

Aus dem Institut für Biochemie
der Deutschen Sporthochschule Köln
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Mario Thevis

**Anwendungen der Isotopenverhältnismassenspektrometrie sowie
hochauflösender Massenspektrometrie hinsichtlich anaboler Steroide
in der Dopinganalytik**

- Metabolitenidentifizierung und Herkunftsbestimmung -

Von der Deutschen Sporthochschule Köln
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaft

angenommene Dissertation

vorgelegt von
Marlen Svenja Putz
aus Remscheid

Köln 2020

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Mario Thevis
Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln

Zweiter Gutachter: PD Dr. Andreas Thomas
Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln

Vorsitzender des Promotionsausschusses: Univ.-Prof. Dr. Mario Thevis

Datum der Disputation: 09.10.2020

Eidesstattliche Versicherungen gem. § 7 Abs. 2 Nr. 4 und 5 der Promotionsordnung der Deutschen Sporthochschule Köln, 20.02.2013:

Hierdurch versichere ich:

Ich habe diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und technischen Hilfen angefertigt; sie hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen. Wörtlich übernommene Textstellen, auch Einzelsätze oder Teile davon, sind als Zitate kenntlich gemacht worden.

Hierdurch erkläre ich, dass ich die „Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis“ der Deutschen Sporthochschule Köln eingehalten habe.

Datum, Unterschrift

Veröffentlichungen die dieser Dissertation zugrunde liegen:

- [1] M. Putz, T. Piper, M. Thevis: Identification of trenbolone metabolites using hydrogen isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography/high accuracy/high resolution mass spectrometry for doping control analysis. *Frontiers in Chemistry*. (2020) 8:435.
- [2] M. Putz, T. Piper, M. Dubois, P. Delahaut, M. Thevis: Analysis of endogenous steroids in urine by means of multi-immunoaffinity chromatography and isotope ratio mass spectrometry for sports drug testing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (2019) 411:7563-7571.
- [3] M. Putz, T. Piper, A. Casilli, F. Radler de Aquino Neto, F. Pigozzo, M. Thevis: Development and validation of a multidimensional gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry-based test method for analyzing urinary steroids in doping controls. *Analytica Chimica Acta*. (2018) 1030:105-114.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassender Überblick.....	1
1.1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.2	Trenbolon Metabolismusstudie	7
1.3	Immunoaffinitätschromatographie.....	9
1.4	Multidimensionale Gaschromatographie.....	11
1.5	Fazit und Ausblick.....	13
1.6	Literatur	15
2	Zusammenfassung.....	19
3	Abstract	21
4	Anhang	i
4.1	Abkürzungsverzeichnis.....	i

1 Zusammenfassender Überblick

1.1 Einleitung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit werden aktuelle Herausforderungen der Analytik anaboler Steroide, mit denen die Dopinganalytik gegenwärtig konfrontiert ist, thematisiert. Die hier vorgestellten Projekte wurden mithilfe der Isotopenverhältnismassenspektrometrie bearbeitet. Im ersten Projekt findet die Wasserstoffisotopenmessung in Kombination mit hochauflösender Massenspektrometrie zur Untersuchung des Metabolismus des synthetischen Steroids Trenbolon Anwendung. Im zweiten und dritten Projekt werden zwei alternative Ansätze vorgestellt, um die Herkunftsbestimmung von endogen vorkommenden Steroiden mittels der Kohlenstoffisotopie zu optimieren.

Dopingrelevanz anaboler Steroide

Anabole Steroide können wie folgt differenziert werden. Sogenannte exogene oder synthetische Steroide werden nicht im menschlichen Körper gebildet, sondern synthetisiert und beispielsweise aufgrund einer medizinischen Indikation oder zu leistungssteigernden Zwecken exogen zugeführt. Als endogen bezeichnete Steroide hingegen werden natürlicherweise im menschlichen Körper gebildet. Die Einnahme sowohl von exogenen (z.B. Trenbolon) als auch von endogen vorkommenden Steroiden (z.B. Testosteron) ist gemäß der Verbotliste (*Prohibited List*) der Welt Anti-Doping Agentur (*World Anti-Doping Agency, WADA*) im Training und während des Wettkampfes (*in- and out-of-competition*) verboten. [1] Bis 2019 wurde die Kategorie „S1 Anabolic Agents 1. Anabolic androgenic steroids (AAS)“ in „a. exogenous AAS“ und „b. endogenous AAS [...] when administered exogenously“ unterteilt. [2] Diese Unterscheidung wurde mit der Revision der *Prohibited List* in 2020 aufgehoben, seither werden AAS ohne weitere Differenzierung unter Kategorie S1 1. geführt. [1] Gemäß den Statistiken der WADA haben anabole Substanzen seit vielen Jahren eine hohe Dopingrelevanz. Im Jahr 2018 wurden 1823 positive Analyseergebnisse (*Adverse Analytical Findings, AAF*) und 168 auffällige Befunde (*Atypical Findings, ATF*) in der Klasse der anabolen Substanzen berichtet, das entspricht 44% (AAF) beziehungsweise 64% (ATF) der Befunde aller Klassen. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass diese Daten grundsätzlich keine medizinischen Ausnahmegenehmigungen (*Therapeutic Use Exemption, TUE*) berücksichtigen und somit nicht mit Verstößen gegen das Anti-Doping Regelwerk gleichzusetzen sind. [3]

Prinzip der Isotopenverhältnismassenspektrometrie

Im Zentrum dieser Arbeit steht als äußerst leistungsfähige instrumentell-analytische Technik die Isotopenverhältnismassenspektrometrie (*Isotope Ratio Mass Spectrometry, IRMS*) und findet sowohl für die Wasserstoffisotopenmessung als auch für die Kohlenstoffisotopenmessung Anwendung. IRMS-Instrumente dienen zur Bestimmung der relativen Isotopenverhältnisse, der Isotopie. Diese wird über die sogenannte δ -Skala ausgedrückt und beschreibt das Verhältnis des schwereren zum leichteren Isotop in Relation zu einem Referenzwert. δ -Werte werden in ‰ (oder mUr) angegeben. Für die $\delta^2\text{H}$ - und für die $\delta^{13}\text{C}$ -Skala stellen VSMOW (*Vienna Standard Mean Ocean Water*) beziehungsweise VPDB (*Vienna Pee Dee Belemnite per definitionem*) den jeweiligen Nullpunkt dar. [4] Für die sogenannte substanzspezifische Isotopenverhältnisanalyse (*Compound Specific Isotope Analysis, CSIA*) wurde in dieser Arbeit die Gaschromatographie/Isotopenverhältnismassenspektrometrie (GC-IRMS) eingesetzt. Im

