

Identifizierung und quantitative Bestimmung des
Plasmavolumenexpanders Dextran und
des Diuretikums Mannitol in Humanurin
mittels Flüssigkeitschromatographie / Massenspektrometrie und
Gaschromatographie / Massenspektrometrie
zu Dopingkontrollzwecken

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sven Guddat

aus

Köln

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Galensa
2. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele M. König
Tag der Promotion: 05.05.2006
Erscheinungsjahr: 2006

"Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert"

meinen Eltern

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Veröffentlichungen

GUDDAT S, THEVIS M, SCHÄNZER W (2005). Identification and Quantification of the Plasma Volume Expander Dextran in Human Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry of enzymatically derived Isomaltose. *Biomedical Chromatography* 19: 743-750

Tagungsbeiträge

GUDDAT S, THEVIS M, SCHÄNZER W (2004). Detection and Quantification of the Plasma Volume Expander Dextran in Human Urine (Vortrag). 22nd Workshop on Dope Analysis, Cologne. In: SCHÄNZER W, GEYER H, GOTZMANN A, MARECK U (eds.). *Recent Advances in Doping Analysis* (12). Sport und Buch Strauß, Köln: 197-201.

GUDDAT S, THEVIS M, SCHÄNZER W (2003). The Diuretic Mannitol – A Problem in Doping Analysis (Poster). In: SCHÄNZER W, GEYER H, GOTZMANN A, MARECK U (eds.). *Recent Advances in Doping Analysis* (11). Sport und Buch Strauß, Köln: 323-328.

THEVIS M, GUDDAT S, SCHÄNZER W (2002). Determination of HES, Dextran and Mannitol in Human Urine. In: SCHÄNZER W, GEYER H, GOTZMANN A, MARECK U (eds.). *Recent Advances in Doping Analysis* (10). Sport und Buch Strauß, Köln: 189-200.

Danksagung

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von September 2001 bis Mai 2005 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Rudolf Galensa (Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, Universität Bonn) und Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schänzer am Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Rudolf Galensa möchte ich für die Betreuung dieser Arbeit und die zahlreichen Anregungen danken. Hr. Prof. Dr. Wilhelm Schänzer danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, seine Betreuung und die Unterstützung während der experimentellen Arbeiten.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Mario Thevis bedanken, dessen Unterstützung in Fragen der instrumentellen Analytik und der experimentellen Arbeiten maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich gilt mein Dank allen Kollegen des Instituts für Biochemie, die durch das stets angenehme Arbeitsklima und durch ihre Unterstützung einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben, insbesondere: Hr. Georg Opfermann, Hr. Andreas Thomas, Fr. Christiane Klose, Hr. Ulrich Flenker und Hr. Dr. Hans Geyer. Desweiteren danke ich Dr. E. Waldhausen (Johanna-Etienne Krankenhaus, Neuss) für die Bereitstellung der Dextran-Ausscheidungsurine.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Literaturbesprechung | 3 |
| 2.1 | Geschichtlicher Überblick | 3 |
| 2.2 | Dextran | 4 |
| 2.2.1 | Kolloidale Volumenersatzmittel | 4 |
| 2.2.2 | Struktur und pharmazeutische Präparate | 5 |
| 2.2.3 | Anwendung und Wirkungsweise | 6 |
| 2.2.4 | Stoffwechsel | 8 |
| 2.2.5 | Missbrauch und Anwendung im Sport | 9 |
| 2.2.6 | Analytik von Oligo- und Polysacchariden | 10 |
| 2.2.6.1 | Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) | 11 |
| 2.2.6.2 | <i>Screening</i> auf Hydroxyethylstärke | 12 |
| 2.2.6.3 | Identifizierung von Hydroxyethylstärke | 14 |
| 2.2.6.4 | Analytik von Dextran und anderen Kohlenhydraten mittels ESI- und MALDI-Massenspektrometrie | 18 |
| 2.2.7 | ESI/APCI-Tandem-Massenspektrometrie | 19 |
| 2.3 | Mannitol | 24 |
| 2.3.1 | Allgemeines zu Mannitol | 24 |
| 2.3.2 | Anwendung und Wirkungsweise | 24 |
| 2.3.3 | Missbrauch und Anwendung im Sport | 25 |
| 2.3.4 | Analytik von Zuckeralkoholen | 26 |
| 3 | Experimenteller Teil | 27 |
| 3.1 | Bestimmung von Dextran mittels GC/MS | 27 |
| 3.1.1 | Probenaufarbeitung | 27 |
| 3.1.2 | GC/MS Parameter | 29 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.1.3 | Quantitative Bestimmung | 29 |
| 3.1.3.1 | Relative Standardabweichung einzelner Teilschritte der PMAA-Methode | 30 |
| 3.2 | Bestimmung von Dextran mittels LC/MS | 31 |
| 3.2.1 | Methodenentwicklung | 31 |
| 3.2.1.1 | Massenspektrometrie | 31 |
| 3.2.1.2 | Flüssigkeitschromatographie | 32 |
| 3.2.1.3 | Enzymatische Hydrolyse | 32 |
| 3.2.2 | Identifizierung und quantitative Bestimmung von Dextran | 33 |
| 3.2.2.1 | Probenvorbereitung | 33 |
| 3.2.2.2 | LC/MS-Parameter | 34 |
| 3.2.2.3 | Quantitative Bestimmung | 34 |
| 3.2.3 | Validierung | 35 |
| 3.2.3.1 | Arbeitsbereich | 35 |
| 3.2.3.2 | Spezifität | 35 |
| 3.2.3.3 | Präzision | 36 |
| 3.2.3.4 | Richtigkeit | 36 |
| 3.2.3.5 | Kalibrierfunktion | 36 |
| 3.2.3.6 | Verfahrensnachweis- und Verfahrensbestimmungsgrenze | 37 |
| 3.2.3.7 | Wiederfindung | 37 |
| 3.2.3.8 | Stabilität | 37 |
| 3.2.4 | Probengut | 38 |
| 3.2.4.1 | Bestimmung der Basalwerte von polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen in Humanurin | 38 |
| 3.2.4.2 | Bestimmung der urinären Dextrankonzentration nach intravenöser Applikation von Dextran | 40 |
| 3.3 | Bestimmung von Mannitol mittels GC/MS | 42 |
| 3.3.1 | Methodenentwicklung | 42 |
| 3.3.2 | Probenvorbereitung | 42 |
| 3.3.3 | GC/MS-Parameter | 43 |
| 3.3.4 | Ausscheidungsstudie | 43 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | Ergebnisse und Diskussion | 45 |
| 4.1 | Dextran | 45 |
| 4.1.1 | Identifizierung von Dextran mittels GC/MS | 45 |
| 4.1.1.1 | Methodenoptimierung zur quantitativen Bestimmung von Dextran mittels GC/MS | 49 |
| 4.1.1.2 | Relative Standardabweichung der Teilschritte Methylierung, Hydrolyse, Hydrierung und Acetylierung der PMAA-Methode | 52 |
| 4.1.2 | Methodenentwicklung zur Bestimmung von Dextran mittels LC-APCI-MS/MS | 54 |
| 4.1.2.1 | Massenspektrometrie | 56 |
| 4.1.2.2 | Flüssigkeitschromatographie | 60 |
| 4.1.2.3 | Enzymatische Hydrolyse | 61 |
| 4.1.3 | Identifizierung und quantitative Bestimmung von Dextran in Humanurin | 62 |
| 4.1.4 | Validierung | 66 |
| 4.1.4.1 | Arbeitsbereich | 66 |
| 4.1.4.2 | Spezifität | 66 |
| 4.1.4.3 | Präzision | 68 |
| 4.1.4.4 | Richtigkeit | 69 |
| 4.1.4.5 | Kalibrierfunktion | 70 |
| 4.1.4.6 | Verfahrensnachweis- und Verfahrensbestimmungsgrenze | 71 |
| 4.1.4.7 | Wiederfindung | 71 |
| 4.1.4.8 | Stabilität | 72 |
| 4.1.5 | Bestimmung der Basalwerte von polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen in Humanurin | 73 |
| 4.1.6 | Bestimmung der urinären Dextrankonzentration nach intravenöser Applikation von Dextran | 77 |
| 4.1.7 | Grenzwert | 80 |
| 4.1.8 | Referenzmethodik zum <i>Screening</i> und zur Bestätigung von Dextran | 81 |
| 4.2 | Mannitol | 84 |
| 4.2.1 | Identifizierung und quantitative Bestimmung von Mannitol mittels GC/MS | 84 |
| 4.2.2 | Ausscheidungsstudie | 86 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5 | Zusammenfassung | 94 |
| 6 | Anhang | 97 |
| 6.1 | Statistische Kenngrößen | 97 |
| 6.2 | Chemikalien, Materialien und sonstige Geräte | 99 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 101 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| abs. | absolut |
| APCI | chemische Ionisation bei Atmosphärendruck |
| CE | Kollisionsenergie |
| CID | kollisions-induzierte Dissoziation |
| Da | Dalton |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EI | Elektronenstoßionisation |
| EPO | Erythropoietin |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| HEG | Hydroxyethylglukose |
| HES | Hydroxyethylstärke |
| IS | interner Standard |
| KOD | kolloidosmotischer Druck |
| LLOD | Verfahrensnachweisgrenze |
| LLOQ | Verfahrensbestimmungsgrenze |
| MALDI | <i>matrix-assisted laser desorption/ionisation</i> |
| M _G | Molekulargewicht |
| mM _G | mittleres Molekulargewicht |
| MRM | <i>multiple-reaction-monitoring</i> |
| MSTFA | N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid |
| PMAA | teilweise methylierte Alditol Acetate |
| Q | Quadrupol |
| RT | Retentionszeit |
| TIC | Totalionenchromatogramm |
| TMS | Trimethylsilyl |
| TOF | <i>time of flight</i> |
| WADA | <i>World Anti-Doping Agency</i> |

