct method of proof is currently been discussed for EPO. With the exception of peptide hormones, for which enzyme-immunoassays are used, determination methods recognized by the IOC are based on chromatographic separation procedures coupled with mass-spectrometric detection (GC/MS= gas chromatography/mass spectrometry or LC/MS= liquid chromatography/mass spectrometry). Especially in the area of effectively active anabol-androgenous steroids (AAS), also called anabolics, analytics have been improved considerably by the introduction of high-resolution mass spectrometry for long-term proof of exogenous AAS and carbon-isotope mass spectrometry for proof of doping with endogenous-identical AAS, such as testosterone.

**Key words:** doping controls, detection methods, peptide hormones, anabolics

auch Coffein mit einem Grenzwert, ab 1988  $\beta$ -Blocker und Diuretika und schließlich ab 1989 Peptidhormone.

Die zur Zeit aktuelle Dopingregel der Medizinischen Kommission des IOC (1) (Abb. 1) haben fast alle Internationalen Fachverbände in ihren Dopingbestimmungen einfließen lassen bzw. vollständig übernommen. Die Regel des IOC ist eine pragmatische Definition des Dopings. Sie besagt: Doping ist die Verwendung von Substanzen aus den verbotenen Wirkstoffgruppen und die Anwendung verbotener Methoden. Im weiteren werden die verbotenen Wirkstoffgruppen mit einigen Beispielen aufgelistet sowie die verbotenen Methoden gekennzeichnet. Darüber hinaus sind einige Substanzen nur eingeschränkt zugelassen.

Doping ist die Verwendung von Substanzen aus den verbotenen Wirkstoffgruppen und die Anwendung verbotener Methoden.

## I. Verbotene Wirkstoffgruppen

- A. Stimulantien
- B. Narkotika (opioide Analgetika)
- C. Anabole Wirkstoffe
- D. Diuretika
- E. Peptidhormone und Analoge

## II. Verbotene Methoden

- A. Blutdoping
- B. Anwendung künstlicher Sauerstoffträger und Plasmaexpander
- C. Pharmakologische, chemische und physikalische Manipulation

## III. Wirkstoffgruppen zugelassen nur mit gewissen Einschränkungen

- A. Alkohol
- B. Cannabinoide
- C. Lokalanästhetika
- D. Corticosteroide
- E. Beta-Blocker

Abbildung 1: Dopingregel des IOC

Es muss darauf hingewiesen werden, dass es zur Zeit keine vollständigen Listen gibt, die alle verbotenen Wirkstoffe enthalten. Das IOC sowie alle Internationalen Fachverbände geben in ihren Regeln nur Beispiele zu den verbotenen Substanzen an und fügen zu jeder Gruppe den Zusatz „und verwandte Verbindungen (related substances)“ hinzu. Somit sind alle Wirkstoffe, die pharmakologisch oder strukturell zu der jeweiligen Gruppe eingeordnet werden können, auch wenn sie nicht namentlich unter den Beispielen aufgeführt sind, verboten. Diese Regel erfasst auch Substanzen, die neu auf den Markt kommen, bzw. Substanzen, deren Missbrauch bisher nicht bekannt war.

Die Überprüfung der Antidoping-Regeln erfolgen durch Kontrollen, wozu Athleten nach dem Wettkampf bzw. außerhalb des Wettkampfes (sogenannte Trainingskontrollen) eine entsprechende Urinprobe unter Aufsicht abgeben, die zu 2/3 auf eine A- und zu 1/3 auf eine B-Flasche aufgeteilt wird. Beide Proben werden nach Versiegelung in ein vom IOC akkreditiertes Analyselabor transportiert, wobei zuerst die A-Probe auf die verbotenen Substanzen hin untersucht wird. Ist das Ergebnis der A-Probe positiv, erfolgt die Benachrichtigung des Sportverbandes, der mit dem Labor einen Termin für die Analyse der B-Probe vereinbart. Zu der 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 aussprechen.

## Verbotene Substanzgruppen

### Stimulantien

Zur Gruppe der Stimulantien zählen Verbindungen wie z.B. Amphetamin, Methamphetamin, Cocain, die unter das Betäubungsmittelgesetz fallen, aber auch Verbindungen wie Ephedrin, das in sehr vielen Hustenmitteln enthalten ist. Die Wirkungen vieler dieser Substanzen, insbesondere die vom Amphetamintyp, entsprechen denen der Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin, wobei ihre Wirkungen direkt bzw. indirekt sein können. Für die verschiedenen Ephedrine gibt es Grenzwerte im Urin, so dass eine therapeutische Anwendung bis zu einem Tag vor dem Wettkampf möglich ist. Aber auch Coffein, das eigentlich als Genussmittel in vielen Getränken enthalten ist, gehört zur Gruppe der Stimulantien. Um den Genuss von coffeinhaltigen Getränken aber nicht vollständig einzuschränken, wurde für Coffein ein Grenzwert von 12 µg/ml im Urin festgelegt.