Anschluss an die gaschromatographische Trennung der organischen Verbindungen wird der GC-Fluss durch einen Reaktor geleitet, dort erfolgt die Konversion zu niedermolekularen Gasen. Zur Bestimmung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses (*Carbon Isotope Ratio*, CIR) werden die Substanzen unter oxidativen Bedingungen zu CO₂ sowie H₂O umgesetzt. Im Falle der Bestimmung des Wasserstoffisotopenverhältnisses (*Hydrogen Isotope Ratio*, HIR) werden sie zu H₂ sowie CO reduziert. Nach der Entfernung von Wasser durch die Nafionmembran erfolgt der Einlass der Gasmoleküle in das Massenspektrometer über ein *Open Split Interface*. Über ein zweites *Open Split Interface* wird jeweils zu Beginn und zum Ende eines chromatographischen Laufes anstelle des GC-Flusses das entsprechende Gas (CO₂ bei der Kohlenstoffmessung und H₂ bei der Wasserstoffmessung) eingeleitet. Die Isotopensignatur dieses sogenannten Arbeitsgases (*Working Gas*) wird mithilfe eines Referenzmaterials kalibriert. Die Ionisation erfolgt mit Elektronenstoßionisation und die Massenselektion über ein Sektorfeld. Anschließend werden die Ionenströme simultan mithilfe eines *Faraday Cups* für jedes Isotopolog detektiert: m/z 2 (H₂) und m/z 3 (HD) für die Wasserstoffisotopie beziehungsweise m/z 44 (¹²CO₂), m/z 45 (¹³CO₂) und m/z 46 (zur Kompensation von isobaren Interferenzen) für die Kohlenstoffisotopie und ermöglicht somit eine hohe Genauigkeit. Da bei der Überführung der organischen Verbindungen zu den entsprechenden Gasmolekülen jegliche Strukturinformationen verloren gehen, ist für GC-IRMS eine hohe Peakreinheit sowie eine Basislinientrennung der einzelnen Peaks erforderlich. Zudem liegt keine homogene Verteilung der Isotopologe über den Peak vor, sondern die schweren Isotopologe sind zu Beginn des Peaks angereichert und zum Ende abgereichert (inverser chromatographischer Isotopeneffekt). Für GC-IRMS Messungen ist des Weiteren eine größere Menge Analytmoleküle im Vergleich zu GC-MS (Gaschromatographie/Massenspektrometrie) Messungen (mindestens 5 ng Kohlenstoff auf der Säule) notwendig. Darüber hinaus sind Qualitätssicherungsmaßnahmen, die eine nur geringe und konstante Isotopenfraktionierung gewährleisten, für die Bestimmung des Isotopenverhältnisses entscheidend. [4-6]

Metabolitenidentifizierung mit IRMS und HRMS von Trenbolon

Die Geräte sind für die Messung von Isotopenverhältnissen natürlicher Häufigkeit konzipiert. Durch einen unterschiedlichen ohmschen Widerstand werden ähnliche Signalintensitäten für die stark divergenten mittleren natürlichen Isotopenverhältnissen generiert. Bei der Wasserstoffmessung beispielsweise beträgt der resultierende Verstärkungsgrad 1 für m/z 2 und 1000 für m/z 3 [4] entsprechend den mittleren natürlichen Isotopenhäufigkeiten von 99,985% für Wasserstoff (H) und 0,0015% für Deuterium (D). [6] Im Rahmen des ersten Projektes dieser Arbeit wurde von der eigentlichen Intention dieser Messgeräte, der Messung natürlicher Isotopenverhältnissen, abgewichen und stattdessen wurden mit Deuterium markierte Verbindungen analysiert. Die Erhöhung des Deuteriumanteils auf 10-20% führt zu einem signifikanten Anstieg der Signalintensität auf m/z 3 und ermöglicht somit die eindeutige Identifizierung der mit Deuterium markierten Substanzen. Dieses Prinzip hat sich zur Identifizierung von Biotransformationsprodukten für *in vivo* Metabolismusstudien bewährt. [7-11]

Neben der IRMS steht im Fokus dieses Projektes die hochauflösende Massenspektrometrie (*High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) gekoppelt mit verschiedenen chromatographischen Techniken. Über HRMS gemessene akkurate Massen mit einer Auflösung von beispielsweise 60,000 FWHM (*Full Width at Half Maximum*) ermöglichen die Bestimmung der Elementarzusammensetzung, welche in Kombination mit dem Muster der Produktionen wichtige Informationen für die Strukturen der neuen Metabolite geben. [12]

Der Metabolismus des in der vorliegenden Arbeit untersuchten synthetischen Steroids Trenbolon ist von besonderem Interesse. Die Anzahl der bisher beschriebenen Metabolite ist gering und aktuell fokussiert sich die Dopinganalytik auf Epitrenbolon, Trenbolon-Glucuronid und Epitrenbolon-Glucuronid. [13, 14] Neben den Glucuroniden sind als Phase-II Metabolite zudem Sulfate [15] und Cystein-Konjugate [16] detektiert worden. Bezüglich der Nachweisbarkeit von Trenbolon und seinen Metaboliten gibt es nur wenige Daten. [16, 17] Für ihre Analyse sind GC-MS Methoden aufgrund der limitierten Stabilität der Trimethylsilyl-Derivate (TMS-Derivate) [13, 18-21] ersetzt worden und derzeit sind LC-MS Methoden [22-24] bevorzugt in Verwendung. Die Trenbolon Metabolismusstudie hat die Verlängerung der analytischen Nachweisbarkeit und die Erhöhung der Empfindlichkeit durch Identifikation neuer Metabolite zum Ziel.

Herkunftsbestimmung von endogen vorkommenden Steroiden anhand der Kohlenstoffisotopie

Im Rahmen des zweiten und dritten Projektes erfolgt die Analyse natürlicher Isotopenverhältnisse zur Herkunftsbestimmung. Testosteron (T), das exogen zugeführt oder endogen gebildet wurde, weist die gleiche Struktur auf, aber eine eindeutige Unterscheidung der Herkunft kann über das Kohlenstoffisotopenverhältnis erfolgen. Die mittlere natürliche Isotopenhäufigkeit liegt bei 98,89% für ^{12}C und 1,11% für ^{13}C . [6] Die Verteilung beider Isotope in der Umwelt und in biologischen Systemen ist durch verschiedene Prozesse beeinflusst. Für die Dopinganalytik ist insbesondere die unterschiedliche Isotopenfraktionierung in biosynthetischen Prozessen von C3- und C4-Pflanzen relevant. Die Pflanzen sind nach der Länge der Kohlenstoffkette ihrer primären Photosyntheseprodukte benannt: 3-Phosphoglycerat (C3) beziehungsweise Oxalacetat (C4). Bei der CO_2 -Fixierung wird bevorzugt das $^{12}\text{CO}_2$ Isotopolog aufgrund des kinetischen Isotopeneffektes gebunden und somit wird gegen das $^{13}\text{CO}_2$ Isotopolog diskriminiert. Diese daraus resultierende Isotopenfraktionierung tritt sowohl bei C3- als auch C4-Pflanzen auf, ist jedoch bei C3-Pflanzen stärker ausgeprägt. In Folge dessen unterscheidet sich die Kohlenstoffisotopie. Während C3-Pflanzen in der Regel einen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von -35‰ bis -25‰ aufweisen, liegt dieser für C4-Pflanzen im Bereich von -15‰ bis -10‰. Die Kohlenstoffisotopie von Steroiden, die endogen produziert werden, ist durch die Ernährung beeinflusst. Diese besteht in der Regel aus einer Mischung von C3- (z.B. Soja und Weizen) und C4-Pflanzen (z.B. Mais), welche in ihrer Zusammensetzung individuell variiert, sodass für endogenen Steroide typischerweise $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen -26‰ und -16‰ resultieren. Exogen produzierte Steroide werden nicht *de novo* synthetisiert, sondern werden ausgehend von der C3-Pflanze Soja hergestellt und haben somit in der Regel $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von kleiner -27‰. [5, 25-27] Aufgrund der großen Spannweite und der sehr kleinen absoluten Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen endogenen und exogenen Steroiden, wurden $\Delta\delta$ -Werte von der WADA zur eindeutigen Unterscheidung einer exogenen von einer endogenen Herkunft eingeführt. Diese dienen ferner der Kompensation von interindividuellen Schwankungen. $\Delta\delta$ -Werte beschreiben die Differenz der δ -Werte einer Endogenen Referenzverbindung (*Endogenous Reference Compound*, ERC) und einer Zielverbindung (*Target*

Compound, TC). Die Kohlenstoffisotopie der ERCs ist nicht von einer exogenen Steroidapplikation beeinflusst. Bei den TCs handelt es sich neben T um seine Metabolite und somit wirkt sich eine exogene Applikation auch auf die Kohlenstoffisotopie dieser Verbindungen aus. Eine exogene Herkunft ist definiert über die $\Delta\delta$ -Werte verschiedener TC- und ERC-Kombinationen gemäß dem entsprechenden Regelwerke der WADA. Diese Werte sollen im Zuge der Methodvalidierung anhand einer Referenzpopulation bestimmt werden. [28]