1 Einleitung

Die stetig fortschreitende Neuentwicklung pharmazeutischer Präparate, die im Sport zur Leistungssteigerung oder Manipulation verwendet werden können, erfordert ständig neue Nachweisverfahren, die im Bereich der Dopinganalytik eingesetzt werden, um ein Dopingvergehen aufzudecken. Neben neuen Wirkstoffen gibt es aber auch bereits bekannte Substanzen, für die bis heute keine geeigneten Nachweismethoden existieren. Zwei dieser Substanzen sind das Dextran, ein α -1,6-Glukan, und der Zuckeralkohol Mannitol.

Dextran wirkt intravenös verabreicht als Plasmavolumenexpander und wird als solcher missbraucht, um hämatologische Parameter, wie den Hämatokritwert zu kontrollieren, der von einigen Sportverbänden vor Wettkämpfen überprüft wird. Mannitol hingegen wird als Diuretikum intravenös appliziert und kann durch die erhöhte Harnausscheidung zur Reduktion des Körpergewichts verwendet werden. Außerdem bringt die erzielte Diurese eine Art „Verdünnungseffekt“ im Urin mit sich, durch den der Nachweis verbotener Substanzen erschwert werden kann oder der bei Substanzen, die ab einem Grenzwert als verboten gelten, zu einem negativen Untersuchungsergebnis führt. Aufgrund dieser Möglichkeiten zur Manipulation hat die Welt-Anti-Doping Agentur (WADA) beide Substanzen auf die „Liste der verbotenen Substanzen“ aufgenommen (WADA 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten empfindliche Methoden für einen Nachweis der Analyten in Humanurin entwickelt werden, die ein Dopingvergehen zweifelsfrei anzeigen. Sowohl für Dextran als auch für Mannitol erfordert ein solches Verfahren neben der Identifizierung eine Quantifizierung der Analyten.

Im Fall von Mannitol ist dies notwendig, da eine mögliche Aufnahme von Mannitol über die Nahrung dazu führt, dass es mit dem Urin ausgeschieden wird. Um eine intravenöse Applikation und somit ein Dopingvergehen nachzuweisen, muss eine Differenzierung zwischen der urinären Mannitolkonzentration nach oraler und intravenöser Aufnahme gewährleistet sein.

Essentiell für den eindeutigen Nachweis einer verbotenen intravenösen Dextranapplikation ist die Kenntnis physiologisch in Urin auftretender Gehalte an polymer 1,6-verknüpften, dem Dextran analogen Glukosestrukturen, um durch Vergleich mit Gehalten an polymer 1,6-verknüpfter Glukose, die nach intravenöser Applikation von Dextran auftreten, ein Dopingvergehen zweifelsfrei anzeigen zu können.

2 Literaturbesprechung

2.1 Geschichtlicher Überblick

Seitdem sich Menschen bei Sportwettkämpfen messen, streben sie danach ihr Leistungsvermögen und ihre Kraft durch die Einnahme stimulierender Substanzen zu verbessern. So wurde den Berserkern in der nordischen Mythologie bereits nachgesagt, dass sie ihre Kampfesstärke durch die Einnahme von Bufotein, gewonnen aus dem Pilz *Amanita muscaria*, um das Zwölfwache steigern konnten. Philostratos und Galen berichteten, dass Athleten schon bei den Olympischen Spielen der Antike versuchten, ihre Fähigkeiten durch die Einnahme eines Gebräus aus Pilzen und Pflanzensamen oder den Verzehr von Rinderhoden zu steigern. Erste genauere Berichte stammen aus Latein- und Südamerika, wo verschiedene Stimulanzien aus Maté, Tee oder Kaffee, aber auch dem Strychnin verwandte Substanzen und Kokain eingenommen wurden, um die Ausdauer zu erhöhen und gleichzeitig das Hungergefühl auf langen Märschen zu unterdrücken. Mit Beginn der legendären „6 Tage“ Rennen 1879 entwickelten sich im Radsport erste Formen des Dopings. Die Mixturen, die zur Leistungssteigerung eingesetzt wurden, enthielten z. B. Koffein, Alkohol oder Ether. Der erste Todesfall in Zusammenhang mit Doping ereignete sich 1886 während eines Radrennens von Paris nach Bordeaux, bei dem ein englischer Athlet durch eine Überdosis „Tri-methyl“ zu Tode kam (BURSTIN 1963, PROKOP 1970).

Erste Methoden zum Nachweis dopingrelevanter Substanzen entwickelten russische und österreichische Wissenschaftler zu Beginn des 20. Jahrhunderts, mit deren Hilfe sie Pferdespeichel auf die Anwesenheit von Alkaloiden untersuchten. Nachdem zwischen 1938 und 1954 erste, wenig leistungsfähige Methoden zum Nachweis von Stimulanzien wie Amphetamin eingeführt wurden (AXELROD 1954, KELLER und ELLENBOGEN 1952, RICHTER 1938), entstand 1956 eine allgemein akzeptierte Methode, die Stimulanzien mit Hilfe von Flüssigkeitsextraktion, Papierchromatographie und Visualisierung nachweisen konnte (VIDIC 1956). In den nächsten Jahren entwickelte sich, nicht zuletzt durch die Einführung verschiedener nationaler Doping Kommissionen und der medizinischen Kommission des Internationalen Olympischen Komitees (1967) ein intensiver Kampf gegen Doping. Während der Olympische Spiele 1968 in Grenoble wurden bereits ausgewählte Stimulanzien mit einem Screeningverfahren nachgewiesen

(BECKETT et al. 1967). Die seitdem rasant ansteigende Anzahl von neu entwickelten Substanzen, die zur Leistungssteigerung eingesetzt werden können, stellt die Dopinganalytik ständig vor neue Herausforderungen. Die aktuelle nicht endliche Liste der verbotenen Substanzen der WADA erfordert *Screenings* auf über 200 Substanzen (WADA 2005). Trotz der modernsten instrumentellen Analytik existieren jedoch nicht für alle verbotenen Substanzen, wie z. B. für Albumin, Mannitol oder Dextran geeignete Nachweismethoden, die ein Dopingvergehen aufdecken können.

