

Effiziente Kontrolle



Foto: istock / Dmytro Aksonor

Das Zentrum für präventive Dopingforschung der Sporthochschule Köln rüstet auf im Kampf gegen Dopingsünder. Für die Bestimmung verdächtiger Substanzen setzt das weltweit viel geachtete Institut auf ein vollautomatisiertes hochempfindliches Dried-Blood-Spot-LC-MS/MS-Analysensystem.

Von Guido Deußing

Wenn es um sportliche Höchstleistungen geht, das persönliche Leistungsvermögen jedoch auch ungeachtet hinreichender Trainingseinheiten unzureichend ist, sucht mancher Athlet sein Heil in der Einnahme leistungssteigernder Präparate. Mit welcher Systematik hierbei vorgegangen wird, zeigt die ARD-Dokumentation „Geheimsache Doping – Wie Russland seine Sieger macht“. Ein Fernsehteam des WDR liefert darin Beweise für flächendeckendes Doping in der russischen Leichtathletik, getragen von Trainern und Verbandsfunktionären [1].

Allerdings, nicht jedes Mittel, das die physische und/oder mentale Leistungsfähigkeit positiv beeinflussen kann, gilt als illegal, als Dopingmittel. Die Welt-Anti-Doping-Agentur

(WADA) hat ungeachtet dessen manche Substanz ihrer besonderen physiologischen Wirkung wegen unter Verdacht, im sportlichen Wettkampf zur Leistungssteigerung missbraucht zu werden. Die WADA prüft also, ob eine Ächtung und ein Verbot verdächtiger Substanzen auszusprechen sind. Auf der Beobachtungsliste der WADA befanden sich 2015 unter anderem Medikamentenwirkstoffe wie Bupropion, Phenylephrin, Phenylpropanolamin, Pipradol, Synephrin, aber auch Stimulanzien wie Koffein und Nikotin, sprich die anregenden Bestandteile von Genussmitteln wie Kaffee, Tee und Tabakerzeugnissen.



GERSTEL-DBS-A-System
(Foto: GERSTEL / Wolfram Schroll)

Doping mit Nikotin - geht das?

Im Jahr 2011 berichtete die Süddeutsche Zeitung (SZ), Wissenschaftler an der Universität Lausanne (Schweiz) hätten bei Sportlern unterschiedlicher Disziplinen erhöhte Nikotinwerte im Urin festgestellt [3]. „Es (Nikotin) verbessert nicht die Ausdauer oder Muskelkraft, versetzt aber das Gehirn in einen anderen Zustand“, zitierte die SZ damals den habilitierten Pharmakologen Fritz Sörgel, Leiter des Instituts für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung (IBMP) der Universität Nürnberg und anerkannter Dopingexperte [4]. Bei Sportarten, in denen es auf Reaktionsschnelligkeit und Konzentration ankomme, könne der Konsum von Nikotin den Sportlern Vorteile verschaffen.

Während das Rauchen von Tabakerzeugnissen nachweislich mit erheblichen gesundheitlichen Risiken verbunden ist, erweisen sich E-Zigaretten, Kau- oder Schnupftabak als attraktive Alternativen, weil sie sich offenkundig mit weniger negativen Begleiterscheinungen konsumieren lassen.

Gleiches gelte für sogenanntes Snus, eine in Norwegen und Schweden weitverbreitete Form oral konsumierten Tabaks. Dieses „Snus steht im Verdacht, zu Dopingzwecken missbraucht zu werden“, berichtet Professor Mario Thevis vom Zentrum für Präventive Dopingforschung der Sporthochschule Köln.

In Ermangelung klinischer Studien und fundierter Erkenntnisse über die Einnahme nikotinhaltiger Produkte zur Steigerung der Leistungsfähigkeit sowie generell aufgrund der Tatsache, dass die WADA Nikotin auf die Beobachtungsliste potenziell verdächtigter Dopingsubstanzen gesetzt hat, machte sich Thevis mit Kölner Kollegen sowie Wissenschaftlern des National Veterinary Institute und des Department of Chemistry im schwedischen Uppsala daran, eine „schnelle und kostengünstige“ Analyse-methode zu entwickeln, mit der sich Nikotin und seine Metaboliten nachweisen und Rückschlüsse auf die Art der Nikotinaufnahme ziehen lassen [5].