Als ERC werden metabolische Vorstufen (*Precursor*) des Steroidmetabolismus, die unabhängig von T sind, verwendet. T wird endogen ausgehend von Cholesterin im menschlichen Körper gebildet (Abbildung 1.1). Die Biosynthese erfolgt über verschiedene Zwischenstufen wie Progesteron und 17α -OH-Progesteron. Hiervon leiten sich die als ERC verwendeten Verbindungen Pregnan-20-3 α -diol (PD), 5α -Androst-16-en-3 α -ol (16EN) und 11-Ketoetiocholan-3 α -ol (11K) ab. Im Rahmen des Phase-I Metabolismus wird T zu Androsteron (A), Etiocholan-3 α -ol (E), 5α -Androsteron (5a) sowie 5β -Androsteron (5b) metabolisiert. Diese Substanzen werden als TCs verwendet. [28-30]

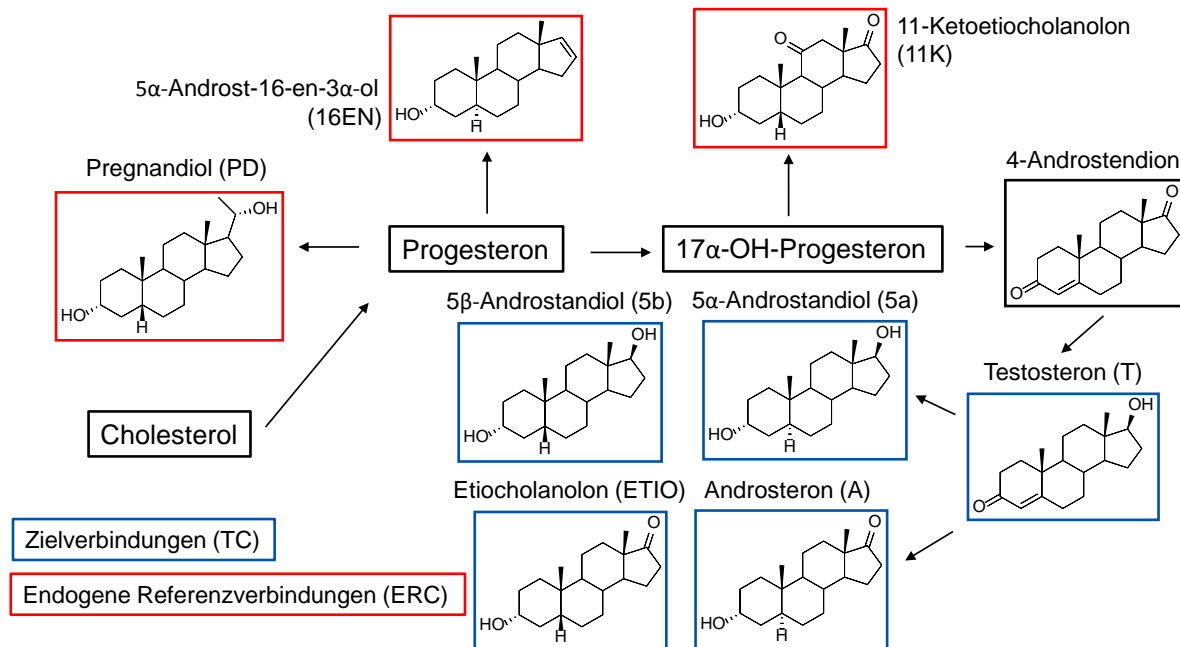


Abbildung 1.1: Vereinfachte Darstellung des Steroidmetabolismus.

In Abbildung 1.1 ist zudem 4-Androstendion als *Precursor* von T aufgeführt. [31] Im Rahmen des dritten Projektes wurde die Anwendbarkeit der entwickelten Methode (*Proof-of-Concept*) anhand einer Applikationsstudie mit 4-Androstendion demonstriert.

Über den Urin ausgeschieden werden vorwiegend die korrespondierenden Phase-II Metabolite, welche sich durch die Konjugation mit einer polaren Funktion kennzeichnen. Die beispielsweise als Glucuronid oder Sulfat vorliegenden Metabolite weisen eine höhere Hydrophilie und somit gesteigerte renale Ausscheidung auf. [14]

Das Verfahren zur Analytik von endogen vorkommenden Steroiden in Urin setzt sich nach den Regularien der WADA aus einem Screeningverfahren (*Initial Testing Procedure*) und einer Bestätigungsanalyse (*Confirmation Procedure*) zusammen. Bei der *Initial Testing Procedure* wird das sogenannte Steroidprofil bestimmt. Die Messung der Konzentrationsverhältnisse zwischen Testosteron, seinen metabolischen Vorläufern und aktiven Metaboliten erfolgt mit GC-MS(/MS) von TMS-Derivaten nach enzymatischer Spaltung mit β -Glucuronidase. Wenn ein auffälliges Steroidprofil (*Suspicious Steroid Profile*) oder ein atypischer Befund im Steroidmodul des biologischen Athletenpass (*Atypical Passport Finding*) vorliegt, wird eine *Confirmation Procedure* mittels IRMS angefordert. [32] Die IRMS-Probenvorbereitung ist aufwendig und besteht nach dem Stand der Technik aus Festphasenextraktion (*Solid Phase Extraction, SPE*), Flüssig-Flüssig-Extraktion (*Liquid-Liquid-Extraction, LLE*), enzymatischer Hydrolyse, Derivatisierung und bis zu zwei zeitintensiven Aufreinigungsschritten mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*). Daraus ergibt sich eine Probenvorbereitungszeit von 2 Tagen je Batch und eine Messzeit von mindestens 160 min je Probe. [28, 30] In die Routine des Kölner Anti-Doping Labors wurde eine weitere IRMS-Methode, als *IRMS-Pre-Confirmation* oder *IRMS-Screening* bezeichnet, etabliert, welche zwischen die beiden von der WADA vorgegebenen Verfahren geschaltet wird. Diese basiert auf den gleichen Probenvorbereitungstechniken mit ebenfalls ein bis zwei aufwendigen HPLC-Aufreinigungsschritten. Aufgrund des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes des IRMS-Screenings war es Ziel des zweiten und dritten Projektes vereinfachte Verfahren durch alternative Probenvorbereitung (Projekt 2: Immunoaffinitätschromatographie) oder leistungsstarke chromatographische Technik (Projekt 3: Multidimensionale Gaschromatographie) zu entwickeln und die sehr effiziente, jedoch aufwendige HPLC-Aufreinigung zu umgehen.

1.2 Trenbolon Metabolismusstudie

Zur Verlängerung der Nachweisbarkeit und zur Erhöhung der Empfindlichkeit des Nachweises einer Trenbolonadministration wurde im Rahmen des ersten Projektes eine humane *in vivo* Metabolismusstudie durchgeführt. Dazu wurde einem männlichen Probanden eine Einmaldosis von 10 mg fünffach-deuteriertem Trenbolon verabreicht und Urinproben wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen nach der Applikation gesammelt. Zusätzlich erfolgte die Probennahme von drei Blindwerten vor der Applikation.