2.2 Dextran

2.2.1 Kolloidale Volumenersatzmittel

Die Entwicklung von kolloidalen Volumenersatzmitteln nahm zu Beginn des 20. Jahrhunderts ihren Anfang, nachdem Starling 1896 erkannt hatte, dass Plasmaproteine durch ihren kolloidosmotischen Druck die Flüssigkeitsverteilung zwischen Intra- und Extravasalraum kontrollieren. Aufgrund fehlender Reinheit der aus Blutplasma gewonnenen Plasmaproteine und der damit verbundenen unerwünschten Nebenwirkungen, wie z. B. der Übertragung von Hepatitis oder dem Auftreten allergischer Reaktionen, sollten diese Plasmaproteine, vor allem das Albumin erst lange Zeit später zur Therapie von hypovolämischen Zuständen eingesetzt werden (BRECHER 1997, NITSCH 1998). Auf der Suche nach geeignetem Ersatz wurden während des Ersten Weltkrieges Gelatine und Gummi arabicum-Lösungen als kolloidale Volumenersatzmittel eingesetzt, deren Anwendung jedoch weiterhin von erheblichen Nebenwirkungen, wie Antigenität und Infektivität begleitet war. Entscheidende Fortschritte wurden erstmals 1944 durch Grönwald und Ingelman mit der Einführung des Polysaccharids Dextran erreicht, dem in den 50er Jahren modifizierte Gelatinepräparate und 1973 Hydroxyethylstärke folgten (GRUBER 1968, NITSCH 1998). Heute werden neben dem „natürlichen“ Volumenersatzmittel Albumin ausschließlich Dextran, Gelatinederivate und Hydroxyethylstärke als „künstliche“ Volumenersatzmittel angewendet. In Deutschland besitzen diese künstlichen Volumenersatzmittel einen Marktanteil von etwa 77% (BOLDT 1998).

2.2.2 Struktur und pharmazeutische Präparate

Das Polysaccharid Dextran, ein α -1,6-Glukan, entsteht bei der Fermentation von Saccharose durch spezielle Stämme des Bakteriums *Leuconostoc mesenteroides* (JEANES et al. 1952). Wie in Abb. 1 dargestellt, besteht Dextran aus α -1,6-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten, die je nach verwendetem Stamm des Bakteriums unterschiedlich stark in α -1,3- und α -1,4-Stellung verzweigt sind. Das bei der Fermentation erhaltene native Dextran besitzt ein Molekulargewicht (M_G) von 10–100 Millionen Dalton (Da) und ist daher aufgrund seiner hohen Viskosität und Antigenität nicht als Plasmaersatzmittel zu gebrauchen (NITSCH 1998).

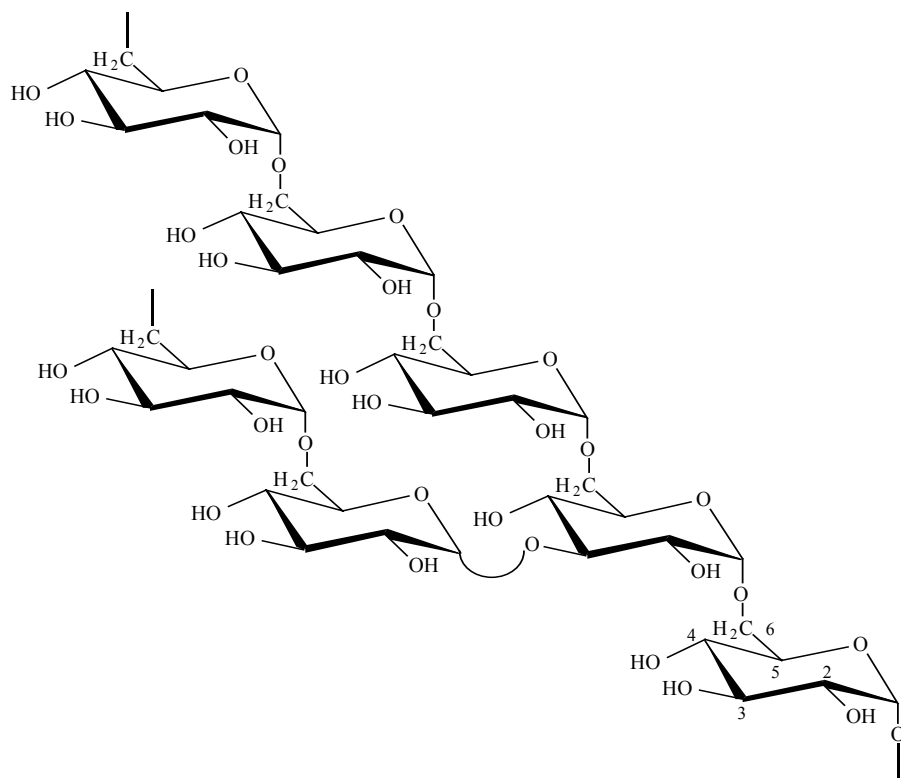


Abb. 1: Ausschnitt aus einem Dextranmolekül

Im Jahre 1944 gelang es Grönwall und Ingelman durch partielle hydrolytische Spaltung des nativen Dextrans und Fraktionierung mit Alkohol oder Aceton, ein Präparat mit einem mittleren Molekulargewicht (mM_G) von 75000 Da zu gewinnen, das 1947 unter dem Namen „Macrodex“ Einzug in die Kliniken hielt (GRUBER 1968). Heutzutage werden Dextranpräparate mit einem mM_G von 40000 Da (Dextran 40) bis 75000 Da

(Dextran 75) und einem geringen Verzweigungsgrad von ca. 5%, der durch die Verwendung bestimmter Stämme von *Leuconostoc mesenteroides* erreicht wird, zur Volumentherapie eingesetzt (Tab. 1). Die Verringerung des Verzweigungsgrades von Dextranen war notwendig, um das Risiko anaphylaktischer Reaktionen zu vermindern, die durch Antikörper gegen Dextran hervorgerufen werden können. Durch die Vorgabe von niedermolekularem Dextran ($mM_G=1000$), sogenanntem Hapten, können diese Antikörper blockiert und unerwünschte Nebenwirkungen vermieden werden (LÜLLMANN 1999). Typische Dextran-Infusionslösungen zur Volumentherapie bestehen aus 0,9 prozentiger Kochsalz- oder 5 prozentiger Glukose-Lösung mit einem Dextrangehalt von 6-10 % (MARTINDALE 1996, SALMON 1993).

Tab. 1: Handelsübliche Dextranpräparate (ABDATA 1998)

| Typ | Handelsname, Hersteller, Land | Mittleres Molekulargewicht [Da] | Dextrangehalt |
|------------|--|---------------------------------|---------------|
| Dextran 40 | Longasteril 40 [®] , Fresenius, D Rheomacrodex [®] , Braun, D Onkovertin N [®] , Braun, D | 40000 | 10 % |
| Dextran 60 | Macrodex [®] , Torrex, A Onkovertin [®] , Braun, D | 60000 | 6 % |
| Dextran 70 | Longasteril 70 [®] , Fresenius, D Hyskon [®] , Pharma Reusch, D | 70000 | 6 % |
| Dextran 75 | Gentran 75 [®] , Baxter, USA | 75000 | 6 % |

2.2.3 Anwendung und Wirkungsweise

Das Volumenersatzmittel Dextran wird bei allen Arten des Blutverlustes eingesetzt, um Kreislaufschäden, die durch einen Volumenmangel hervorgerufen werden können, wie verminderte Organperfusion, Organfehlfunktionen bis hin zum multiplen Organversagen zu verhindern. So wird Dextran bei schweren Blutverlusten zur Therapie des hypovolämischen Schocks, bei der Behandlung schwerer Verbrennungen oder bei

Operationen unter Narkose zur Stabilisierung des Kreislaufes eingesetzt. Weitere Anwendung findet Dextran 40 ($mM_G = 40000$ Da) bei der Thromboseprophylaxe, da es die Viskosität des Blutes herabsetzt und die Aggregationsneigung der Erythrozyten und Thrombozyten hemmt (LÜLLMANN 1999, MARTINDALE 1996, SALMON 1993).