Kosten und Geschwindigkeit sind entscheidend

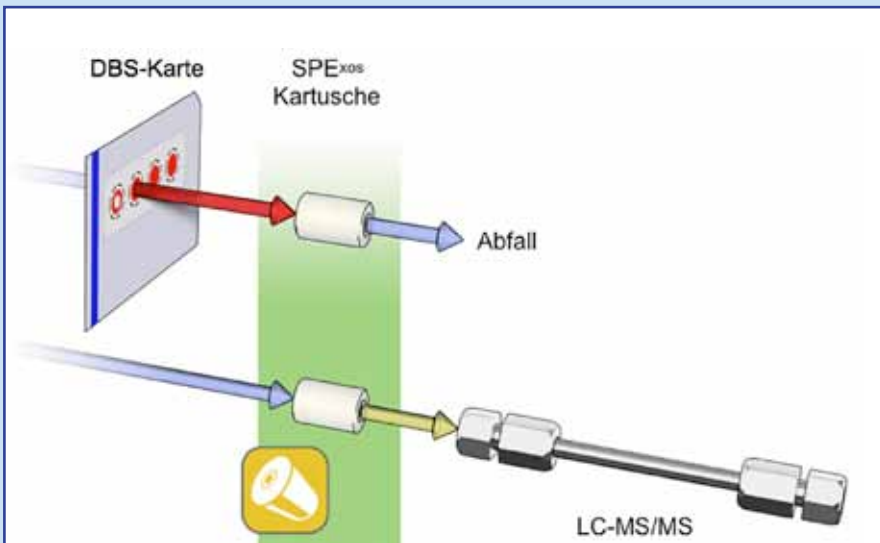
Bei der Wahl des Analysenverfahrens rückte die Dried-Blood-Spot-Analyse (DBS) in Verbindung mit einer online geschalteten Festphasenextraktion (SPE) und anschließender LC-MS/MS-Bestimmung der Analyten in das Blickfeld von Thevis et al. [6]. Die DBS hat sich laut der Wissenschaftler bereits vielfach bewährt, un-

ter anderem in der vorklinischen Pharmaforschung, im Monitoring therapeutisch verwendeter Wirkstoffe, der forensischen Toxikologie sowie zur Untersuchung von Stoffwechselerkrankungen. Ebenso gebe es inzwischen Beispiele für den Einsatz der DBS innerhalb der Dopinganalytik.

Laut Mario Thevis et al. bietet die DBS eine Vielzahl von Nutzwerten gegenüber herkömmlichen Strategien der Entnahme von Blutproben: Die DBS sei minimalinvasiv – ein Piek in die Fingerbeere genüge, um eine für die Analyse hinreichende Menge Blut (etwa 20 µL) zu entnehmen. Wenige Tropfen Blut, aufgesogen von einem geeigneten zellulosehaltigen, filterpapierartigen Trägermaterial, genügen für eine erfolgreiche Dopingkontrolle auf ausgewählte Substanzen.

Positiv zu bewerten sei zudem eine hohe Langzeitstabilität der Blutproben bei Raumtemperatur; im Zuge des rasch verlaufenden Trocknungsprozesses werden aus den Proben die Feuchtigkeit entfernt und die Enzymaktivität ausgeschaltet, schreiben die Forscher im *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [5].

Um die Analyse durchführen zu können, sind jedoch zahlreiche Schritte der Probenvorbereitung erforderlich. „Zurzeit gehören zum voranalytischen Arbeitsablauf in der Regel das Ausstanzen des getrockneten Bluts, die Extraktion mittels geeigneter Lösemittel, gelegentlich verbunden mit einer Ultraschallbehandlung, weitere Reinigungsschritte wie das Ausfällen und Entfernen enthaltener Proteine oder die Filtration und Überführung des resultierenden Extrakts in ein geeignetes Probenvial für die anschließende LC-MS/MS-Bestimmung“, schreiben Thevis et al. Um den großen manuellen Ar-



Schema des Extraktionsvorgangs bei der Dried-Blood-Spot-Analyse. (Grafik: GERSTEL)



Snus steht im Verdacht, zu Dopingzwecken missbraucht zu werden.

Foto: istock / bLAZER76



Für die DBS-Analyse verwendeter Probenträger aus einem Cellulosematerial, das aufgrund seiner Struktur eine definierte Menge an Blut pro Flächenmaß aufnimmt.



Bei der automatisierten DBS-Analyse durchströmt der Lösemittelfluss die mit Blut getränkten Flächen und extrahiert eine definierte, exakt nachvollziehbare und hinsichtlich ihres Quantums wählbare Menge Blut.

beitsaufwand zu minimieren und die DBS-Probennahme für einen hohen Probendurchsatz in der Routineanalytik zu qualifizieren, bedarf es der Automatisierung.