Es wurden bestehende Protokolle zu einer umfangreichen Probenvorbereitung kombiniert. Im Anschluss an eine Festphasenextraktion wurde jede Probe in vier Fraktionen aufgetrennt. Durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden die unkonjugierten, die sogenannten freien Steroide, extrahiert. Es folgte in drei Schritten die sukzessive Spaltung und Extraktion verschiedener Phase-II Metaboliten. Mit Hilfe der enzymatischen Hydrolyse wurden Glucuronid-Konjugate gespalten, Sulfat-Konjugate wurden unter sauren Bedingungen hydrolysiert und unter alkalischen Bedingungen wurden Cystein-Konjugate freigesetzt. Die Fraktionen der freigesetzten Glucuronide und Sulfate wurden mit HPLC in sieben weitere Fraktionen unterteilt. Für alle Fraktionen wurde die Acetylierung als Derivatisierungstechnik angewandt. Die Identifizierung deuterierter Verbindungen erfolgte mit GC-IRMS. Alle Fraktionen mit intensiven Signalen deuterierter Verbindungen wurden zur Metabolitencharakterisierung mittels *High Performance Liquid Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry* (HPLC-HRMS) analysiert.

Dieser Ansatz ermöglichte den Nachweis von 20 Metaboliten mit relevanten Nachweisfenstern, welche in den Fraktionen der Glucuronide, Sulfate und der alkalisch labilen Steroide vorlagen. Im Rahmen des Phase-I Metabolismus haben sehr wahrscheinlich Hydroxylierungen, Dehydrierungen, Dehydratisierungen, Reduktionen und Oxidationen stattgefundenen. Die Metabolite wurden mit massenspektrometrischen Methoden insbesondere *Parallel Reaction Monitoring* Experimenten (PRM-Experimenten) charakterisiert.

Weiterführende massenspektrometrische Untersuchungen erfolgten für die vier Metabolite mit den längsten Nachweisfenstern und für diese wurden Strukturvorschläge abgeleitet. Zwei Metabolite wurden vorläufig als Glucuronid beziehungsweise Sulfat des zweifach dehydrierten Derivats von Trenbolondiol identifiziert. Beide waren für bis zu fünf Tage nachweisbar. Entsprechendes Referenzmaterial wurde durch Reduktion von Trenbolon hergestellt, es wurden dabei zwei Isomere des zweifach dehydrierten Derivats von Trenbolondiol synthetisiert. Retentionszeiten und PRM-Massenspektren der acetylierten Moleküle zeigten eine gute Übereinstimmung zwischen dem potentiellen Metaboliten aus Urin nach Hydrolyse und einem der Syntheseprodukte. Die Pseudo-MS³-Massenspektren des intakten Glucuronides und des hydrolysierten und acetylierten Metaboliten wiesen zudem eine hohe Übereinstimmung auf.

Zwei weitere Metabolite wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit als Trenbolondiketon-Glucuronid beziehungsweise -Sulfat identifiziert. Dieser Strukturvorschlag wurde durch die fehlende Acetylierung mit Pyridin/Essigsäureanhydrid bekräftigt, da nur Hydroxy-, aber keine Ketogruppen unter diesen Bedingungen derivatisiert werden. Darüber hinaus erfolgte der Vergleich der Pseudo-MS³-Massenspektren des intakten Trenbolondiketon-Sulfats mit kommerziell erhältlichem Referenzmaterial für

4,9,11-Estratrien-3,17-dion. Mit einem Nachweisfenster von 6 Tagen erwies sich Trenbolondiketon-Glucuronid als der vielversprechendste Metabolit dieser Studie.

Die in der Literatur beschriebenen Langzeitmetaboliten Epitrenbolon-Glucuronid und Trenbolon-Cysteinaddukt sowie Trenbolon-Sulfat wurden in dem durchgeführten Ausscheidungsversuch mit einer Nachweisbarkeit von nur 45 h detektiert, damit konnten die vom ehemaligen russischen Dopingkontrolllabor beschriebenen langen Nachweisfenster nicht bestätigt werden. [16]

In vorherigen Studien war der Ansatz der Metabolitenidentifizierung mittels IRMS in Kombination mit GC-HRMS (*Gas Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry*) erfolgreich. [7-11] Dieses Konzept konnte aufgrund der gaschromatographischen Eigenschaften von Trenbolon bedingt durch das konjugierten Systems der 4,9,11-trien-3-on-Struktur nur teilweise auf die hier vorliegende Studie übertragen werden. Dennoch erfolgte exemplarisch für zwei Metabolite, Epitrenbolon und das potentiell zweifach dehydrierte Derivat von Trenbolondiol, die Zuordnung der verschiedenen Messdaten der GC-TC-IRMS- und GC-HRMS Systeme.

1.3 Immunoaffinitätschromatographie

Im Rahmen des zweiten Projektes wurde die Multi-Immunoaffinitätschromatographie (IAC) eingesetzt, um die Analytik von endogen vorkommenden Steroiden mittels IRMS zu vereinfachen. IAC basiert auf spezifischen Antigen-Antikörper-Interaktionen und hat sich für die selektive Extraktion und Anreicherung von Analyten aus komplexen Matrices bewährt.

Die Immunoaffinitätschromatographie-Gele wurden in Kooperation mit der CER Groupe aus Marloie, Belgien hergestellt. Zur Generierung der polyklonalen Antikörper wurden die entsprechenden Steroide T, 11 K und PD an Position 3 mit Carboxymethyloxim (für T) beziehungsweise Glucuronsäure (für 11K und PD) aktiviert und an Rinderserumalbumin als Trägerprotein gebunden. Die erhaltenen Antigene wurden zur Immunisierung in Kaninchen eingesetzt. Das Serum wurde mit Protein A aufgereinigt und die Immunglobuline (Ig) an mit Bromcyan aktivierter Sepharose immobilisiert, sodass sich eine Konzentration vom 3 mg IgG mL⁻¹ Gel ergab.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden die Gele zunächst separat getestet. Im Anschluss wurden sie zu einem Multi-IAC-Gel in folgender Zusammensetzung kombiniert: 1 mL Anti-T-Gel, 0,5 mL Anti-11 K-Gel und 0,5 mL Anti-PD-Gel. Aufgrund von Kreuzreaktivitäten konnten mit dieser Gelmischung zusätzlich die Analyten ETIO, A, 5b und 5a extrahiert werden. Es wurden die Zusammensetzung und die Volumina der Wasch-, Elutions- und Spüllösung optimiert. Vor der IAC wurden die Proben analog zu bestehenden Protokollen aufgearbeitet. Nach der IAC war ein weiterer Aufreinigungsschritt erforderlich, um eine ausreichende Peakreinheit für alle Analyten zu erzielen. Hierzu wurde nach Derivatisierung eine SPE der acetylierten Verbindungen durchgeführt und die Analyten somit anhand ihrer Polaritäten in zwei Fraktionen unterteilt. Fraktion I enthielt die monoacetylierten Verbindungen ETIO, A, 11 K und T und Fraktion II die diacetylierten Verbindungen 5b, 5a und PD. Die Messung erfolgte simultan mit IRMS zur Bestimmung der Kohlenstoffisotopie und MS zur Überprüfung der Peakidentität und -reinheit. Abhängig von den jeweiligen Steroidkonzentrationen waren 2 bis 3 ml Urin erforderlich.