Grundsätzlich können Stimulantien in stark wirksame Substanzen und schwach wirksame Substanzen eingeteilt werden. Zur ersten Gruppe werden die meisten Amphetamin-derivate gezählt, hierzu gehören alle Stimulantien, die unter das Betäubungsmittelgesetz fallen, während zu den schwächer wirksamen Substanzen Ephedrin und Coffein gezählt werden.

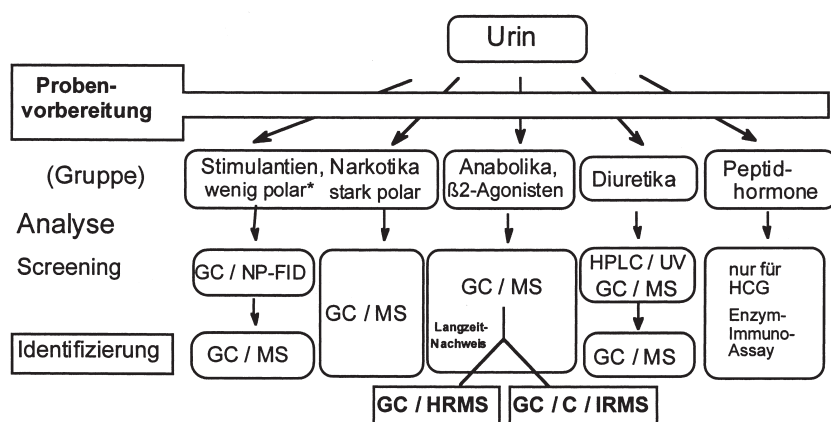
Diese Unterteilung hat einen wesentlichen Einfluss auf die Sanktion von Sportlern nach positiven Befunden. So verurteilt der Internationale Leichtathletikverband (IAAF) nach seinem Regelwerk Athleten, die ein Stimulanz aus der stark wirksamen Gruppe verwendet haben im 1. Fall bereits mit zwei Jahren, während beim Missbrauch von Substanzen aus der schwächeren Gruppe im 1. Fall nur eine Verwarnung sowie Disqualifikation vom Wettkampf ausgesprochen wird.

### Narkotika

Zur Gruppe der Narkotika gehören die opioidartigen Analgetika vom Morphintyp, z.B. Morphin, Heroin, während alle nichtopioidartigen Analgetika, wie z.B. Aspirin, Naproxen oder Diclofenac, erlaubt sind. In den letzten Jahren wurden einige Substanzen, wie z.B. Ethylmorphin, Codein oder Dextropropoxyphen, aufgrund ihrer schwachen analgetischen Wirkung im Vergleich zum Morphin von der Verbotensliste genommen. Ihre Dopingrelevanz haben diese Substanzen eigentlich darin, dass sie aufgrund ihrer schmerzstillenden Wirkung missbraucht werden können, wenn Schmerzen die sportliche Leistung limitieren. Im Vergleich zu den nichtopioidartigen Analgetika werden sie aufgrund ihrer Suchtgefahr durch staatliche Betäubungsmittelgesetze erfasst und der Handel eingeschränkt bzw. wie für Heroin ganz verboten.

### Anabole Wirkstoffe

Stimulantien sind gut kontrollierbar, da sie bei einem Missbrauch unmittelbar vor dem Wettkampf angewendet werden und in der anschließend gesammelten Urinprobe in ausreichender Menge vorliegen. Problematischer als Stimulantien ist die Gruppe der anabolen Wirkstoffe, die in der Trainings-



### Weitere Spezialprozeduren für $\beta$ -Blocker, Corticosteroide usw.

Abbildung 2: Überblick Dopinganalytik/Analyse  
 GC Gaschromatographie, MS Massenspektrometrie, HPLC Hochdruckflüssigkeitschromatographie, UV Ultraviolett Detection, NP-FID Stickstoff/Phosphor-Flammenionisationsdetektor, HRMS Hochauflösende Massenspektrometrie, GC/C/IRMS Kohlenstoffisotopen Massenspektrometrie, HCG Choriongonadotropin

phase von Athleten verwendet werden, um aufgrund der anabolen Wirkung einen verbesserten Muskelaufbau und damit verbunden eine bessere Leistung zu erzielen. Erst mit Einführung von Trainingskontrollen seit 1989 können anabole Wirkstoffe effektiv kontrolliert werden. Hierzu ist es aber notwendig, dass die Trainingskontrollen unangekündigt durchgeführt werden. Organisatorisch sind Trainingskontrollen aufwendiger als Wettkampfkontrollen, so müssen Athleten jederzeit erreichbar sein, die Ankündigungszeiten müssen kurz sein, Athleten, die häufig im Ausland trainieren, müssen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit erfasst werden, und zwar mit Kontrollen im Ausland, wie Athleten, die sich ständig am gleichen Trainingsort aufhalten. Eine internationale Vergleichbarkeit der Kontrollsysteme muss gewährleistet werden, so dass Athleten bei internationalen Veranstaltungen unter gleichen Voraussetzungen starten können. Diese Voraussetzungen werden zunehmend erfüllt und eine der größten Herausforderungen für die neue Weltantidopingagentur (WADA) wird es sein, eine internationale Vergleichbarkeit der Systeme zu gewährleisten mit entsprechenden Akkreditierungsmaßnahmen.