Die Wirkungsweise kolloidaler Volumenersatzmittel beruht auf einer Aufrechterhaltung oder Anhebung des onkotischen Druckes in den Blutgefäßen, dem sogenannten intravasalen Raum. Dieser onkotische, bzw. kolloidosmotische Druck (KOD) herrscht an Kapillarmembranen, wenn gelöste kolloidale Substanzen im Blutkreislauf zirkulieren, deren Molekülgröße ein Durchtreten dieser Membranen unmöglich macht. Im humanen Plasma wird der onkotische Druck zu 70 bis 80 % durch Albumin ($mM_G = 66000$ Da) mit einer Konzentration von 35-55 g/l aufrechterhalten (LÜLLMANN 1999, NITSCH 1998). Für kleine Moleküle, Salze und Flüssigkeit sind diese Kapillarmembranen dagegen permeabel. Wird nun der onkotische Druck durch die Gabe von Dextran angehoben, so kommt es zu einem Flüssigkeitseinstrom aus dem umgebenden Gewebe in den intravasalen Raum, was zu einer Expansion des Plasmavolumens führt. Daher werden Volumenersatzmittel, die wie Dextran oder Hydroxyethylstärke den onkotischen Druck anheben, auch als Plasmavolumenexpander bezeichnet (GRUBER 1968, NITSCH 1998).

Die physiologischen Eigenschaften einer Dextranlösung werden durch ihre Molekulargewichtsverteilung, Konzentration, Molekülstruktur und durch das mM_G beeinflusst. Bei Dextran sowie bei allen anderen künstlichen kolloidalen Volumenersatzmitteln handelt es sich um polydisperse Stoffe, bei denen die Molekulargewichtsverteilung direkten Einfluss auf den KOD, die Viskosität des Plasmas und die Verweildauer des Volumenersatzmittels in der Blutbahn hat.

Tab. 2: Effektive Wirkdauer und erzielter Volumeneffekt verschiedener Dextranpräparate (BOLDT 1998, SALMON 1993)

| Präparat | Konzentration | Effektive Wirkdauer | Volumeneffekt |
|------------|---------------|---------------------|---------------|
| Dextran 60 | 6 % | 5-6 h | 120 % |
| Dextran 40 | 10 % | 3-4 h | 200 % |

Wie in Tab. 2 dargestellt, beeinflusst das mM_G die Wirkdauer des Volumeneffektes. So weist eine 6 prozentige Dextranlösung mit einem mM_G von 60000 Da eine effektive Wirkdauer von 5-6 Stunden, eine 10 prozentige Dextranlösung mit einem mM_G von 40000 Da hingegen eine Wirkdauer von 3-4 Stunden auf. Dabei steigt der KOD, d. h. der erzielte Volumeneffekt proportional mit der Konzentration und umgekehrt proportional mit dem M_G von Dextran (BOLDT 1998, SALMON 1993). Dextrane können pro Gramm ca. 20-25 ml Wasser aus dem extravasalen Raum anziehen (FORTH 1992).

2.2.4 Stoffwechsel

Entscheidend für die Wirkung und die Wirkdauer von Dextran ist die Geschwindigkeit, mit der es aus der Blutbahn entfernt wird. Dabei wird der größte Anteil des verabreichten Dextrans, in Abhängigkeit vom M_G und der Molekulargewichtsverteilung, über die glomerulären Filter der Niere mit dem Urin ausgeschieden. Dextrane mit einem M_G bis 18000 Da können diese Glomeruli frei passieren und werden innerhalb von 60 min zu 90 % aus dem intravasalen Raum eliminiert. Die renale Schranke, d. h. die Molekulargewichtsgrenze, mit der Dextrane über die Glomeruli aus der Blutbahn entfernt werden, liegt bei ca. 50000 Da. Bei breiter Molekulargewichtsverteilung werden daher wesentliche Anteile aufgrund ihres geringen M_G schnell über die Niere ausgeschieden. Das Präparat Rheomacrodex[®] (Dextran 40) besitzt z. B. eine Molekulargewichtsverteilung, die von 15000 bis 80000 Da reicht (GRUBER 1968, SALMON 1993).

Dextrane, deren M_G oberhalb der renalen Schranke liegt, werden zunächst durch zellgebundene α -1,6-Glukosidasen (Dextranasen) abgebaut, bevor sie über die Niere eliminiert werden. Ein gewisser Anteil des höhermolekularen Dextrans wird durch Leber, Milz und Nieren aufgenommen und dort enzymatisch zu Glukose abgebaut. Kleinere Mengen Dextran werden über den Gastrointestinaltrakt mit dem Faeces ausgeschieden (MARTINDALE 1996, NITSCH 1998, SALMON 1993). Bei Verwendung von Dextran 70 werden innerhalb von 6 h ca. 30 % und innerhalb von 24 h 40 % der verabreichten Dextranmenge urinär ausgeschieden. Bei Dextran 40 sind es 60 % in 6 h und 70 % in 24 h (GRUBER 1968).

2.2.5 Missbrauch und Anwendung im Sport

Ein verbotenes Dopingmittel im Bereich des Ausdauersports ist das Peptidhormon Erythropoietin (EPO), welches missbraucht wird, um die Zahl der Erythrozyten im Blut zu erhöhen und dadurch eine verbesserte Ausdauer zu erzielen. Die Erhöhung der Erythrozytenanzahl geht einher mit einer Vergrößerung des Volumenanteils aller Erythrozyten am Gesamtblut, dem sogenannten Hämatokritwert. Dieser Hämatokritwert nimmt nach einer Anwendung von EPO nichtphysiologische Werte an (VERGOUWEN 1999). Einige Sportverbände, wie der Internationale Skiverband (FIS) und der Internationale Radfahrverband (UCI) haben daher Grenzwerte erlassen, um den Sportler vor gesundheitlichen Risiken durch einen erhöhten Hämatokrit- (UCI), bzw. Hämoglobinwert (FIS) im Wettkampf zu schützen. Die Grenze für den Hämatokritwert beträgt für Männer 50 % und für Frauen 47 % (UCI). Für die Hämoglobinkonzentration hat die FIS Grenzwerte von 17,5 % für Männer und 16 % für Frauen festgelegt. Diese Grenzwerte werden vor Wettkämpfen durch Blutkontrollen überprüft, welche bei einem Überschreiten zu einem Startverbot führen und eine zusätzliche Urinkontrolle nach sich ziehen.

Durch den erzielten „Verdünnungseffekt“ im Blut, der durch die Einnahme des Plasmavolumenexpanders Dextran erreicht wird, lassen sich eben diese hämatologischen Parameter wie Hämatokrit- oder Hämoglobinkonzentration beeinflussen. Aufgrund dieser Möglichkeit zur „Manipulation“ der hämatologischen Parameter, die einen EPO Missbrauch maskieren kann, hat die WADA Dextran als „masking agent“ in die Liste der verbotenen Substanzen aufgenommen (WADA 2005). Ein zusätzlicher Vorteil einer Dextranapplikation wird im Schutz vor Dehydratisierung während Ausdauerbelastungen bei hohen Temperaturen gesehen. Bei einer Dehydratisierung kommt es infolge der langanhaltenden Belastung, speziell bei hohen Temperaturen, zu einem Flüssigkeitsverlust, der durch eine Flüssigkeitsaufnahme nicht vollständig kompensiert werden kann. Dieses kann zur Folge haben, dass das Plasmavolumen abnimmt und gleichzeitig der osmotische Druck des Plasmas ansteigt. Dadurch wird der Flüssigkeitshaushalt des Körpers gestört und die Leistungsfähigkeit des Athleten vermindert. Durch die erhöhte Wasserbindung im Plasma, die durch die Gabe von Plasmavolumenexpandern erreicht wird, soll möglicherweise eine Dehydratisierung verhindert oder herausgezögert werden (BURKE 1994, MURRAY 1996).