Die Methode wurde unter Berücksichtigung der entsprechenden Anforderungen der WADA validiert. [28] Die Präzision aller Verbindungen war mit Standardabweichungen zwischen 0,1‰ und 0,63‰ zufriedenstellend. Lineare Mischungsmodelle (LMM) dienen in der Isotopenverhältnismassenspektrometrie von urinären Steroiden im Bereich der Dopinganalytik zur Prüfung auf Isotopenfraktionierung. Liegt keine Isotopenfraktionierung vor, können darüber hinaus Aussagen zur Genauigkeit, Präzision und Linearität der Methode getroffen werden. LMM funktionieren auf der Grundlage der Massenbilanz und des Zwei-Phasen-Mischungsmodells und basieren auf dem Prinzip der Standardadditionstechnik. Aliquote einer Urinprobe mit natürlich enthaltenden Steroiden werden mit verschiedenen Mengen Steroidreferenzmaterial im Bereich der 0,3- bis 2-fachen endogenen Konzentration versetzt. Die graphische Darstellung erfolgt in Form von sogenannte *Keeling-Plots*. Die CIR werden dabei gegen den Quotient aus den Konzentrationen der endogenen Steroide und der Steroide in der Mischung dargestellt. Als Kenngröße fungiert die Differenz (Δ) zwischen dem über das LMM berechneten Wert und dem gemessenen Wert des zudotierten Standards. Für die entwickelte Methode liegt diese Differenz für alle Analyten unter $\pm 0,6\%$ und zeigt, dass keine Isotopenfraktionierung vorliegt. Darüber hinaus wurde unter Zuhilfenahme der Daten des LMM die kombinierte Messunsicherheit der jeweiligen Analyten bestimmt. Diese lagen mit 0,38‰ bis 0,94‰ für die meisten Analyten im Bereich

von HPLC-basierten Verfahren. Die Messunsicherheit von 5a lag mit 1,38% oberhalb des von der WADA festgelegten Grenzwertes von 1% für die *Confirmation Procedure* mit IRMS. [28] Zudem wurde die Wiederfindung der jeweiligen Analyten bestimmt. Für die höher konzentrierten Verbindungen lagen die Wiederfindungen im Bereich von 6% bis 10% und für die Verbindungen im niedrigen und mittleren Konzentrationsbereich zwischen 19% und 26%. Dieser Unterschied ermöglichte die Messung aller Verbindungen mit nur einer Injektion je Fraktion innerhalb des linearen Bereiches. Durch die intensive Spülprozedur wurden Verschleppungen vermieden und somit ist eine Wiederverwendung der Gele möglich. Diese wiesen eine Lebensdauer von bis zu 20 Wiederholungszyklen auf. Die Bestimmungsgrenze (*limit-of-quantification*, LOQ) wurde vorläufig auf 10-30 ng mL⁻¹ geschätzt.

1.4 Multidimensionale Gaschromatographie

Als zweite Alternative zur HPLC-Aufreinigung bei der Bestimmung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses endogen vorkommender Steroide wurde eine Methode mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC) entwickelt.

MDGC eignet sich besonders für die Trennung komplexer Gemische und charakterisiert sich durch die Kopplung zweier unabhängiger GCs. In der ersten Dimension wurde eine Säule mit geringer Polarität und relativ hoher Filmdicke (Optima 1 Säule; 30 m × 0,25 mm ID; 1,00 µm Filmdicke) zur Aufreinigung der Probe verwendet. Im zweiten GC wurden die Peaks auf einer Säule mit mittlerer Polarität (DB-17MS Säule; 30 m × 0,25 mm; 0,25 µm Filmdicke) getrennt. Der Transfer (*heart cutting*) der ausgewählten Peaks von der ersten auf die zweite Dimension erfolgte über eine beheizte Transferkapillare mit einem druckregulierten Flussteiler (*Deans Switch*). Die Schnittfenster waren abhängig von den zu übertragenden Analyten und betrug jeweils ca. ein bis zwei Minuten. Es wurden drei verschiedene Methoden mit optimierten Schnittfenstern und GC-Temperaturgradienten für die Bestimmung von ETIO, A und 11K sowie 16EN, 5b, 5a und PD sowie T entwickelt. Die Detektion erfolgte simultan mit IRMS und GC-MS. Zusätzlich diente ein Flammenionisationsdetektor am Ende der ersten Dimension als Monitor-detektor zur Festlegung der Schnittfenster und zur Prüfung auf Stabilität der Retentionszeiten.

Die Probenvorbereitung konnte auf einen Arbeitstag reduziert werden und setzte sich aus etablierten Schritten (SPE, LLE, enzymatische Spaltung) und der in Kapitel 1.3 beschriebenen SPE der Acetate zusammen.

Unter Berücksichtigung der entsprechenden Anforderung der WADA wurde die Methode vollständig validiert. [33] Sie weist eine gute Reproduzierbarkeit mit Standardabweichungen von 0,5‰ (*intraday*) beziehungsweise 0,8‰ (*interday*) auf. Durch LMM konnte gezeigt werden, dass die Methode die Parameter Richtigkeit, Genauigkeit und Linearität adäquat erfüllt und keine Isotopenfraktionierung hervorruft. Anhand der Daten der LMM wurde die kombinierte Messunsicherheit berechnet, welche mit Werten zwischen 0,36% und 0,91% den Anforderungen entspricht. Die Bestimmungsgrenzen sind mit 5-15 ng mL⁻¹ für die meisten konzentrationskritischen Analyten vergleichbar mit denen der Routine-methode. Für 11K jedoch wurde eine erhöhte Bestimmungsgrenze von 30 ng mL⁻¹ bestimmt, was sich auf den Waschschrift während der SPE der Acetate zurückführen ließ.

Zudem wurde eine Referenzpopulation untersucht. Dazu wurden Urinproben von 74 Athleten (30 weibliche und 44 männliche), für die ein auffälliges Steroidprofil oder ein atypischer Befund im Steroidmodul des biologischen Athletenpass vorlag, die aber mit konventioneller GC-C-IRMS nach HPLC-Aufreinigung als negativ bestätigt wurden, analysiert. Die Ergebnisse der Referenzpopulation stimmten gut mit zuvor untersuchten Referenzpopulationen überein und sowohl die δ -Werte als auch die $\Delta\delta$ -Werte folgten einer Gauss-Verteilung. Somit war es möglich Referenzlimits abzuleiten. Die Referenzlimits lagen zwischen 1,7‰ bis 5,9‰ und damit weitestgehend im Bereich von zuvor untersuchten Referenzpopulationen. Für Testosteron jedoch waren die Referenzlimits etwas höher, was auf eine erhöhte Standardabweichung zurückzuführen war. Damit zeigt Testosteron eine exogene Applikation nicht so sensitiv an wie die anderen Zielanalyten. Zudem war die Messung von Testosteron nur in 44 der

insgesamt 74 Proben der Referenzpopulation möglich aufgrund niedriger Konzentrationen und dem damit verbundenen erhöhten biologischen Untergrund bei der Chromatographie.

Die Daten der Referenzpopulation wurden zusätzlich zu einem Methodenvergleich mit der etablierten HPLC-basierten Routinemethode genutzt und über Bland-Altman-Diagramme ausgewertet. Für 5a und 5b mit PD als ERC ist die mittlere Differenz der $\Delta\delta$ -Werte beider Methoden gering und zeigt ihre hohe Vergleichbarkeit an. Für T gegen PD wurde neben der höheren Streuung ein systematischer Fehler von 1,0‰ festgestellt, welcher durch das Konzept $\Delta\delta$ -Werte in Kombination mit über eine Referenzpopulation abgeleitete Referenzwerte kompensiert wird. Die Ursache für die systematische Abweichung konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es wurde zudem eine Ausscheidungsstudie mit 4-Androstendion (*Proof-of-concept*) durchgeführt. Insgesamt ist die Methode für eine Anwendung in der Routine als IRMS-Screening geeignet (*Fit-for-purpose*).

