

# dopinganalytik

Im Juli 1992 wurde bei Katrin Krabbe – Weltsportlerin des Jahres 1991 – das Dopingmittel Clenbuterol nachgewiesen. Damit endete ihre Karriere.

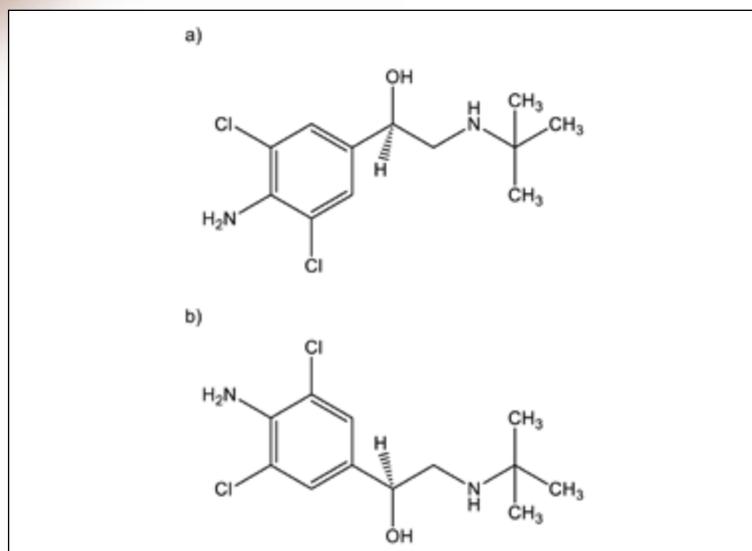
## Fleisch als Dopingfalle

Clenbuterolanalytik in Dopingkontrollproben –  
Medikamentenmissbrauch oder Lebensmittelkontamination

Prof. Dr. Mario Thevis & Prof. Dr. Wilhelm Schänzer  
Zentrum für Präventive Dopingforschung und Europäische Beobachtungsstelle  
für neue Dopingsubstanzen, Deutsche Sporthochschule Köln

**Clenbuterol, ein  $\alpha_2$ -sympathomimetisches Medikament, gehört seit mehr als 2 Jahrzehnten zur Liste der verbotenen Wirkstoffe im Sport. Aufgrund seiner mutmaßlich leistungssteigernden Wirkung wird es in Urinproben zu Dopingkontrollzwecken routinemäßig erfasst und mithilfe moderner flüssigkeitschromatografisch-massenspektrometrischer Instrumente sind Nachweisgrenzen im unteren Pikogramm-pro-Milliliter-Bereich möglich. Diese Empfindlichkeit erlaubt lange Nachweiszeiten nach Absetzen der illegal eingenommenen Substanz; sie hat zudem ein Lebensmittelkontaminationsproblem in einigen Regionen außerhalb Europas aufgezeigt, das Leistungssportler in eine schwierige Situation bringen könnte.**

Seit 1992 ist Clenbuterol, ein racemisches Gemisch von zwei Enantiomeren (Abb. 1), im Sport verboten und wird in Dopingkontrollen in der Regel mittels Flüssigkeitschromatografie/(Tandem)-Massenspektrometrie analysiert. Aufgrund seiner anabolen Eigenschaften ist Clenbuterol im Sport nicht als  $\alpha_2$ -Agonist aufgeführt, sondern in der Kategorie S1.2 (weitere anabole Wirkstoffe) und ist somit zu jeder Zeit verboten, d.h. sowohl während als auch außerhalb des Wettkampfs [1]. Da für Clenbuterol kein Grenzwert existiert, stellt die Detektion des Analyten in Dopingkontrollproben unmittel-



**Abb. 1** Strukturen der Clenbuterol-Enantiomeren: a) (-)-Clenbuterol (aktives Isomer) und b) (+)-Clenbuterol (inaktives Isomer)

Mit dem neuen Multi-Touch-Regler **Pilot ONE**® erledigen Sie Ihre Temperieraufgaben einfacher und schneller als jemals zuvor. Jetzt serienmäßig bei allen Temperiersystemen, Umwälzkühlern und Thermostaten – ohne Aufpreis!



- 5.7" TFT-Touchscreen
- USB & LAN Anschlüsse
- Einfache Bedienung
- Plug & Play-Technik
- Favoritenmenü



Mehr Informationen unter [www.huber-online.com](http://www.huber-online.com) oder gratis den neuen Katalog 2013/2014 anfordern.