2.2.6 Analytik von Oligo- und Polysacchariden

Durch die zunehmende Kenntnis der zahlreichen biologischen Funktionen von Kohlenhydraten, wie z. B. spezifische Oligosaccharidstrukturen, die für die Funktion von Glykoproteinen oder Glykolipiden von Bedeutung sind, steigt in den letzten Jahren das analytische Interesse an ihrer Charakterisierung. Die Strukturaufklärung von Oligo- und Polysacchariden, die z. B. die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung, der Verzweigungsstellen, der Position der glykosidischen Bindungen und der anomeren Konfiguration erfordern kann, stellt dabei eine große Herausforderung für die Analytik dar (LOTTSPREICH 1998). Um Kohlenhydrate bezüglich dieser Parameter zu charakterisieren, werden verschiedene Techniken wie Magnetische Resonanzspektroskopie (NMR) oder Massenspektrometrie weit verbreitet eingesetzt. Zahlreiche Veröffentlichungen beschreiben die Verwendung unterschiedlichster Trennungstechniken wie Gas- oder Flüssigkeitschromatographie, gekoppelt mit massenspektrometrischen Detektoren (DEERY et al. 2001, HELLERQVIST et al. 1990, LI et al. 1998).

Für den Nachweis von Dextran sind nur wenige, zum Teil unspezifische oder unempfindliche Verfahren bekannt. So wird z. B. in der klinischen Analytik die renale Ausscheidung von Dextran in Plasma oder Urin bestimmt, indem durch Gel-Filtrations-Chromatographie (GPC) oder Größenausschlusschromatographie (SEC) die verschiedenen Molekulargewichtsfractionen aufgetrennt werden. Die Dextrankonzentration in den einzelnen Fraktionen wird dann mittels refraktrometrischer Detektion (RI) oder dem sogenannten *anthrone assay* bestimmt, bei dem der Analyt mit 9,10-dihydro-9-oxoanthracen (Anthrone) eine Farbreaktion eingeht und anschließend photometrisch bestimmt wird (GRANATH 1967, HEMMELDER 1998, SCOTT 1953). Die refraktrometrische Detektion findet jedoch im Bereich der Dopinganalytik keine Anwendung, da sie sich zum Einen gegenüber der hier hauptsächlich angewendeten Gradientenelution nicht robust zeigt und zum Anderen zu unspezifisch für die Identifizierung verschiedener, nebeneinander in Urin vorliegender Kohlenhydrate ist. Aufgrund fehlender Spezifität scheidet ebenfalls der *anthrone assay* als Nachweisverfahren für eine verbotene Dextranapplikation aus. Neben diesen in der klinischen Analytik angewendeten Verfahren ist im Bereich der Lebensmittelanalytik die Bestimmung der Dextrankonzentration bei der Rohrzuckergewinnung von Interesse, da sich hohe Dextrankonzentrationen ungünstig auf die Weiterverarbeitung und die

Produkteigenschaften auswirken. Außerdem beeinflusst Dextran die optische Aktivität des Rohrzuckers, deren refraktrometrische Messung die Bezahlungsgrundlage der Produzenten bildet. Die Bestimmung des Dextrangehaltes erfolgt hier mittels Nahinfrarot-Polarimetrie (NIR) (SINGLETON et al. 2002).

2.2.6.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Eine der ältesten und auch heute noch routinemäßig angewendeten Methoden, um die Verknüpfungsstellen einzelner Monosaccharidbausteine mittels GC/MS zu ermitteln, ist die Methylierungsanalyse. Grundlage für diese Analytik bildet unter anderem die bei HAKAMORI (1964) beschriebene Methode zur Permethylierung aller freien Hydroxygruppen eines Glykans durch Methyljodid. Dieses Prinzip machten sich auch BJÖRNDAL et al. (1967) zu Nutze, die erstmals das gaschromatographische und massenspektrometrische Verhalten von teilweise methylierten Alditol Acetaten (PMAAs) zur Strukturaufklärung von Polysacchariden beschrieben. Dabei werden die freien Hydroxygruppen der Zucker methyliert, anschließend alle glykosidischen Bindungen sauer hydrolysiert und danach die entstandenen methylierten Monosaccharidbausteine mit Natriumborhydrid zu den entsprechenden Alditolen reduziert. Die durch Hydrolyse und Reduktion neu entstandenen Hydroxy-Gruppen werden dann mit Essigsäureanhydrid und Pyridin acetyliert.

Im Bereich der Dopingforschung wird für die in den letzten Jahren entwickelte Zuckeranalytik hauptsächlich auf gaschromatographische Trennmethode mit massenspektrometrischer Detektion zurückgegriffen, da zum Einen ein hohes Maß an Spezifität und Empfindlichkeit für den Nachweis verbotener Substanzen in Urin benötigt wird und zum Anderen die Robustheit der Methode einen hohen Probendurchsatz erlaubt. Für die Identifizierung des in Abb. 2 dargestellten Polysaccharids Hydroxyethylstärke (HES) ist in der Dopinganalytik bereits eine Methodik etabliert, die aus einer Screeningprozedur (THEVIS 2000a) und einer Identifizierungsprozedur (THEVIS 2000b) besteht. Diese Unterteilung ist notwendig, um eine immer größer werdende Anzahl von Urinproben in der Dopinganalytik untersuchen zu können. Dabei soll die Screeningmethode mit möglichst wenig Aufwand eine Vielzahl von Substanzen schnell, kostengünstig und gleichzeitig empfindlich

erfassen. In der nachfolgenden Identifizierungsprozedur muss die Substanz vor allem spezifisch nachgewiesen werden, um eindeutig ein Dopingvergehen aufzudecken. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung der bestehenden Methodik zum *Screening* und zur Identifizierung von HES bezüglich einer Implementierung von Dextran überprüft werden.

2.2.6.2 Screening auf Hydroxyethylstärke

Wie in Abb. 2 dargestellt, besteht die Prozedur aus einer salzsauren Hydrolyse der Hydroxyethylstärke und anschließender Derivatisierung der verschiedenen generierten Hydroxyethylglukosederivate und Glukose mit einer Mischung aus *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA), Ammoniumiodid und Ethanthiol in Gegenwart von Pyridin. Ammoniumiodid bildet dabei mit MSTFA Trimethyliodsilan, das katalytisch wirkt und eine per-Trimethylsilylierung (per-TMS) aller Hydroxyfunktionen beschleunigt. Die entstehenden penta-TMS Derivate werden mittels GC/MS bestimmt (THEVIS 2000a). Im GC/MS-Chromatogramm werden Signale der TMS-Derivate der α - und β -Isomeren der Glukose, der 2-hydroxyethylierten Glukose, der 3-hydroxyethylierten Glukose und der 6-hydroxyethylierten Glukose registriert. Anhand der Retentionszeit und des Massenspektrums mit den charakteristischen Fragmentationen werden die entsprechenden Analyten identifiziert.

Abbildung 3 zeigt die Massenspektren der per-TMS Derivate von α -(D)-Glukose (A) und 2-Hydroxyethyl- α -(D)-Glukose (B). Charakteristische Fragmentationen des per-TMS Derivats von α -(D)-Glukose sind m/z 191, 204 und 217 (A), die auch bei anderen Monosacchariden beobachtet werden. Durch den Massenanstieg um 44 Da, der mit der Hydroxyethylierung der Glukose (B) einhergeht, verschieben sich Fragmentationen, die die zusätzliche Hydroxyethylgruppe enthalten, um 44 Masseneinheiten wie m/z 204 nach m/z 248 und m/z 217 nach m/z 261. Dadurch lässt sich das Vorhandensein von hydroxyethylierter Glukose im Urin eindeutig nachweisen. Der menschliche Organismus ist nicht in der Lage hydroxyethylierte Glukose zu bilden, so dass der Nachweis in Urin einen Dopingverstoß belegt.