1.5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen des ersten Projektes wurde eine *in vivo* Metabolismusstudie von deuteriertem Trenbolon durchgeführt, um die Nachweisbarkeit und Empfindlichkeit für die Dopinganalytik zu verbessern. Deuterierte Verbindungen wurden mit GC-IRMS detektiert und anschließend mit HPLC-HRMS identifiziert. Insgesamt wurden 20 Metabolite nachgewiesen, davon waren vier aufgrund ihrer Nachweisbarkeit von bis zu sechs Tagen vielversprechend. Sie wurden als Trenbolondiketon-Glucuronid, -Sulfat, zweifach dehydriertes Trenbolondiol-Glucuronid und -Sulfat mit massenspektrometrischen Methoden und im Vergleich zu Referenzmaterial vorläufig charakterisiert. Zukünftig soll durch die Untersuchung von Routinedopingkontrollproben, die mit den bisher etablierten Nachweisverfahren ein *Atypical Finding* oder *Adverse Analytical Finding* auf Trenbolon ergeben, festgestellt werden, ob durch die neuen Metaboliten ein Zugewinn für die Analytik des Trenbolonmissbrauchs in der Praxis erzielt werden kann. Wird ein positiver Beitrag festgestellt, ist die eindeutige Bestätigung der Strukturvorschläge von Interesse. Dazu wird die Synthese im größeren Maßstab wiederholt und anschließend *Nuclear magnetic resonance* (NMR) spektroskopisch untersucht und eine Ausscheidungsstudie mit undeuteriertem Trenbolon durchgeführt. Ferner könnten weitere Studien mit anderen Dosen Trenbolon und die Untersuchung einer größeren Population zur Überprüfung von interindividuellen Schwankungen berechtigt sein.

Für die eindeutige Unterscheidung exogener und endogener Steroide anhand des Kohlenstoffisotopenverhältnisses wird IRMS genutzt. Die Probenvorbereitung basiert auf einer Aufreinigung mittels HPLC und ist daher sehr aufwendig. Im Rahmen des zweiten und dritten Projektes wurde daher die Eignung von zwei alternativen Methoden als IRMS-Screening eruiert.

Zum einen wurde dazu IAC eingesetzt. IAC dient zur Isolierung von Analyten mittels Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen aus anspruchsvollen Matrices. Dazu wurden Antikörper gegen T, 11K und PD verwendet, welche zur Immobilisierung an ein Trägermaterial gekoppelt wurden. In Einklang mit den Regularien der WADA konnte ein Assay erfolgreich entwickelt und validiert werden, welcher aufgrund von Kreuzreaktivitäten zusätzlich 5b, 5a, ETIO und A erfasst. Die Methode ist etwas weniger zeitaufwendig im Vergleich zur bestehenden Routinemethode und es werden nur 3 mL anstelle von 10 mL Urin für eine Probe im mittleren Konzentrationsbereich benötigt. Eine Anwendung der IAC mit IRMS ist prinzipiell gegeben, jedoch ist dieses Verfahren aufgrund einer leicht erhöhten Messunsicherheit für 5a und einer Abnahme der Bindungskapazitäten mit zunehmender Wiederverwendung limitiert. Diese ist möglicherweise auf eine Degeneration des IAC-Gels zurückzuführen. Um die HPLC-basierte Routinemethode ersetzen zu können, sind Verbesserungen sowohl im Bereich der IAC- als auch der Trägermaterialien notwendig.

Im dritten Projekt wurde die HPLC-Aufreinigung des IRMS-Screenings durch MDGC ersetzt. MDGC kennzeichnet sich durch das *heart-cutting* ausgewählter Peaks von der ersten auf die zweite gaschromatographische Dimension und ist damit für die Aufreinigung komplexer Gemische geeignet. Das Verfahren wurde für acht verschiedene Zielanalyten beziehungsweise endogene Referenzkomponenten (zusätzlich 16EN im Vergleich zur IAC Methode) entwickelt und in Einklang mit den Richtlinien der WADA vollständig validiert. Es wurde eine Referenzpopulation untersucht und ein Methodenvergleich durchgeführt sowie die Anwendbarkeit in der Routinanalytik (*Fit-for-Purpose*) mittels eines *Proof-of-*

Concepts belegt. Im Vergleich zur HPLC-basierten Routinemethode zeigte sich, dass diese bezüglich der Peakreinheit und der methodischen Robustheit leicht überlegen ist, dennoch ist die analytische Performance der MDGC-Methode für ihre Funktion als Screeningverfahren zufriedenstellend. Bezüglich des Aufwandes ist die verringerte Analysedauer pro *Batch* von zwei auf einen Tag bei gleichzeitig reduzierter Bindung personeller Ressourcen und Messkapazität überzeugend. Die Methode wurde bereits in die Routine implementiert und in die Akkreditierung aufgenommen, sodass perspektivisch die Mehrzahl der IRMS-Routineproben mit dem MDGC-System gemessen werden kann.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit zur Optimierung der Dopingsnachweis von anabolen Steroiden beigetragen werden. Es wurden 20 Metabolite von Trenbolon identifiziert, von denen vier vielversprechende Nachweisfenster aufwiesen. Die analytische Methode zur Bestimmung einer endogenen oder exogenen Herkunft von anabolen Steroiden konnte mittels MDGC vereinfacht werden.

1.6 Literatur

- [1] World Anti-Doping Agency, The 2020 Prohibited List, Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2020_english_prohibited_list_0.pdf [17 February 2020].
- [2] World Anti-Doping Agency, The 2019 Prohibited List, Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2019_english_prohibited_list.pdf [13 February 2020].
- [3] 2018 Anti-Doping Testing Figures, Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2018_testing_figures_report.pdf [17 February 2020].
- [4] P.J.H. Dunn, J.F. Carter, Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry. 2nd Edition, FIRMS, 2018.
- [5] M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, Compound-specific Stable Isotope Analysis, Royal Society of Chemistry, 2012.
- [6] H. Schierbeek, C.H. van den Akker, L.B. Fay, J.B. van Goudoever, High-precision mass spectrometric analysis using stable isotopes in studies of children, *Mass Spectrom. Rev.* 31 (2012) 312-330.
- [7] T. Piper, J. Dib, M. Putz, G. Fusshöller, V. Pop, A. Lagojda, D. Kuehne, H. Geyer, W. Schänzer, M. Thevis, Studies on the in vivo metabolism of the SARM YK11: Identification and characterization of metabolites potentially useful for doping controls, *Drug Test. Anal.* 10 (2018) 1646-1656.
- [8] T. Piper, G. Fusshöller, W. Schänzer, A. Lagojda, D. Kuehne, M. Thevis, Studies on the in vivo metabolism of methylstenbolone and detection of novel long term metabolites for doping control analysis, *Drug Test. Anal.* 11 (2019) 1644-1655.
- [9] T. Piper, W. Schänzer, M. Thevis, Genotype-dependent metabolism of exogenous testosterone - new biomarkers result in prolonged detectability, *Drug Test. Anal.* 8 (2016) 1163-1173.
- [10] T. Piper, W. Schänzer, M. Thevis, Revisiting the metabolism of 19-nortestosterone using isotope ratio and high resolution/high accuracy mass spectrometry, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 162 (2016) 80-91.
- [11] M. Thevis, T. Piper, S. Horning, D. Juchelka, W. Schänzer, Hydrogen isotope ratio mass spectrometry and high-resolution/high-accuracy mass spectrometry in metabolite identification studies: detecting target compounds for sports drug testing, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 1904-1912.
- [12] J.H. Gross, *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*, Springer Spektrum, 2013.
- [13] D. de Boer, M.E. Gainza Bernal, R.D. van Ooyen, R.A. Maes, The analysis of trenbolone and the human urinary metabolites of trenbolone acetate by gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/tandem mass spectrometry, *Biol. Mass. Spectrom.* 20 (1991) 459-466.