Die Gruppe der anabolen Wirkstoffe unterteilt sich in

- Anabol androgene Steroidhormone (AAS), auch Anabolika genannt, die sowohl körperfremd wie z.B. Metandienon, Nandrolon, Stanozolol, aber auch körpereigen sein können wie z.B. Testosteron, Dihydrotestosteron und
- in  $\beta$ 2-Agonisten.

Bezog sich das Verbot anfänglich (1974) nur auf synthetische, körperfremde Anabolika, so wurde ab 1984 auch das männliche Sexualhormon Testosteron, das der menschliche Körper selber produzieren kann, verboten.

1993 wurde die Wirkstoffgruppe der AAS erweitert und unter Einbeziehung der Substanzklasse der  $\beta$ 2-Agonisten umbenannt in die Gruppe der anabolen Wirkstoffe. Aus der Gruppe der  $\beta$ 2-Agonisten, die therapeutisch zur Behandlung von Asthma eingesetzt werden, ist Clenbuterol durch viele

Skandale in der Tiermast wohl die bekannteste Verbindung.  $\beta$ 2-Agonisten haben anabole Wirkungen und stimulieren die Proteinsynthese in der Skelettmuskulatur, wenn sie in hohen Dosierungen angewendet werden. Der Wirkungsmechanismus ist nach wie vor unbekannt.

### Diuretika

Diuretika erhöhen die Urinausscheidung und werden aus zwei Gründen im Sport missbraucht:

- In Sportarten mit Gewichtsklassen kann durch eine erhöhte Wasserausscheidung das Körpergewicht so erniedrigt werden, dass der Start in einer niedrigeren (leichteren) Wettkampfklasse möglich wird;
- zur Manipulation der abgegebenen Urinprobe.

Im letzteren Fall wird nach Gabe eines Diuretikums durch eine Erhöhung der ausgeschiedenen Urinmenge ein „Verdünnungseffekt“ von Dopingsubstanzen erzielt. Damit wird versucht, die Nachweisgrenze des analytischen Verfahrens zu unterschreiten. Der Versuch der Urinverdünnung ist mittlerweile auch durch die Regel erschwert. So muss der Kontrolleur, wenn der abgegebene Urin bei der Kontrolle eine Dichte von 1.005 unterschreiten, eine weitere Urinprobe vom Athleten verlangen. Und zwar so lange bis die Dichte oberhalb des Wertes ist.

### Peptidhormone

Eine Gruppe, die im Augenblick besonders nach der Tour de France 1998 an Aktualität gewonnen hat, sind die Peptidhormone. Nach der IOC-Regel sind als Beispiele Choriongonadotropin (HCG), Wachstumshormon (HGH) und Erythropoietin (EPO) verboten. Von diesen drei Hormonen wird zur Zeit nur die Anwendung von HCG beim Mann in den Kontrolllaboratorien routinemäßig zufriedenstellend nachgewiesen. Weitere Ausführungen zu den Peptidhormonen siehe weiter unten.

## Nachweisverfahren, aktueller Stand und Neuentwicklungen

Die verschiedenen Wirkstoffgruppen umfassen pharmakologisch wirksame Substanzen, die sich in ihrer chemischen Struktur und ihren Eigenschaften stark unterscheiden. Für einen empfindlichen Nachweis muss die Analytik diese extremen Unterschiede berücksichtigen. Dieses bedeutet zur Zeit, dass nicht alle Substanzen mit einer einzigen Analyse erfasst werden können, sondern dass Substanzen nach Wirkstoffgruppen mit ähnlich chemisch/physikalischen Eigenschaften analysiert und identifiziert werden.

Grundsätzlich wird im Rahmen der Dopinganalytik unterschieden zwischen einer – **Probenvorbereitung**, wobei die jeweiligen Wirkstoffe bzw.