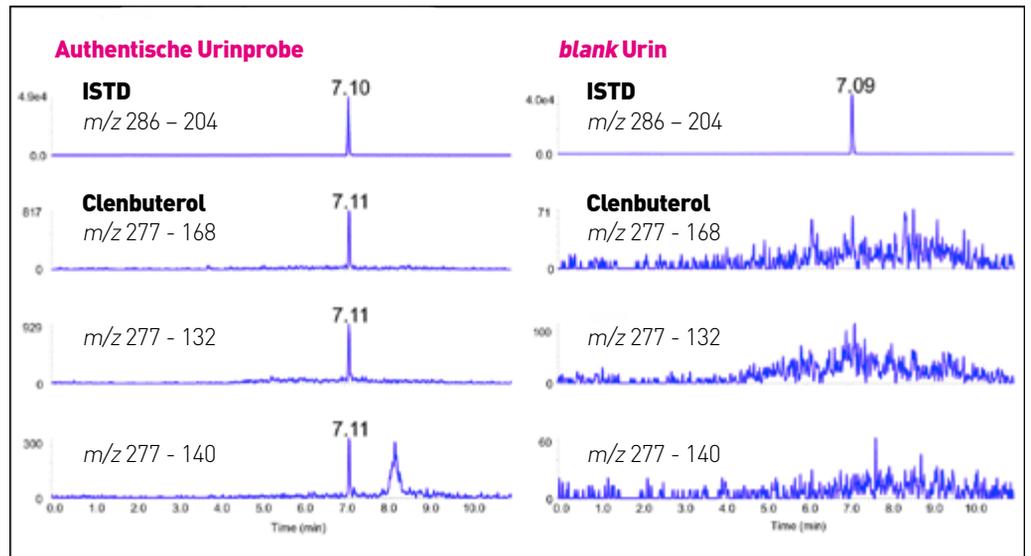
**huber**  
high precision thermoregulation

**Beratung: +49 (0)781 9603-123**

Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH • Werner-von-Siemens-Str. 1 • 77656 Offenburg  
Telefon +49 (0) 781 9603-0 • Fax +49 (0) 781 57211 • [www.huber-online.com](http://www.huber-online.com)

# dopinganalytik

bar ein so genanntes adverse analytical finding (AAF) dar. Damit möglichst lange Nachweiszeiten nach Absetzen der vermeintlich illegal eingenommenen Substanz gegeben sind, wurden in den letzten Jahren deutliche Verbesserungen in der instrumentellen Analytik angestrebt, die in sehr niedrigen Detektionslimits resultierten – mit der Konsequenz, dass zahlreiche Sportler der Einnahme von Clenbuterol überführt werden konnten. Ein typisches Beispiel einer Clenbuterol-Analytik einer Urinprobe, die ca. 3 pg/mL Clenbuterol enthält, ist in Abbildung 2 gezeigt. Die hier angewendete Methodik bestand aus einer Flüssig-Flüssig-Extraktion aus Urin in tert.-Butylmethylether mit anschließender Re-Extraktion in wässrige Salzsäure (0.06 M) und LC-MS/MS Analytik.



**Abb. 2** Extrahierte Ionenchromatogramme einer Urinprobe mit ca. 3 pg/mL Clenbuterol (links) und im Vergleich dazu ein so genannter blank Urin. Mit konventioneller Flüssigkeitschromatografie sind die Enantiomeren nicht getrennt