- [14] W. Schänzer, Metabolism of anabolic androgenic steroids, *Clin. Chem.* 42 (1996) 1001-1020.
- [15] S. Rzeppa, G. Heinrich, P. Hemmersbach, Analysis of anabolic androgenic steroids as sulfate conjugates using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 1030-1039.
- [16] T. Sobolevsky, G. Rodchenkov, Detection of epitrenbolone glucuronide and cysteinyl conjugate of trenbolone may provide better retrospectivity of trenbolone abuse, in: W. Schänzer, M. Thevis, H. Geyer, U. Mareck (Eds.) *Recent advances in doping analysis*, Sportverlag Strauss, Cologne, 2015, pp. 26-32.
- [17] B. Spranger, M. Metzler, Disposition of 17 β -trenbolone in humans, *J. Chromatogr. B* 564 (1991) 485-492.
- [18] C. Ayotte, D. Goudreault, A. Charlebois, Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine, *J. Chromatogr. B* 687 (1996) 3-25.
- [19] E.M. Brun, R. Puchades, Á. Maquieira, Analytical methods for anti-doping control in sport: anabolic steroids with 4,9,11-triene structure in urine, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 771-783.
- [20] G. Casademont, B. Pérez, J.A. García Regueiro, Simultaneous determination, in calf urine, of twelve anabolic agents as heptafluorobutyl derivatives by capillary gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 686 (1996) 189-198.
- [21] M.A. Marques, H.M. Pereira, M.C. Padilha, F.R. de Aquino Neto, Analysis of synthetic 19-norsteroids trenbolone, tetrahydrogestrinone and gestrinone by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1150 (2007) 215-225.
- [22] M. Thevis, U. Bommerich, G. Opfermann, W. Schänzer, Characterization of chemically modified steroids for doping control purposes by electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 494-502.
- [23] M. Thevis, S. Guddat, W. Schänzer, Doping control analysis of trenbolone and related compounds using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Steroids* 74 (2009) 315-321.
- [24] E. Tudela, K. Deventer, L. Geldof, P. Van Eenoo, Urinary detection of conjugated and unconjugated anabolic steroids by dilute-and-shoot liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 95-108.
- [25] X. de la Torre, J.C. González, S. Pichini, J.A. Pascual, J. Segura, ¹³C/¹²C Isotope ratio MS analysis of testosterone, in chemicals and pharmaceutical preparations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 645-650.

- [26] J.M. Hayes, Fractionation of Carbon and Hydrogen Isotopes in Biosynthetic Processes, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 43 (2001) 225-277.
- [27] T. Piper, C. Emery, M. Saugy, Recent developments in the use of isotope ratio mass spectrometry in sports drug testing, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 433-447.
- [28] World Anti-Doping Agency, TD2019-IRMS, Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/td2019irms_final_eng_clean.pdf [24 June 2020].
- [29] L. Träger, *Steroidhormone - Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1977.
- [30] T. Piper, U. Mareck, H. Geyer, U. Flenker, M. Thevis, P. Platen, W. Schänzer, Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary steroids: method validation, reference population and application to doping control purposes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2161-2175.
- [31] E.-E. Baulieu, P. Mauvais-Jarvis, Studies on Testosterone Metabolism: II. Metabolism of Testosterone-4- ^{14}C and Androst-4-ene-3, 17-dione-1,2- ^3H , *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 1578-1584.
- [32] World Anti-Doping Agency, TD2018-EAAS, Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2018eaas_final_eng.pdf [24 June 2020].
- [33] World Anti-Doping Agency, TD2016-IRMS, Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-td2016irms-detection_synthetic_forms_eaas_by_irms-en.pdf [24 June 2020].

2 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit sind verschiedene Anwendungen der Isotopenverhältnismassenspektrometrie (IRMS) von anabolen Steroiden zur Metabolitenidentifizierung und Herkunftsbestimmung in der Dopinganalytik.

Im ersten Projekt wurde die Wasserstoffisotopenmassenspektrometrie zur Metabolismusaufklärung des synthetischen anabolen Steroids Trenbolon verwendet. Das Spektrum an bisher beschriebenen Metaboliten ist sehr begrenzt und die Routinemethoden der Dopinganalytik basieren auf dem Nachweis von Epitrenbolon, Trenbolon-Glucuronid und Epitrenbolon-Glucuronid. Das Ziel des ersten Projektes bestand darin, neue Metaboliten von Trenbolon zu identifizieren, welche potentiell die analytische Nachweisbarkeit verlängern. Es wurde eine Ausscheidungsstudie mit fünffach deuteriertem Trenbolon an einem männlichen Probanden durchgeführt, die gesammelten Urinproben wurden nach verschiedenen bereits publizierten Protokollen aufgearbeitet. Mit Gaschromatographie/Isotopenverhältnismassenspektrometrie (GC-IRMS) erfolgte die Identifizierung deuterierter Verbindungen und Fraktionen mit intensiven Signalen wurden zur Metabolitencharakterisierung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Hochauflösender Massenspektrometrie (HPLC-HRMS) analysiert. Insgesamt wurden 20 mit Deuterium markierte Verbindungen identifiziert, darunter Glucuronsäurekonjugate, Sulfate und mögliche Cystein-Konjugate. Für die vier vielversprechendsten Metabolite wurden zweifach dehydriertes Trenbolondiol sowie Trenbolondiketon, jeweils als Glucuronid und Sulfat ausgeschieden, vorläufig als Strukturen identifiziert. Diese Metabolite waren bis zu fünf beziehungsweise sechs Tage nachweisbar. Die Strukturaufklärung erfolgte sowohl anhand der hydrolysierten und acetylierten Derivate als auch anhand der intakten Phase-II Metabolite mit Massenspektrometrie im *Parallel Reaction Monitoring* und Pseudo-MS³ Modus. Die Produktionenmassenspektren wurden mit kommerziell erhältlichem und synthetisiertem Referenzmaterial verglichen.

Natürlich vorkommende, aber synthetisch hergestellte Steroide stehen im Focus der anderen beiden Projekte. Endogene und exogene Steroide können anhand der Kohlenstoffisotopie mittels Isotopenverhältnismassenspektrometrie eindeutig unterschieden werden. Methoden auf dem Stand der Technik basieren auf bis zu zwei HPLC-Aufreinigungsschritten und sind sehr zeit- und arbeitsintensiv. Um den manuellen Aufwand und die Analysedauer zu reduzieren, wurden zwei verschiedene Techniken angewandt, welche die HPLC-Aufreinigung der etablierten Methoden umgehen.

Die Technik der Multi-Immunoaffinitätschromatographie (IAC) wurde im zweiten Projekt verwendet. Das Prinzip beruht auf einer selektiven Antigen-Antikörper-Bindung. Für diese Methode wurden drei Antikörper gegen Testosteron (T), Pregnanolol und 11-Ketoetiocholanolon zu einem Multi-Immunoaffinitätschromatographiegel kombiniert. Aufgrund von Kreuzreaktivitäten konnten zusätzlich Etiocholanolon, Androsteron, 5 β -Androstandiol und 5 α -Androstandiol extrahiert und somit in den Assay mit aufgenommen werden. Die Methode wurde unter Berücksichtigung der Parameter Präzision, Wiederfindung und Verschleppung validiert. Zudem wurden Lineare Mischungsmodelle durchgeführt.

Für die Bestimmung der Kohlenstoffisotopie wurde als alternative Technik die multidimensionale Gaschromatographie (MDGC) im Rahmen des dritten Projektes verwendet. Bei der MDGC werden zwei GCs mit Chromatographiesäulen unterschiedlicher Selektivität miteinander verbunden. Ausgewählte

Peaks werden druckgesteuert von der ersten auf die zweite Dimension zur Verbesserung der Peakreinheit übertragen. Zusätzlich zu den im zweiten Projekt gemessenen Analyten wurde auch 5 α -Androsten-16-en-3 α -ol analysiert. Die Methode wurde ebenfalls nach den Kriterien der WADA validiert und es wurden Lineare Mischungsmodelle durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Referenzpopulation bestehend aus 74 Athletenproben untersucht. Anhand dieser Daten wurden Referenzlimits abgeleitet und diese wurden zusätzlich für einen Methodenvergleich zu der etablierten Methode genutzt. Aufgrund von Matrixeffekten und geringerer Präzision sind die Referenzlimits für $\Delta\delta^{13}\text{C}$ -Werte unter Verwendung von T als Zielanalyt vergleichsweise hoch, daher kann eine exogene Steroidapplikation mit T nicht so sensitiv angezeigt werden wie mit den anderen Zielverbindungen. Eine Ausscheidungsstudie mit 4-Androstendion diene als *Proof-of-concept*.