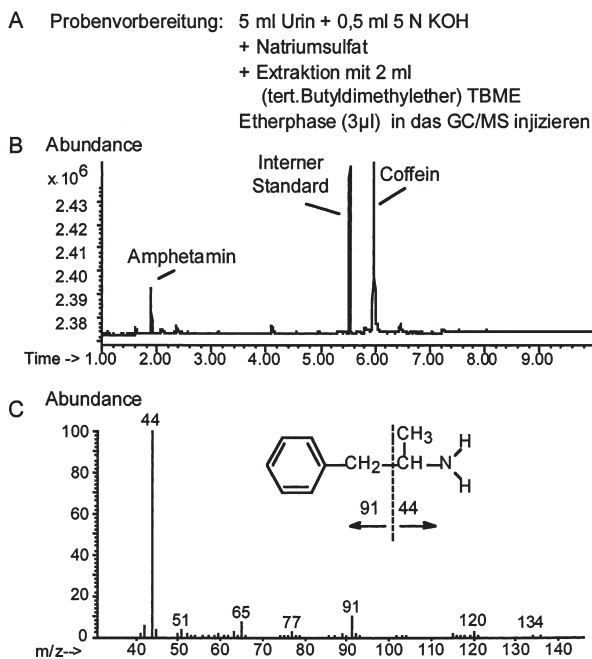


Abbildung 3: Nachweis von Amphetamin  
 A) Probenvorbereitung, B) GC/N-P-FID-Chromatogramm,  
 C) EI-Massenspektrum von Amphetamin (Molekülion 135)

deren Metaboliten aus dem Urin isoliert und für die anschließende Messung vorbereitet werden, sowie – der **analytischen Bestimmung** (Analyse) (siehe Abb.2). Die Analyse besteht mit Ausnahme der Analyse von Peptidhormonen aus einer chromatographischen Trennung und einer folgenden massenspektrometrischen (MS) Detektion. Zur chromatographischen Trennung können zwei Systeme eingesetzt werden: Gaschromatographie (GC) bzw. Flüssigkeitschromatographie (LC). Die Gesamtsysteme haben deshalb die Bezeichnung GC/MS oder LC/MS. Bei der Gruppe der Peptidhormone wird mit substanzspezifischen Enzym-Immuno-Assays gearbeitet, wobei hochreine Antikörper zur Isolierung und Bestimmung des jeweiligen Peptids eingesetzt werden.

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. Bei der Screeningmethode für anabole Wirkstoffe wird sogar mit einer extrem empfindlichen und kostenintensiven Technik der Hochauflösenden Massenspektrometrie (HRMS, high resolution mass spectrometry) analysiert.

Werden mit der Screeningmethode verdächtige Substanzen aufgefunden, so erfolgt eine zweite Isolierung und eine eindeutige Identifizierung des Wirkstoffes. Hierbei kann ein substanzspezifisches Isolierungsverfahren, zur weiteren Reduzierung der biologischen Matrix, und ein eindeutiges phy-

sikalisches Messprinzip Anwendung finden. Die eindeutige Identifizierung von Dopingsubstanzen erfolgt mit der gleichen Technik, die bereits in der Screeningmethode eingesetzt wird, nämlich mit der GC/MS bzw. LC/MS-Analyse. Weitere Entwicklungen in der Massenspektrometrie mit verschiedenen MS/MS Techniken, die neben der Hochauflösung (HRMS) bereits im Routinebetrieb verwendet werden, haben zu weiteren Verbesserungen in der Qualität der Analytik geführt.

In den folgenden zwei Beispielen und Abbildungen 3 und 4 soll das Vorgehen der Analytik zum Nachweis von Amphetamin (Stimulanz) und Nandrolon (anaboles Steroid) exemplarisch vorgestellt werden. Beide Substanzen können als niedermolekulare Verbindungen mit Molekulargewichten von 135 bzw. 274 angesehen werden. Damit lassen sie sich sehr gut, wie im übrigen alle Wirkstoffe aus den Gruppen 1-4, mit der Massenspektrometrie nachweisen.

Unterschiede in den Bestimmungsmethoden ergeben sich aber auch bei den niedermolekularen Substanzen, hinsichtlich ihres Metabolismus und der anschließenden Elimination in den Urin. So müssen Stimulantien anders erfasst werden als Anabolika.

### Beispiel Amphetamin (Abb. 3):

Amphetamin wird nach oraler Gabe überwiegend unverändert in den Urin ausgeschieden. Die Probenvorbereitung für den Nachweis von Amphetamin ist entsprechend schnell und relativ einfach. Das Amphetamin kann mit einem organischen Lösungsmittel unter alkalischen Bedingungen aus dem Urin extrahiert werden und dann direkt mit der GC-Analyse erfasst werden. Abb.3B zeigt das entsprechende Screening-Chromatogramm, wobei parallel zum MS-Detektor ein stickstoffspezifischer Detektor verwendet wird. Die Probe ist verdächtig für Amphetamin. Das entsprechende Massenspektrum (Abb.3C) liefert den eindeutigen Beweis.