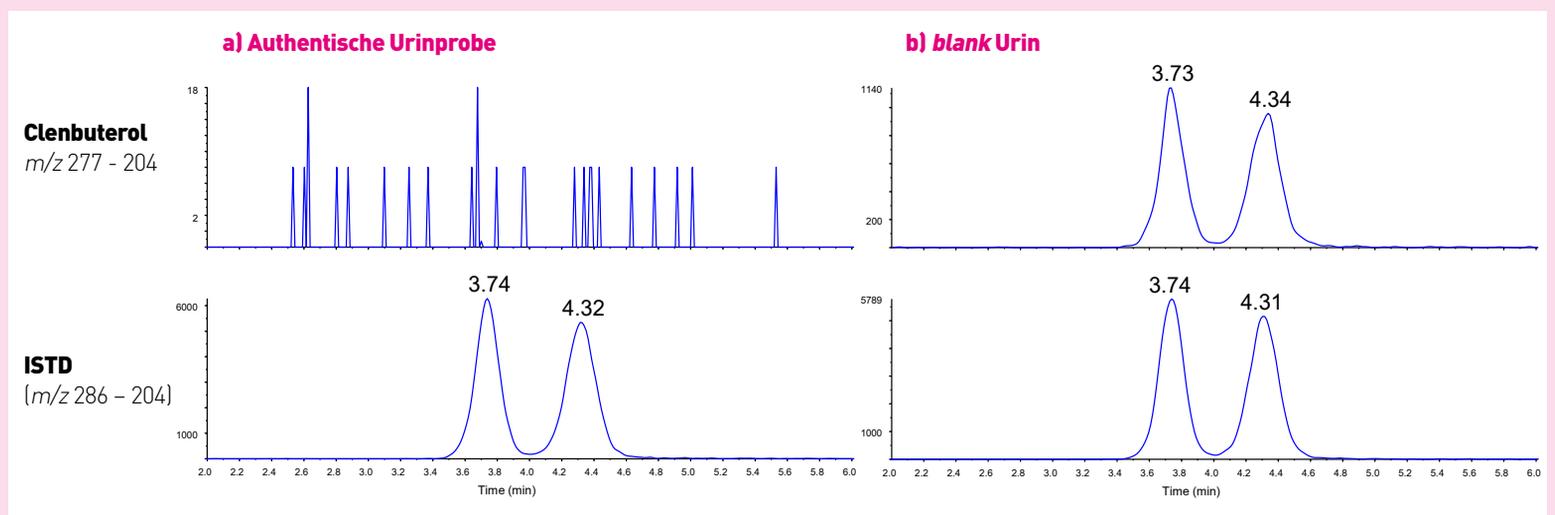
## Glenbuterol in Lebensmitteln

Die Tatsache, dass Clenbuterol anabole Wirkung insbesondere bei Hochdosierung zeigt, hat zu einem Missbrauch der Substanz auch im Bereich der Fleischproduktion geführt und konsequenterweise auch zu einem Verbot des Einsatzes in dieser Branche auf internationaler Ebene [2]. Dennoch wurden in 2010 und 2011 Athleten positiv auf Clenbuterol getestet, nachdem sie an Sportereignissen im außereuropäischen Ausland (hier China und Mexiko) teilgenommen haben, zurückzuführen auf kontaminierte Lebensmittel. 2010 war es ein Team, das von einem Wettkampf in

China nach Deutschland zurückkehrte und alle Mitglieder niedrige, jedoch deutlich messbare Clenbuterol-Konzentrationen im Urin bei Dopingkontrollen aufwiesen [3]. Eine Folgeuntersuchung mit Touristen, die unterschiedlich lange Aufenthaltszeiten in China hatten und verschiedene Orte besuchten, sowie mit in China lebenden Personen verdeutlichte die Problematik des illegalen Einsatzes von Clenbuterol in der Tiermast, da 22 der 28 getesteten Freiwilligen nach geltenden Antidopingregeln „positive“ Testergebnisse geliefert hätten. Da diese Problematik einigen Antidopingor-

ganisationen bereits vor den Olympischen Spielen 2008 bekannt war, hat es eine Warnmeldung bezüglich des Fleischkonsums in China gegeben, um Athleten vor einer unbeabsichtigten Aufnahme des Clenbuterols und somit einer „Dopingfalle“ zu bewahren. Denn eine Differenzierung einer länger zurückliegenden dopingrelevanten Gabe des Medikaments und einer geringen Dosis, aufgenommen mit kontaminierten Lebensmitteln, ist analytisch betrachtet eine besonders komplexe Aufgabe.