Automatisierung der DBS kommerziell verfügbar

Thevis et al. verwendeten für die Bestimmung von Nikotin, dessen Hauptmetaboliten Nornikotin, Kotinin und *trans*-3'-Hydroxykotinin (*trans*-3'-HCOT) sowie der Alkaloide Anabasin und Anatabin ein unter Einsatz des GERSTEL-MPS vollständig automatisiertes DBS-System (GERSTEL-DBS-A), gekoppelt an eine Online-SPE (GERSTEL-SPE^{XOS}) und angebunden an ein UHPLC-MS/MS (Thermo Dionex Ultimate 3000 / Q Exactive Plus, Thermo Scientific).

Thevis et al.: „Unter Einsatz einer Online-SPE kann der DBS direkt extrahiert, gereinigt und analysiert werden.“ Die Automatisierung der DBS-Probenvorbereitung reduziere demnach nicht allein den Arbeitsaufwand, schildern die Wissenschaftler, sondern verbessere obendrein die Extraktionsleistung (Durchflussdesorption der Analyten [6]) sowie die Empfindlichkeit der Messung, während sich das Kontaminationsrisiko reduziere.

Entwickelt wurde die Online-DBS-SPE-LC-MS/MS-Methode unter Verwendung von Standardlösungen unterschiedlicher Konzentrationen, mit denen Blutproben freiwilliger Spender, die weder geraucht noch Snus konsumiert hätten, dotiert wurden; die Validierung erfolgte gemäß den Empfehlungen der WADA und des European Bioanalysis Forum (EBF). Zur Quantifizierung der Zielanalyten wurden deuterierte Analoga eingesetzt. Um potenzielle Unterschiede in der Pharmakokinetik untersuchen zu können, wendeten Thevis et al. ihre Methode auch auf authentische Proben an, das heißt auf Blutproben, die einer Reihe von Zigaretten- und E-Zigarettenrauchern sowie Snus-Konsumenten entnommen wurden.

Unterscheidung zwischen Genusskonsum und Doping möglich

Bei der Entwicklung habe man einen besonderen Wert darauf gelegt, die Methode im „Hinblick auf Reprodu-

zierbarkeit und Beschleunigung des Arbeitsablaufes“ zu optimieren, schreiben Thevis et al. [5]. Stellschrauben bildeten hierbei insbesondere die Desorption der DBS, die Aufreinigung mittels SPE, der Lösemittelgradient sowie die massenselektive Detektion.

Es sei ihnen gelungen, berichten die Wissenschaftler, mittels der automatisierten DBS-Analyse alle Zielanalyten präzise, spezifisch und akkurat zu bestimmen. Die Bestimmungsgrenze lag für alle genannten Verbindungen bei 5 ng/mL. Aufgrund der erfolgreichen Analyse realer Blutproben von Rauchern, E-Zigaretten- und Snus-Konsumenten sei die Anwendbarkeit ihrer Methode auf Routine-Dopingkontrollen möglich. „Die Zielverbindungen wurden allesamt in den Realproben gefunden“, schreiben Thevis et al.

Überdies habe die statistische Evaluierung einen signifikanten Unterschied zwischen der Nikotinaufnahme über die Lunge (inhalativ) und die Mundschleimhaut (bukkal) ergeben, und zwar anhand des Verhältnisses von Nikotin und Nornikotin. Dies bedeute, schreiben Thevis et al., dass sich auf Grundlage pharmakokinetischer Eigenschaften sowie der Kenntnis des Nikotinstoffwechsels Rückschlüsse auf das Konsumverhalten ziehen ließen.

Quellen

- [1] www.daserste.de/information/reportage-dokumentation/dokus/videosextern/geheimsache-doping-wie-russland-seine-sieger-macht-102.html (22. 12. 2017)
- [2] www.dbs-npc.de/leistungssport-downloads.html?file=tl_files/dateien/leistungssport/anti-doping/Verbotsliste-2015-deutsch.pdf (22. 12. 2017)
- [3] www.sueddeutsche.de/sport/nikotin-missbrauch-im-sport-nachhilfe-mit-der-e-zigarette-1.1970094 (22. 12. 2017)
- [4] www.franken-wiki.de/index.php/Fritz_Sörgel (22. 12. 2017)
- [5] Laura Tretzel, Andreas Thomas, Thomas Piper, Mikael Hedeland, Hans Geyer, Wilhelm Schänzer, Mario Thevis, Fully automated determination of nicotine and its major metabolites in whole blood by means of a DBS online-SPE LC-HR-MS/MS approach for sports drug testing, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 123 (2016) 132–140
- [6] www.laborpraxis.vogel.de/bioanalytik-pharmaanalytik/articles/510434 (22. 12. 2017)