Beide Methoden erzielten eine Reduktion des Zeitaufwandes im Vergleich zu der etablierten Routinemethode. Bei dem IAC Ansatz konnte zudem das benötigte Urinvolumen reduziert werden, wogegen die MDGC Methode vor allem von dem reduzierten Arbeitsaufwand profitiert. Allerdings ist das HPLC-basierte Verfahren bezüglich der Aufreinigung und der Robustheit überlegen. Der IAC Ansatz wird nur bedingt als ergänzende Methode vorgeschlagen, wobei verbesserte IAC Materialien oder alternative Trägermaterialien eine Routineanwendung ermöglichen könnte. Die MDGC Methode hingegen ist für eine Anwendung in der Routineanalytik geeignet. Dort kann sie als sogenanntes IRMS-Screening eingesetzt werden, mit der auffällige Proben der *Initial Testing Procedure* (Steroidprofil) gemessen werden. Die CIR-Werte werden im Anschluss mit der *Confirmation Procedure* verifiziert.

3 Abstract

Within this thesis, isotope ratio mass spectrometry (IRMS) was applied for the analysis of anabolic steroids for metabolite identification and tracing the origin for doping control purposes.

In the first project, isotope ratio mass spectrometry measuring hydrogen was used to investigate the metabolism of the synthetic anabolic steroid trenbolone. The number of previously reported metabolites is limited and most routine doping testing methods rely on targeting epitrenbolone, trenbolone glucuronide and epitrenbolone glucuronide. For that reason, the objective of this project was to probe for new metabolites of trenbolone, which potentially support the extension of the detection window. An elimination study with 5-fold deuterated trenbolone administered to one healthy male volunteer was conducted and collected urine sample were prepared by combining published protocols. Samples of interest were identified by their diagnostic deuterium content with gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry (GC-IRMS) and metabolite characterization was performed with high performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS). In total, twenty deuterium-labelled compounds were identified including glucuronic acid, sulfo- and potential cysteine conjugates. For the four most promising metabolites, structures were tentatively assigned as a two-fold dehydrogenation product of trenbolone-diol and trenbolone-diketone excreted as glucuronic acid and sulfo-conjugates. The metabolites were detectable for 5 respectively 6 days. Structural characterization was conducted of the hydrolysed and acetylated derivatives and of the intact phase-II conjugates by mass spectrometry using parallel reaction monitoring and pseudo-MS³ experiments. Product ion mass spectra were compared to reference material which was commercially available or produced by in-house synthesis.

Naturally occurring, but synthetically derived steroids were in the focus of both other projects. Endogenous and exogenous steroids can be unambiguously distinguished by the carbon isotope ratio determined by gas chromatography isotope ratio mass spectrometry. State-of-the-art methods are very laborious and time-consuming including up to two HPLC purification steps. In order to reduce manual workload and overall batch analysis time, two alternative techniques were used to omit the HPLC purification of the established methods.

For that purpose, multi-immunoaffinity chromatography (IAC) was applied within the second project. This technique exploits specific antibody-immunogen interactions and within this method, antibodies against testosterone (T), pregnanediol and 11-ketoetiocholanolone were combined into a multi-immunoaffinity gel. Due to cross reactivities also etiocholanolone, androsterone, 5 β -androstanediol and 5 α -androstanediol were co-extracted and included in the testing protocol. The method was validated by determining precision, recovery and carry over. Additionally, linear mixing models were performed.

Multidimensional gas chromatography (MDGC) was used as alternative technique for the determination of the carbon isotope ratios in the third project. MDGC employs two gas chromatographs with columns of different chromatographic selectivity connected by a heated transfer line and a pressure controlled transfer device which allows cutting a selected segment on the second dimension in order to improve separation capability. Within this project, 5 α -androst-16-en-3 α -ol was analysed additionally. The method was also validated according to the regulations of the World Anti-Doping Agency. Moreover, a reference

population comprising of 74 athletes' samples was investigated. This was employed to deduce reference limits and to compare this approach to the established routine method. On account of matrix offset and reduced precision, $\Delta\delta^{13}\text{C}$ values comprising T result in comparable high reference limits and consequently, T will be not as sensitive as other target compounds. As proof-of-concept, an elimination study with androst-4-ene-3,17-dione was examined.

Both methods achieve a substantial reduction of the overall batch analysis time compared to the established method using HPLC purification. For the IAC approach, also the required urine volume was reduced, while the MDGC assay benefits from the low manual workload. Nevertheless, the HPLC-based method was superior in purification quality and robustness. The IAC approach can be suggested as complementary method, but improved IAC material or alternative resins may enhance its utility. The MDGC method is appropriate for an application to routine doping control analysis as IRMS screening for analysing suspicious samples from the *Initial Testing Procedure* (Steroid Profile). For confirmation purposes, the HPLC-based method is suggested.

4 Anhang

4.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Androsteron
AAF	<i>Adverse Analytical Findings</i> , positive Analyseergebnisse
AAS	<i>Anabolic Androgenic Steroids</i> , anabole androgene Steroide
ATF	<i>Atypical Findings</i> , auffällige Befunde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
CE	<i>Collision Energy</i>
CIR	<i>Carbon Isotope Ratio</i> , Kohlenstoffisotopenverhältnis
CSIA	<i>Compound Specific Isotope Analysis</i> , substanzspezifische Isotopenverhältnisanalyse
E	Etiocholanolon
ERC	<i>Endogenous Reference Compound</i> , Endogene Referenzverbindung
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i>
GC	Gaschromatographie
GC-IRMS	Gaschromatographie/Isotopenverhältnismassenspektrometrie
GC-C-IRMS	<i>Gas Chromatography/Combustion/Isotope ratio mass spectrometry</i>
GC-MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GC-HRMS	<i>Gas Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry</i>
GC-MS/MS	Gaschromatographie/Tandemmassenspektrometrie
GC-TC-IRMS	<i>Gas Chromatography/Thermal Conversion/Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>
HIR	<i>Hydrogen Isotope Ratio</i> , Wasserstoffisotopenverhältnis
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-HRMS	<i>High Performance Liquid Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> , hochauflösende Massenspektrometrie
IAC	Immunoaffinitätschromatographie
ID	<i>Inner Diameter</i> , Innendurchmesser

4.1 Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobuline
IRMS	<i>Isotope Ratio Mass Spectrometry</i> , Isotopenverhältnismassenspektrometrie
LMM	<i>Linear Mixing Model</i> , Lineares Mischungsmodell
LLE	<i>Liquid-Liquid-Extraktion</i> , Flüssig-Flüssig-Extraktion
LOQ	<i>Limit-of-Quantification</i> , Bestimmungsgrenze
MDGC	Multidimensionale Gaschromatographie
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PD	Pregnandiol
PRM	<i>Parallel Reaction Monitoring</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> , Festphasenextraktion
T	Testosteron
TC	<i>Target Compound</i> , Zielverbindung
TMS-	Trimethylsilyl-
TREN	Trenbolon
TUE	<i>Therapeutic Use Exemption</i> , medizinischen Ausnahmegenehmigungen
VPDB	<i>Vienna Pee Dee Belemnite</i>
VSMOW	<i>Vienna Standard Mean Ocean Water</i>
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i> , WADA Welt Anti-Doping Agentur
5a	5 α -Androstandiol
5b	5 β -Androstandiol
16EN	5 α -Androst-16-en-3 α -ol
11K	11-Ketoetiocholanolon