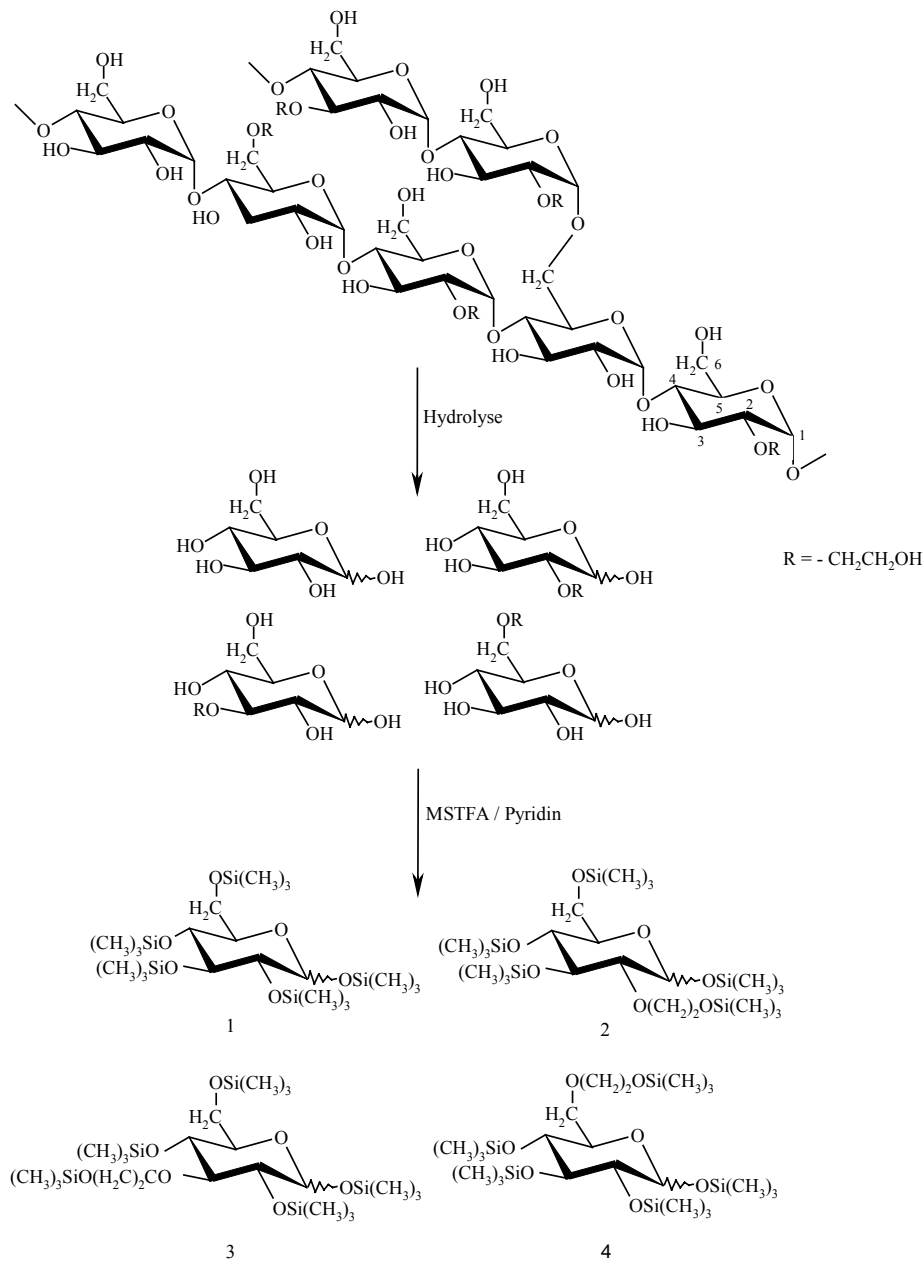


Abb. 2: *Screening*-Prozedur für Hydroxyethylstärke (Probenvorbereitung)

Durch Hydrolyse wird Hydroxyethylstärke in die α - und β -Isomeren der Glukose, der 2-hydroxyethylierten Glukose (2-HEG), der 3- hydroxyethylierten Glukose (3-HEG) und der 6-hydroxyethylierten Glukose (6-HEG) gespalten und nachfolgend zu den entsprechenden per-TMS Derivaten von: 1 = Glukose, 2 = 2-HEG, 3 = 3-HEG, 4 = 6-HEG umgesetzt.

Um zusätzlich die polymere Herkunft der hydroxyethylierten Glukose nachzuweisen, wird eine Identifizierungsprozedur angewendet, die die Position der glykosidischen Bindungen anzeigt (THEVIS 2000b).

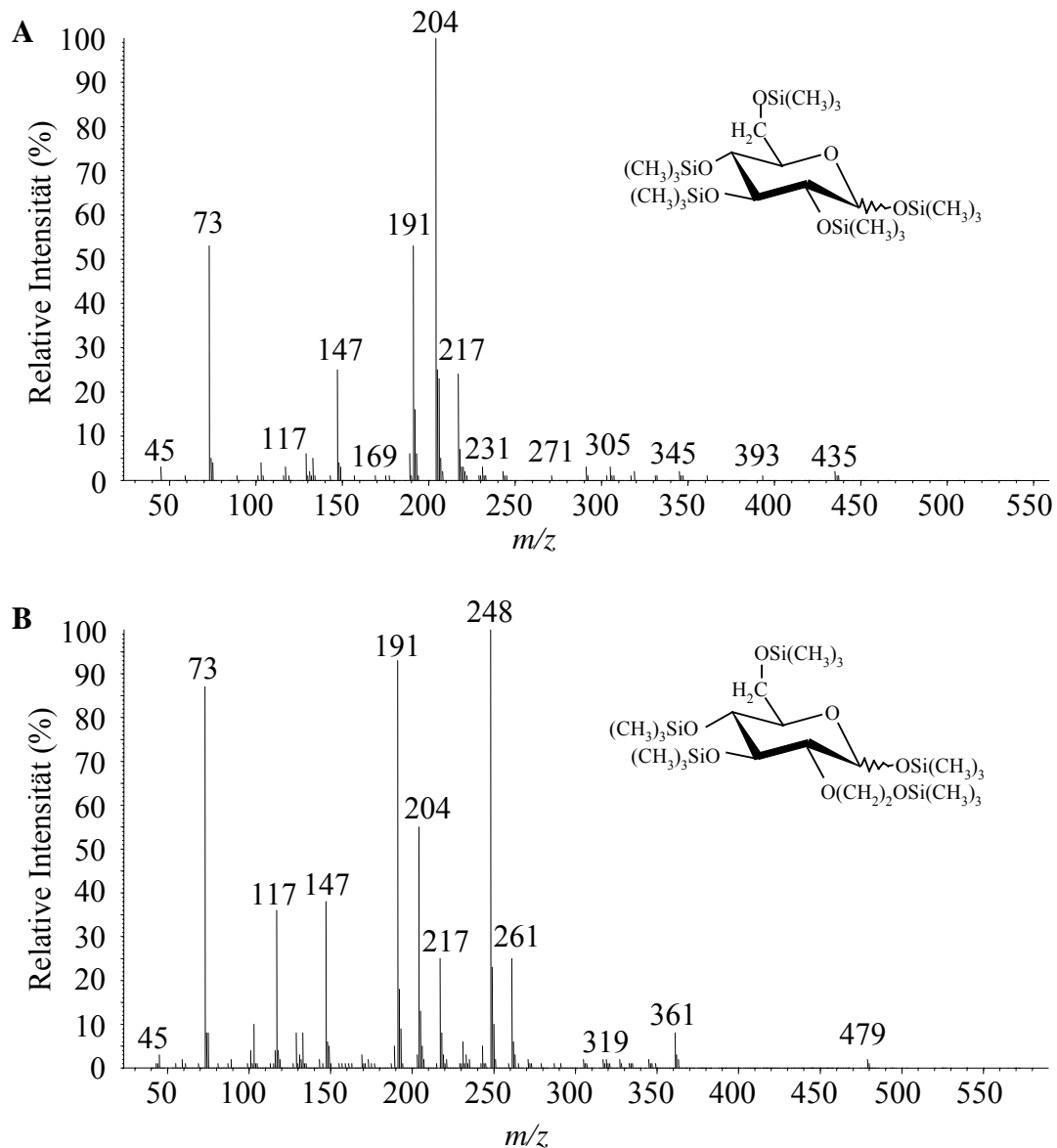


Abb. 3: Massenspektren der per-TMS Derivate von α -(D)-Glukose (A, $M_G=540$ Da) und von 2-Hydroxyethyl- α -(D)-Glukose (B, $M_G=584$ Da).