### Beispiel Nandrolon (Abb. 4):

Nandrolon wird im Körper fast vollständig verstoffwechselt (2), so dass ein Nachweis nicht über Nandrolon selber, sondern über seinen Hauptmetaboliten Norandrosteron geführt wird. Dieser Metabolit ist aber gleichzeitig ein Stoffwechselprodukt der verbotenen Vorhormone von Nandrolon, nämlich Norandrostendion und Norandrostendiol. Die Analytik weist demnach mit dem Metaboliten Norandrosteron nur nach, dass ein verbotenes 19-Norsteroid missbraucht wurde, die Zuordnung zu einer der drei Wirkstoffe ist nicht möglich aber auch nicht notwendig.

Norandrosteron selber wird erst nach Konjugation mit Glucuronsäure in den Urin ausgeschieden. Diese Glucuronsäure wird enzymatisch im Rahmen der Probenvorbereitung abgespalten, so dass Norandrosteron in freier Form isoliert und bestimmt werden kann. Zur Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit wird eine zusätzliche Derivatisierung vorgenommen, wobei die Sauerstofffunktionen des Moleküls mit Trimethylsilylgruppen (TMS) umgesetzt werden. (Anmerkung: Eine verbesserte Nachweisempfindlichkeit bei AAS ist deshalb notwendig, da sie nicht im Wettkampf, sondern im Training missbräuchlich angewendet

werden. Durch den verbesserten Nachweis kann ein Missbrauch länger nachgewiesen werden, womit eine effiziente retrospektivere Beurteilung der Kontrollergebnisse ermöglicht wird.) Der derivatisierte Ansatz wird dann der GC/MS-Analyse zugeführt. Abbildung 4B zeigt ein GC/MS-Chromatogramm der Screeninganalyse einer positiven Probe, wobei mit substanzspezifischen Ionen 420 und 405, die sich aus dem Massenspektrum in Abbildung 4C ergeben, detektiert wird. Wie im Beispiel von Amphetamin liefert dann das entsprechende Massenspektrum des derivatisierten Norandrosterons (Abb. 4C) den eindeutigen Nachweis dieser Verbindung.

Die Dopinganalytik hat in den letzten Jahre wesentliche Fortschritte im Bereich des Nachweises von AAS gemacht. Hierzu zählen die Aufklärung von Langzeitmetaboliten häufig eingesetzter AAS, sowie die Anwendung neuerer empfindlicherer Techniken wie die Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS = high resolution mass spectrometry). Eine weitere Verbesserung erfolgte im Nachweis von Doping mit körperidentischen AAS wie Testosteron, wo grundsätzlich zwischen der körpereigenen Produktion eines Hormons und einer Zufuhr von außen, zwecks Doping, zu unterscheiden ist. Mit der Einführung der Kohlenstoff-Isotopen-Massenspektrometrie kann der Missbrauch von verbotenen körperidentischen Steroidhormonen wie Testosteron, aber auch Dihydrotestosteron, Androstendion, etc. besser nachgewiesen werden.

### Hochauflösende Massenspektrometrie

Die Analytik zum Nachweis körperfremder AAS wurde dahingehend verbessert, dass ihr Nachweis nach der letzten Applikation verlängert werden konnte. Ein Nachweis über Monate ist nur bei Anabolika wie Nandrolondecanoat möglich, die als Depotpräparat angewendet werden. Depotpräparate von Steroidhormonen werden in Form von Derivaten mit langkettigen Fettsäuren in die Muskulatur injiziert. Von dort aus diffundieren sie langsam in die Blutbahn und gewährleisten einen konstant erhöhten Blutspiegel über einen Zeitraum von mehreren Wochen. Dagegen werden oral angewandte Steroide schneller verstoffwechselt und die Zeitdauer des Nachweis im Urin nach einer letzten Applikation ist nur in einer kürzeren Zeitspanne nach der letzten Einnahme möglich.

Die Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS = high resolution mass spectrometry) ist eine Technik, die bereits in den Anfängen der Dopinganalytik angewendet wurde und somit keine aktuell neue Erfindung. Die HRMS-Technik war aber für eine Routineanwendung auf der Grundlage einer täglich hohen Analysenzahl nicht einsetzbar. Dieses gelang erst zu Beginn der 90er Jahre mittels moderner Computer-Software, die eine Bearbeitung und Auswertung großer Mengen an Kontrollproben ermöglichte. Ein hoher Anteil an positiven Routineproben mit Anabolika, die 1995/96 nur mit der HRMS-Technik im Vergleich zur bisherigen Technik ermittelt wurden, führte zum kurzfristigen Einsatz dieser Technik bei den Olympischen Sommerspielen 1996 in Atlanta (3,4). Das IOC forderte weiterhin von allen akkredi-