Eine ähnliche Situation gilt für Mexiko; auch hier haben verschiedene Lebensmittel-



**Abb. 3** Extrahierte Ionenchromatogramme einer Urinprobe mit ca. 200 pg/mL Clenbuterol (A) mit Trennung der (-) und (+)-Enantiomeren bei 3,7 und 4,3 min. Die oberen Spuren repräsentieren das Clenbuterol und die unteren den

9-fach deuterierten internen Standard, der ebenfalls als Racemat vorlag. In (B) ist im Vergleich dazu ein blank Urin gezeigt.

untersuchungen in den letzten Jahren den missbräuchlichen Einsatz von Clenbuterol in der Tiermast aufgezeigt [4, 5]. Aufmerksam auf mögliche Konsequenzen für Profisportler wurde man erstmals im Mai 2011, als fünf Spieler der mexikanischen Herren-Fußball-Nationalmannschaft mit dem  $\alpha$ -Agonisten positiv getestet wurden [6]. Als besonders problematisch zeigte sich dieser Befund, da im Folgemonat die Weltmeisterschaften der U-17-Fußball-Junioren stattfinden sollte, sodass der Weltfußballverband FIFA neben den regulären Dopingkontrollen umfangreiche Untersuchungen der Lebensmittelqualität während des Turniers organisierte. Insgesamt wurden 208 Urinproben der Sportler zu Dopingkontrollzwecken genommen. Das analytische Ergebnis präsentierte 109 Funde von Clenbuterol, wobei die Konzentrationen bis zu 1500 pg/mL Urin erreichten [7]. Die parallel genommenen Lebensmittelproben wurden in einem entsprechenden Labor in den Niederlanden geprüft und 14 von 47 zeigten zum Teil erhebliche Mengen Clenbuterol, die ausreichend für die vorgefundenen Mengen in den Dopingkontrollproben waren, sodass kein Spieler aufgrund eines Verstoßes gegen Antidopingbestimmungen sanktioniert wurde. Eine Aufschlüsselung der Proben nach Wettkampfort zeigte keinen eindeutigen Trend: Die Spielstätten waren in Guadalajara, Mexico City, Monterrey, Morelia, Pachuca, Querétaro und Torreón, wo jeweils zwischen 8 und 36 Spieler getestet wurden. Da Teams zum Teil an verschiedenen Spielorten antraten, ist ein Rückschluss auf den Ort der Kontaminationsaufnahme anhand der Urinproben nicht möglich. Als interessanter Aspekt ist jedoch festzuhalten, dass von den 24 teilnehmenden Teams fünf ausschließlich negative Dopingkontrollen produzierten, wovon zumindest eines, den Warnmeldungen Folge leistend, während des gesamten Turniers auf Fleischkonsum verzichtete.

### Analytische Herausforderung

Die Schwierigkeit der Clenbuterolproblematik im Zusammenhang mit Dopingkontrollen ist an diesen Beispielen deutlich zu erkennen und verschiedene Ansätze wurden verfolgt, um eine analytische Möglichkeit zur Differenzierung von Lebensmittelkontamination und (länger) zurückliegender absichtlicher Einnahme des Medikaments zu bieten. Ein Ansatz, der in der jüngeren

Vergangenheit verfolgt wurde, beruht auf der bereits oben erwähnten Tatsache, dass Clenbuterol als Medikament ein Racemat ist (siehe Abb. 1). Nach Verabreichung von Clenbuterol konnte in Schweinen gezeigt werden, dass im essbaren Gewebe (z. B. Muskel) das therapeutisch inaktive (+)-Stereoisomer deutlich besser angereichert wird als das (-)-Stereoisomer und somit sich mit zunehmender Absetzzeit der Clenbuterolbehandlung ein signifikanter Konzentrationsunterschied der beiden Komponenten einstellt [8].