2.2.6.3 Identifizierung von Hydroxyethylstärke

Diese, auf dem Prinzip der Methylierungsanalyse beruhende Methode erlaubt die Identifizierung von HES in Urin durch deren Umwandlung in die teilweise methylierten Alditol Acetate (PMAA), anschließende gaschromatographische Trennung der entstandenen PMAAs und deren massenspektrometrische Detektion (THEVIS 2000b).

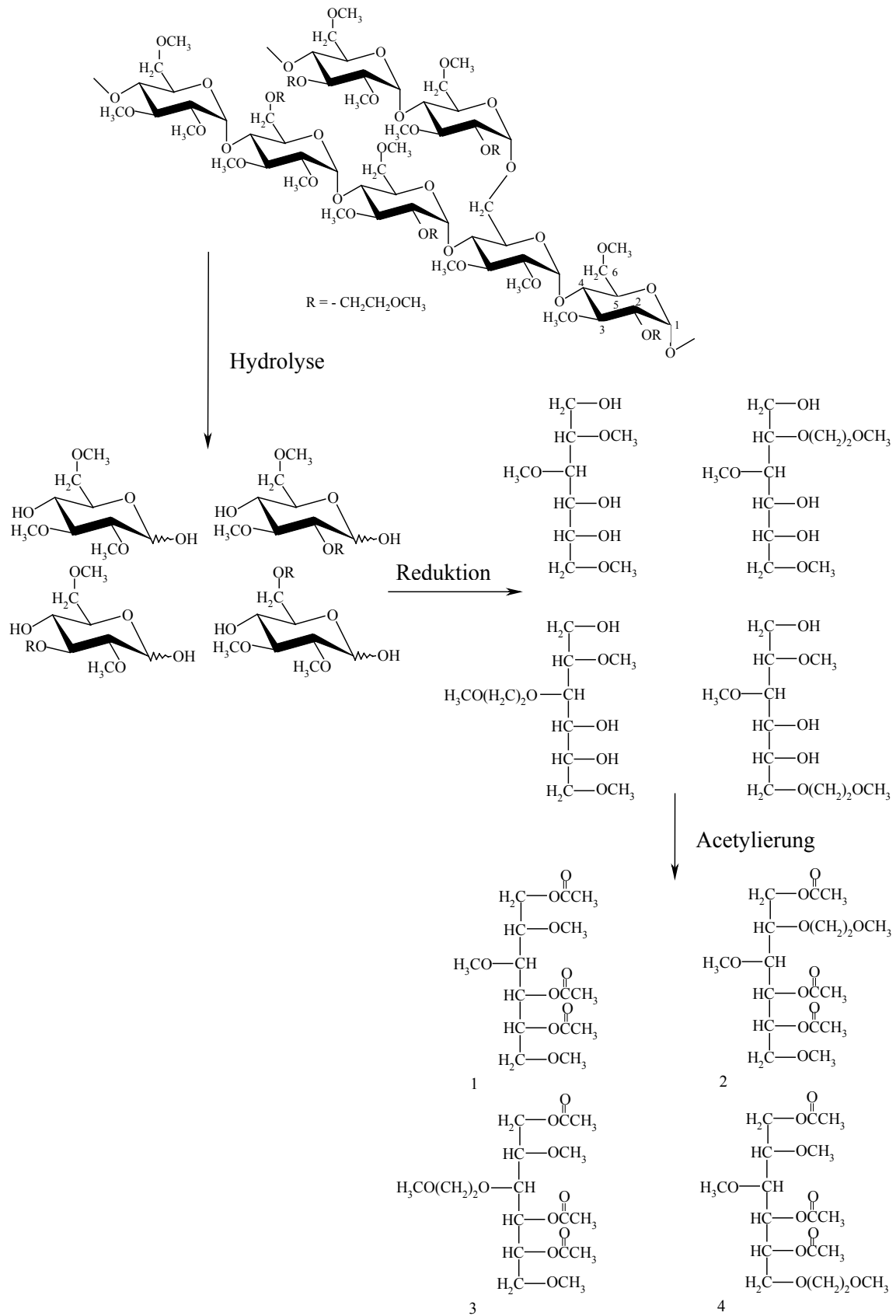


Abb. 4: Identifizierung von HES: Permethylierung und anschließende Hydrolyse des Polysaccharids zu den teilweise methylierten Monosaccharidbausteinen. Nach Reduktion zu den

entsprechenden teilweise methylierten Alditolen erfolgt die Acetylierung der neu generierten Hydroxy-Gruppen an C-1, C-4 und C-5 zu den entsprechenden PMAAs. Die vier wichtigsten sind hier exemplarisch dargestellt: 1=1,4,5-triacetyl-2,3,6-trimethylglucitol aus 1,4-verknüpfter Glukose; 2=1,4,5-triacetyl-2-methoxyethyl-3,6-dimethylglucitol aus 2-hydroxyethylierter Stärke; 3=1,4,5-triacetyl-3-methoxyethyl-2,6-dimethylglucitol aus 3-hydroxyethylierter Stärke; 4=1,4,5-triacetyl-6-methoxyethyl-2,3-dimethylglucitol aus 6-hydroxyethylierter Stärke (vgl. THEVIS 2001).

Dabei werden in einem ersten Schritt die freien Hydroxygruppen des in einer Suspension aus Natriumhydroxid und Dimethylsulfoxid gelösten Polymers mit Methyljodid umgesetzt. Diese von CIUCANU und KEREK (1984) beschriebene Methode zur Permethylierung von Kohlenhydraten zeichnet sich gegenüber der oben genannten Methylierungsmethode nach Hakamori durch kürzere Reaktionszeiten und höhere Ausbeuten (ca. 98%) aus. Die Methylierung der freien Hydroxy-Gruppen gelingt mit dieser Methode quantitativ (HANISCH 1994). Nach salzsaurer Hydrolyse des Polymers werden die resultierenden, teilweise methylierten Monosaccharidbausteine mit Natriumborhydrid reduziert, um sie in die entsprechenden Alditole zu überführen (Abb. 4). Die anschließende Acetylierung der neu entstandenen Hydroxy-Gruppen gelingt mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Pyridin. Die erhaltenen PMAAs werden schließlich mittels GC/MS analysiert und identifiziert.

Abbildung 5 zeigt die durch Elektronenstoßionisation (EI) erhaltenen Massenspektren der PMAAs der 1,4-verknüpften Glukose (A), der 2-hydroxyethylierten Glukose (B), der 3-hydroxyethylierten Glukose (C) und der 6-hydroxyethylierten Glukose (D). Die in Abb. 5 A dargestellten Hauptfragmentationen m/z 117 und m/z 233 sind charakteristisch für das PMAA der 1,4-verknüpften Glukose, da ein Hauptfragmentierungsschritt der EI der Bindungsbruch zwischen C-2 und C-3 ist.

Aufgrund dieser Tatsache resultiert im Falle einer Hydroxyethylierung an C-2 (Abb. 5 B) eine Verschiebung des Fragmentions m/z 117 um 44 Da nach m/z 161, welches charakteristisch für das PMAA der 2-HEG ist. Trägt C-3 (3-HEG) oder C-6 (6-HEG) die Hydroxyethylgruppe, dann verschiebt sich das Fragment m/z 233 um 44 Da nach m/z 277. Bei Substitution des Kohlenstoffs 6 wird zusätzlich ein Fragmention bei m/z 101 detektiert, welches durch einen Bindungsbruch zwischen C-3 und C-4 und anschließendem Verlust von Essigsäure entsteht. Dieses Ion dient zur Unterscheidung von 3-HEG und 6-HEG.