A Probenvorbereitung: 2 ml Urin + enzymatische Hydrolyse  
+ basische Extraktion mit 5 ml  
(tert. Butyldimethylether) TBME  
+ Einengen, Derivatisierung MSTFA/TMIS  
(3µl) in das GC/MS injizieren

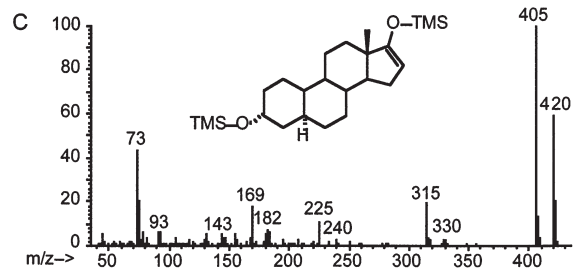
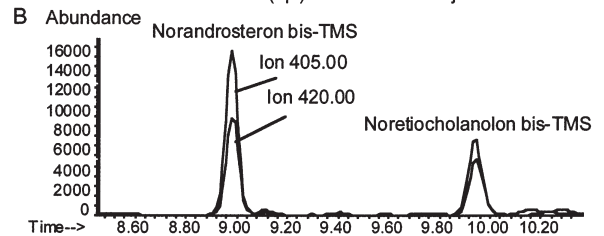


Abbildung 4: Nachweis von Nandrolon, Norandrosteron und Norandrosteron A) Probenvorbereitung, B) GC/MS-Chromatogramm mit den Ionen 420 und 405, C) EI-Massenspektrum von Norandrosteron bis-TMS (Molekülion 420)

tierten Laboratorien, ihre Analytik dahingehend zu verbessern, dass sie zukünftig die HRMS oder eine ähnliche empfindliche massenspektrometrische Technik zur Bestimmung von AAS in niedrigen Konzentrationen im Urin anwenden müssen. Die notwendige Qualität und Empfindlichkeit der Steroid-Analytik wird im Rahmen der jährlichen Reakkreditierung der Laboratorien durch das IOC überprüft.

### Kohlenstoff-(<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C)-Massenspektrometrie

Der Nachweis des körperidentischen Steroidhormons Testosteron wird seit 1984 mit einer Methode vorgenommen, wobei ein Verhältnis des in den Urin ausgeschiedenen Testosterons in Beziehung zu einem chemisch ähnlichen Steroidhormon, dem Epitestosteron, bestimmt wird (5). Das Ergebnis dieser Bestimmung ist der Testosteron/Epitestosteron-Quotient (T/E-Quotient), der für ein Individuum eine individuelle Kenngröße darstellt. Nach einer Testosteronanwendung liegt Testosteron in erhöhter Menge im Urin vor, wobei die Epitestosteronmenge aber nicht verändert wird, so dass hieraus ein erhöhter T/E-Quotient resultiert. Ist der T/E-Wert größer als sechs, werden weitere Untersuchungen eingeleitet. So können zurückliegende Kontrollergebnisse zur Beurteilung herangezogen werden oder im Rahmen einer endokrinologischen Studie über mehrere Tage der individuelle T/E-Wert eines Athleten sowie die physiologischen Schwankungen des Wertes ermittelt werden. Mit dieser Untersuchung können individuelle Stoffwechseleigenarten bzw. pathologische Einflüsse auf den T/E-Wert überprüft werden. Diese weiterführenden Untersuchungen sind zeit- und arbeitsaufwendig und ein möglicher Dopingverstoß eines Athleten kann erst nach Abschluss aller Untersuchungen beurteilt werden.

Die Methode wurde zwar immer wieder von beschuldigten Athleten kritisiert, hat sich aber als sehr robust erwiesen. Bisher sind keine physiologischen Faktoren bekannt, die den T/E-Quotienten beeinflussen können. Pathologische Einflüsse, wie z.B. ein androgenproduzierender Tumor, können allerdings im Rahmen weiterer Untersuchungen abgeklärt werden.