### Enantiomerenanalytik bietet neue Möglichkeiten

Dies würde bedeuten, dass ein Unterschied zwischen der Gabe eines therapeutischen Produkts und einer Lebensmittelkontamination vorliegen und ggfs. aufgezeigt werden kann, sofern die Abreicherung des (-)-Stereoisomers des Clenbuterols ausreicht. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde eine Methodik zur Enantiomerenentrennung mit anschließender Isotopenverdünnungsanalyse per LC-MS/MS etabliert, sodass das Verhältnis der Enantiomeren bestimmt und so möglicherweise eine therapeutische Gabe bzw. eine Kontamination zu identifizieren ist. Ein Chromatogramm einer Urinprobe mit Clenbuterol nach Enantiomerenentrennung ist in Abbildung 3 dargestellt, in dem eine Basislinientrennung zu erkennen ist. Zwei Ausscheidungsstudien mit einfachen therapeutischen Clenbuterolgaben wurden durchgeführt und zeigten gemäß den Erwartungen, dass zu keinem Zeitpunkt innerhalb der getesteten 160 Stunden das Enantiomerenverhältnis (-)/(+) in Urin unter 1 lag, da auch hier das (+)-Stereoisomer eine erhöhte Retention im Gewebe aufweist und somit das (-)-Stereoisomer in deutlich höherem Maße ausgeschieden wird [9]. Nach oraler Aufnahme eines Enantiomeren-gemischs von Clenbuterol, das bereits bezüglich des (-)-Stereoisomers abgereichert ist (wie es im Falle von kontaminiertem Fleisch vorliegen könnte), ist ein erniedrigter Wert des Verhältnisses möglich, der nicht mit einer therapeutischen Verabreichung in Einklang zu bringen ist. Eliminationsstudien mit Enantiomer abgereicherten Clenbuterolgemischen sind bislang nicht bekannt; Messungen von Sportlerurinen jedoch haben gezeigt, dass zumindest in ausgewählten Fällen (-)/(+)-Verhältnisse deutlich unter 1 bestimmt werden konnten.

Was möchten Sie heute aufreinigen?



## AZURA® Präparative HPLC

Ein präparatives HPLC-System sollte so vielseitig wie möglich einsetzbar sein.

AZURA Präparative HPLC erleichtert z. B. mit Feedpumpe und Fraktioniertventil das Arbeiten mit großen Probenvolumina. Die skalierbaren Lösungen ermöglichen Gradienten, flexible Fraktionssammlung, Lösungsmittel- und Peak-Recycling, Lecküberwachung, GMP-gerechtes Arbeiten und mehr...



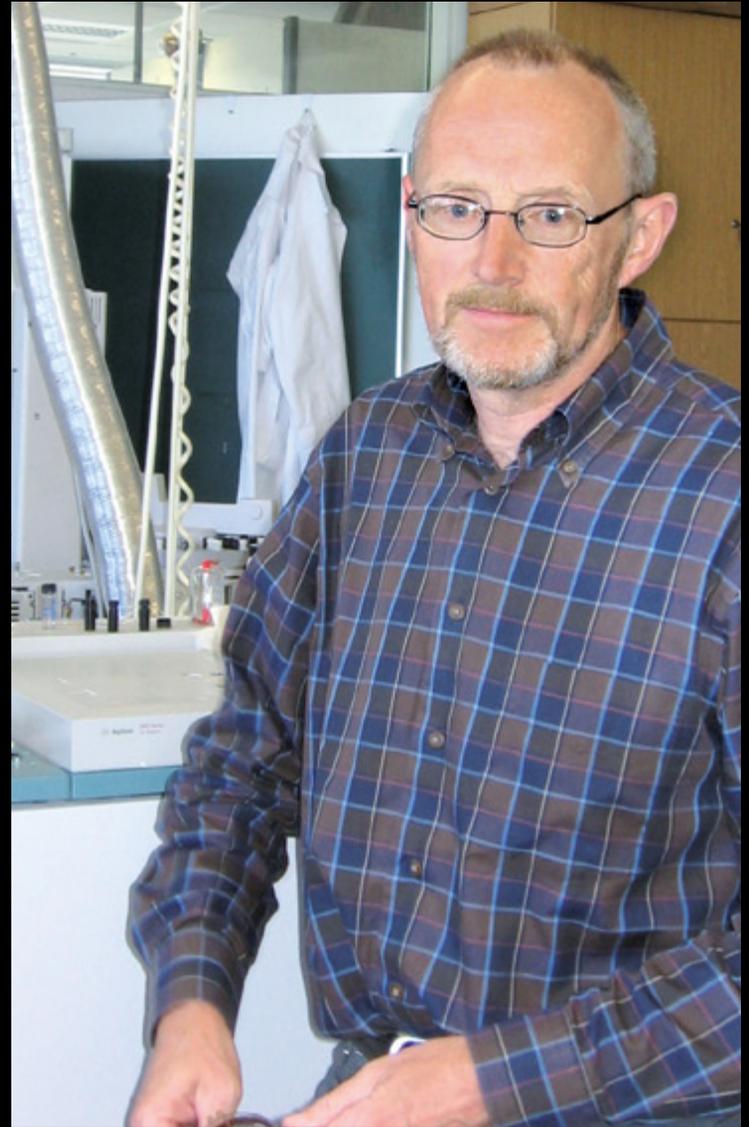
Ihre Lösung für präparative HPLC unter:



[www.knauer.net/azuraprep](http://www.knauer.net/azuraprep)



# dopinganalytik



**Mario Thevis**, geb. 1973, studierte Chemie an der RWTH Aachen sowie Sportwissenschaften an der Deutschen Sporthochschule Köln. An seine Promotion in Biochemie (2001) schloss sich ein Post-Doc Aufenthalt an der University of California Los Angeles an. 2004 habilitierte er im Fach Biochemie und ist seit 2006 Professor für präventive Dopingforschung. Er ist Sprecher des Zentrums für Präventive Dopingforschung an der Deutschen Sporthochschule Köln und Leiter der Europäischen Beobachtungsstelle für neue Dopingsubstanzen. Seine Forschungsschwerpunkte liegen im Bereich der Entwicklung neuer Nachweisverfahren für die Dopinganalytik (insbesondere neuer, in klinischen Testphasen befindlicher Wirkstoffe und Peptidhormone).

**Wilhelm Schänzer**, geb. 1951, promovierte nach Sport- und Chemiestudium an der Deutschen Sporthochschule Köln, Institut für Biochemie und habilitierte dort 1995. Seit 1997 ist er Professor für Biochemie und Leiter des Instituts für Biochemie sowie des WADA-akkreditierten Dopingkontrolllabors der Deutschen Sporthochschule Köln. Seine Forschungsschwerpunkte liegen im Bereich der Aufklärung des Steroidmetabolismus und der Identifizierung neuer Langzeitmetabolite, der Verbesserung der Analytik körpereigener dopingrelevanter Substanzen wie z.B. Erythropoietin (EPO) und Testosteron bzw. verwandter Prohormone und Aufklärung struktureller Eigenschaften neuer Designersubstanzen.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass ein Wert über 1 nicht beweisen kann, dass gedopt wurde, ein Wert unter 1 aber mit bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen nicht in Übereinstimmung mit therapeutischen Clenbuterolapplikationen beim Menschen gebracht werden kann, ist eine Überprüfung des Enantiomerenverhältnisses bei Clenbuterolfunden in jedem Falle hilfreich. Weitere, zum Teil umfangreiche Studien sind erforderlich, um die Aussage-

kraft der Enantiomerenanalytik zu prüfen; ein möglicher Ansatz scheint allerdings gegeben.

→ [thevis@dshs-koeln.de](mailto:thevis@dshs-koeln.de)

→ [schaenzer@biochem.dshs-koeln.de](mailto:schaenzer@biochem.dshs-koeln.de)

#### Literatur

- [1] World Anti-Doping Agency. The 2013 Prohibited List. 2013. [http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/Prohibited-List/\(07-01-2013\)](http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/Prohibited-List/(07-01-2013))
- [2] SGS. Clenbuterol – contaminated meat hits China, Mexico, and sports. 2012. [http://www.industrial-newsroom.com/news-detail/browse/1/t/meat-contaminated-with-clenbuterol-in-china-mexico-and-spain/?tx\\_ttnews\[backPid\]=104&cHash=cb9204c612](http://www.industrial-newsroom.com/news-detail/browse/1/t/meat-contaminated-with-clenbuterol-in-china-mexico-and-spain/?tx_ttnews[backPid]=104&cHash=cb9204c612) (16-01-2013)

- [3] S. Guddat et al. (2012), *Drug Test. Anal.* 4: 534
- [4] M. C. Estrada-Montoya et al. (2008), *Ciencia Y Tecnología Alimentaria*. 6: 130
- [5] ProMED. Clenbuterol food poisoning, meat – Mexico. 2010, (30-10-2012).
- [6] Reuters, Five Mexico internationals at Gold Cup test positive for clenbuterol. In: *The Guardian* 2011
- [7] M. Thevis et al. (2013), *Drug Test. Anal.*; in press: 10.1002/dta.1471
- [8] D. J. Smith (2000), *J. Agric. Food Chem.* 48: 6036
- [9] M. Thevis et al. (2013), *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013; 27: 507

Fotos: ©Panthermedia.net \Andrjuss Soldatos; pa-picture alliance