Die T/E-Methode kann durch eine neue Methode, die Kohlenstoffisotopen-Massenspektrometrie (IRMS = isotope ratio mass spectrometry), abgesichert werden (6,7). Hierbei wird das Verhältnis der Kohlenstoffisotope  $^{13}\text{C}$  und  $^{12}\text{C}$  von Testosteron und/oder seiner Metaboliten ermittelt. Unter Isotopen eines Elementes werden Atome verstanden, die die gleiche Anzahl an positiv geladenen Protonen aufweisen, aber eine unterschiedliche Anzahl an Neutronen haben. Das in der Natur am häufigsten vorkommende Kohlenstoffisotop hat die Masse 12 ( $^{12}\text{C}$ ) und besteht aus 6 Protonen und 6 Neutronen. Dieses Isotop stellt ca. 98,85% der gesamten Kohlenstoffisotope in der Natur dar. Das Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  besitzt 6 Protonen und 7 Neutronen und liegt mit nur 1,15% gemessen am Gesamtkohlenstoff vor. Der Quotient aus  $^{13}\text{C}$  und  $^{12}\text{C}$  von organischen Verbindungen ist dagegen notwendigermaßen keine konstante Größe. So unterscheidet sich z.B. das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von körpereigenem Testosteron vom  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis des in medizinischen Präparaten enthaltenen Testosterons. Ein Grund hierfür sind die unterschiedlichen Synthesewege des Testosterons. Das medizinisch verwendete Testosteron, das aus pflanzlichen Vorläufern (hauptsächlich Soja) gewonnen wird, hat einen anderen Syntheseweg als das Testosteron im menschlichen Organismus. Dieses ist eine Folge der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeit (kinetischer Isotopeneffekt) der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{12}\text{C}$ -Isotope bei der Synthese organischer Verbindungen, wobei in der Regel das  $^{12}\text{C}$ -Isotop aufgrund seiner geringeren Masse schneller reagiert als das  $^{13}\text{C}$ -Isotop. Als Resultat weisen die Endprodukte unterschiedliche  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse auf. Mit dieser Technik kann neben Testosteron auch die Anwendung weiterer verbotener körpereidentischer Steroidhormone wie DHEA, Androstendion und Androstendiol kontrolliert werden.

Seit Anfang 1999 ist die Anwendung der Kohlenstoffisotopen-Massenspektrometrie zum Nachweis von Doping mit körpereidentischen AAS vom IOC anerkannt.

## Peptidhormone

### Erythropoietin

Eine Kontrolle von Dopingmanipulationen mit Erythropoietin (EPO), wobei eine Unterscheidung zwischen körpereigenem EPO (humanes, hEPO) und gentechnisch hergestelltem EPO (rekombinantes, rEPO) erfolgen müsste, ist bisher im Rahmen der Dopinganalytik noch nicht möglich. Es werden derzeit zwei Ansätze zum Nachweis von EPO verfolgt: direkte sowie indirekte Nachweisverfahren. Besondere Aktualität hat zur Zeit ein direktes Nachweisverfahren, das im französischen Antidopinglabor entwickelt wurde und unter dem folgenden Punkt näher beschrieben wird.

**Direktes Verfahren:** Zwischen humanem EPO und rekombinantem EPO, das mittels gentechnisch veränderter Ovarienzellen chinesischer Hamster hergestellt wird, bestehen geringfügige Unterschiede in den Kohlenhydratketten. Hierbei zeigt sich eine Heterogenität, die sich in einer unterschiedlichen Anzahl an negativ geladenen endkettigen Zuckergruppen (Sialinsäure) äußern können bzw. in der prozentualen Verteilung der beteiligten Zucker untereinander. Die von den Autoren *Lasne und de Ceaurriz* (8) beschriebene Methodik wendet eine Auftrennung nach Ladungen an, wobei eine elektrophoretische Trennung im Rahmen einer Isoelektrischen Fokussierung erfolgt. Eine anschließende Anfärbung mittels einer gegen EPO entwickelten Antikörperreaktion ergibt ein charakteristisches Pattern im elektrischen Feld. Hierbei zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass eine Differenzierung zwischen humanem und rekombinantem EPO grundsätzlich möglich ist. Eine Arbeitsgruppe des IOC hat die bisherigen Daten der französischen Kollegen vor der Tour de France 2000 eingesehen und vorgeschlagen, dass zur endgültigen Absicherung der Methode (Validierung) noch verschiedene physiologische Einflussfaktoren (u.a. Höhenaufenthalt) auf dieses Pattern untersucht werden müssten, um falsch positive Fälle auszuschließen. Ob diese Methode dann für die Olympischen Spiele in Sydney einsetzbar ist, bleibt abzuwarten. Zumindest für die Tour de France wurde vom Internationalen Radsportbund angekündigt, dass alle Kontrollproben während der Tour tiefgefroren werden. Es wird eine Nachanalyse aller Proben erfolgen, wenn diese direkte Bestimmungsmethode anerkannt ist. Sanktionen werden bei positiven Fällen nachträglich ausgesprochen. Eine Anwendung dieser Methode zusammen mit einem möglichen indirekten Nachweisverfahren ist weiterhin denkbar.

**Indirekte Verfahren:** Bei der indirekten Bestimmung werden derzeit Blutparameter erfasst, die sich nach kurz- und langfristiger EPO-Anwendung verändern. Hierzu zählen die Gesamtzahl an Erythrozyten, der Hämatokritwert, die Gesamtzahl an Hämoglobin, die Hämoglobinkonzentration, die Anzahl an Reticulozyten, Makrozyten, die Konzentration an Eisentransferrin-Rezeptor (9) und die Serumkonzentration von EPO selber. Anhand dieser Blutparameter sollen durch Verlaufskontrollen bei Athleten individuelle Blutprofile erstellt werden, die eine Möglichkeit zur Beurteilung einer Dopingmanipulation mit EPO ermöglichen. Eine solche Multivariantenmethode wurde von einer australischen Arbeitsgruppe kürzlich publiziert (10).

### Wachstumshormon

Wie bei EPO besteht beim Wachstumshormon (HGH) die Schwierigkeit zwischen dem HGH, das der Körper selber produziert und dem HGH; das von außen, zwecks Doping, zugeführt wurde, zu unterscheiden. Das humane sowie das gentechnisch hergestellte HGH sind in ihrer Peptidstruktur, der Aminosäuresequenz, 100% identisch. Im Gegensatz zum EPO besitzt HGH keine Kohlenhydratanteile, wo Unterschiede theoretisch möglich wären.

Zur Zeit werden Nachweisverfahren für HGH entwickelt, wobei Änderungen verschiedener HGH-abhängiger Blutparameter individuell erfasst werden. Nach HGH-Anwendung kommt es zu einer Erhöhung des Insulinähnlichen Wachstumsfaktors 1 (IGF-1) sowie des Knochenwachstumsfaktors (Präcollagen III) (11,12). Weitere Methoden bestimmen die Konzentration an 22 kD Wachstumshormon (Molekulargewicht 22.000) zu einem 20 kD Wachstumshormonanalogon (Molekulargewicht 20.000) (13) oder einem 17 kD Wachstumshormon (Molekulargewicht 17.000). Da das gentechnische HGH ein Molekulargewicht von 22 kD aufweist, erhöht sich nach HGH-Applikation nur die 22 kD-Anteil, während der 20 kD und 17 kD-Anteil relativ konstant bleiben soll. Eine Differenzierung zwischen Dopinganwendung und Körperproduktion wäre demnach möglich, da bei einer natürlichen Stimulation der HGH-Produktion, wie nach körperlicher Belastung, alle HGH-Varianten erhöht produziert werden, ihre Verhältnisse aber keiner großen Änderung unterliegen. Dieses wäre eine ähnliche Methode wie die T/E-Quotienten Methode.

## Literatur

1. International Olympic Committee, Olympic Movement Anti-Doping Code, Lausanne 2000.
2. Schänzer W: Review - Metabolism of anabolic androgenic steroids. Clin. Chem., 42 (1996) 1001-1020.
3. Horning S, Schänzer W: Steroid screening using HRMS. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds.) Recent advances in doping analysis (4). Sport und Buch Strauß, Köln, (1997) 261-270.
4. Horning S, Schänzer W: Sample B: HRMS-Analyses performed at the 1996 Summer Olympic Games. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds.) Recent advances in doping analysis (5). Sport und Buch Strauß, Köln, (1998) 329-337
5. 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) 293-298.
6. 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 (1994) 304-308.
7. Horning S, Geyer H, Machnik M, Schänzer W, Hilkert A, Oebelmann J: Detection of exogenous testosterone by 13C/12C analysis. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U (eds.) Recent advances in doping analysis (4). Sport und Buch Strauß, Köln, (1997) 275-284.
8. Lasne F and de Ceaurriz J.: Recombinant erythropoietin in urine. Nature, 405 (2000) 635.
9. Gareau R, Audran M, Baynes RD, Flowers CH, Duvallet A, Senecal L, Brisson GR: Erythropoietin abuse in athletes. Nature, 380 (1996) 113.
10. Parisotto R, Gore CJ, Emslie KR, Ashenden MJ, Brugnara C, Howe C, Martin DT, Trout GJ, Hahn AG: A novel method utilizing markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant erythropoietin abuse in athletes. Haematologica, 85 (2000) 564-572.
11. Longobardi S, Keay N, Ehrnborg C, Cittadini A, Rosen T, Dall R, Boroujerdi MA, Bassett EE, Healy ML, Pentecost C, Wallace JD, Powrie J, Jorgensen JO, Sacca L: Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: a double blind, placebo-controlled study. The GH-2000 Study Group. J Clin Endocrinol Metab, 85 (2000) 1505-12.
12. Wallace JD, Cuneo RC, Baxter R, Orskov H, Keay N, Pentecost C, Dall R, Rosen T, Jorgensen JO, Cittadini A, Longobardi S, Sacca L, Christiansen JS, Bengtsson BA, Sonksen PH: Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: a potential test for GH abuse in sport. J Clin Endocrinol Metab, 84 (1999) 3591-601.
13. Wu Z, Bidlingmaier M, Dall R, Strasburger CJ: Detection of doping with human growth hormone. Lancet, 353 (1999) 895.

**Anschrift für die Autoren:  
Prof. Dr. Wilhelm Schänzer  
Institut für Biochemie  
Deutsche Sporthochschule  
Carl-Diem-Weg  
50933 Köln**