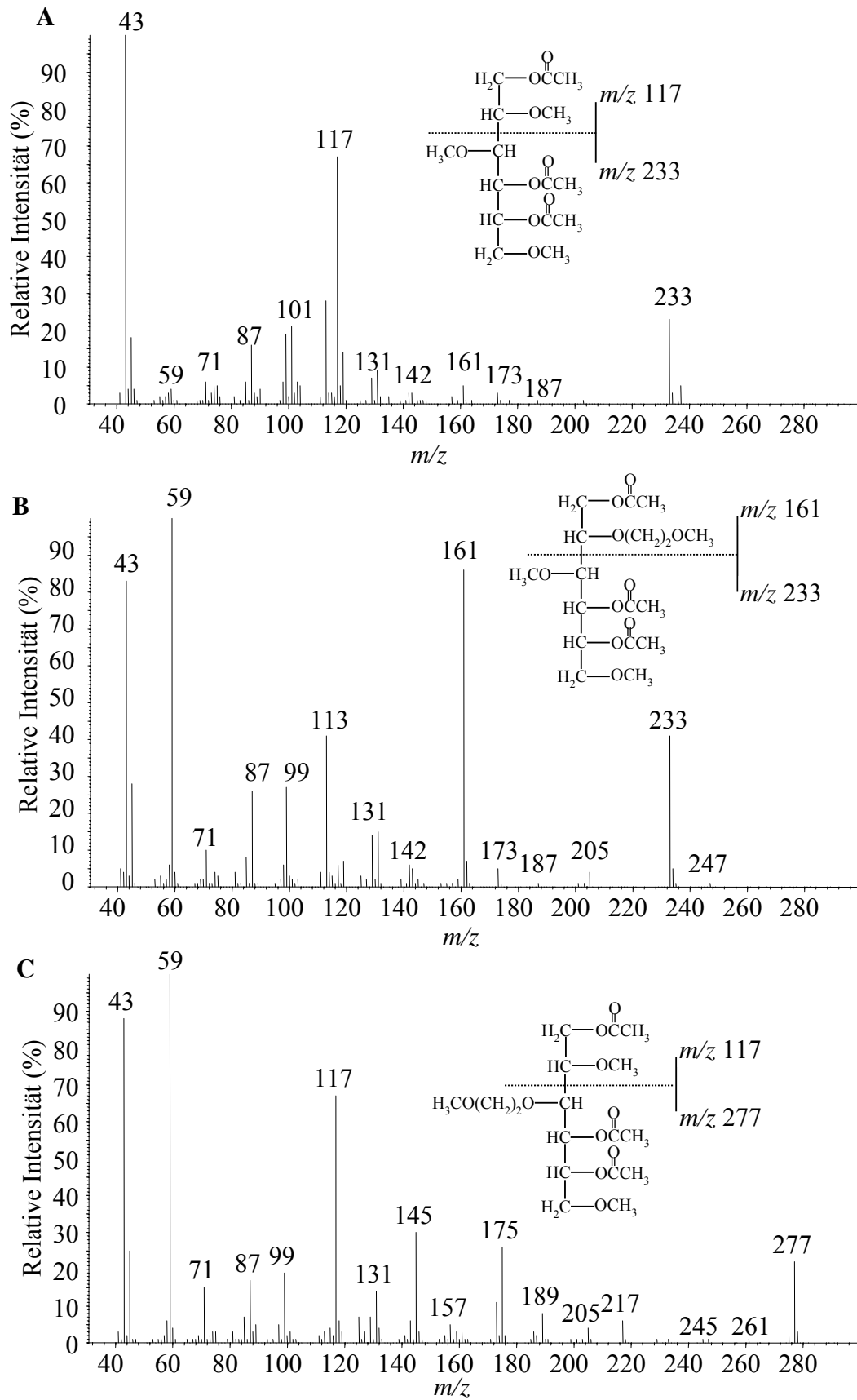


Abb. 5 A-C: EI-Massenspektren von 1,4,5-triacetyl-2,3,6-trimethylglucitol (M_G=350 Da) aus 1,4-verknüpfter Glukose (A), 1,4,5-triacetyl-2-methoxyethyl-3,6-dimethylglucitol (M_G=394 Da)

aus 2-hydroxyethylierter Stärke (B) und 1,4,5-triacetyl-3-methoxyethyl-2,6-dimethylglucitol ($M_G=394$ Da) aus 3-hydroxyethylierter Stärke (C).

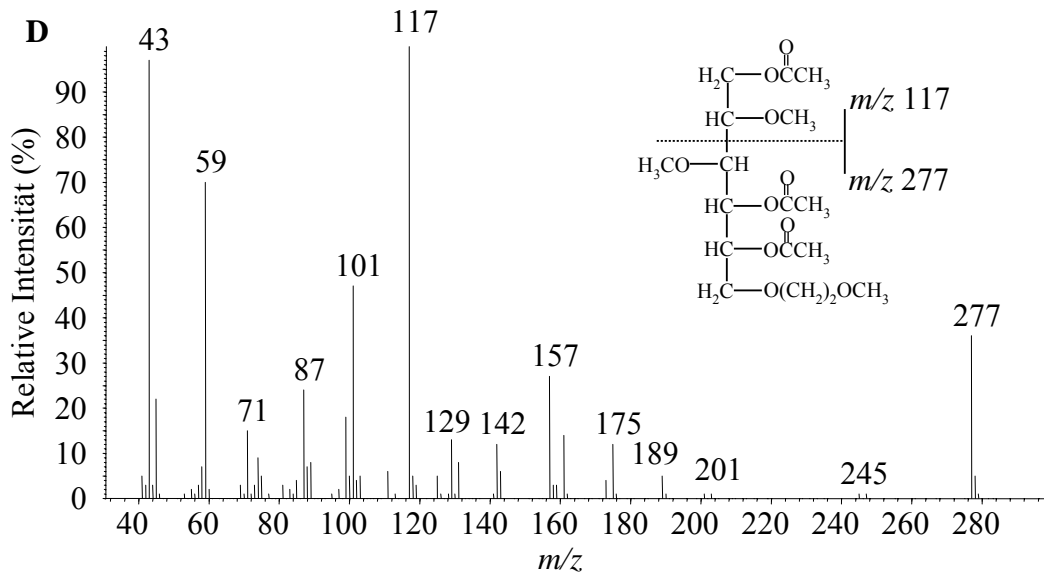


Abb. 5 D: EI-Massenspektrum von 1,4,5-triacetyl-6-methoxyethyl-2,3-dimethylglucitol ($M_G=394$ Da) aus 6-hydroxyethylierter Stärke.

2.2.6.4 Analytik von Dextran und anderen Kohlenhydraten mittels ESI- und MALDI-Massenspektrometrie

Auch im Bereich der Kohlenhydratanalytik kommen in den letzten Jahren vermehrt weiche Ionisierungstechniken wie *Matrix-assisted laser desorption/ionisation* (MALDI) oder Elektrospray-Ionisation (ESI) zum Einsatz. Der Einsatz von ESI im negativen Modus ermöglicht durch kollisions-induzierte Dissoziation (CID) die Generierung charakteristischer Fragmentionen, die durch Spaltung der glykosidischen Ringstruktur oder der glykosidischen Bindung hervorgehen. Dadurch lassen sich z. B. die Position der glykosidischen Bindung und die anomere Konfiguration bestimmen (LI und HER 1998, ZHU und COLE 2001). Bei positiver Ionisierung entstehen aus den protonierten Di-, Oligo- und Polysacchariden mittels CID in der Regel nur Produktionen, die aus der Spaltung der glykosidischen Bindung hervorgehen und keine Rückschlüsse auf die Position der Verknüpfungsstellen geben (ASAM und GLISH 1997). Die positive Ionisierung kann jedoch auch durch Bildung von Adduktionen mit Alkalimetallen (Li^+ , Na^+ , K^+ , CS^+) oder Erdalkalimetallen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) und anschließender

Fragmentationenbildung durch CID zur Strukturaufklärung genutzt werden (ASAM und GLISH 1997, DEERY et al. 2001, SHEN und PERREAULT 1998).

Das massenspektrometrische Verhalten von verschiedenen Dextranen untersuchten CMELIK et al. (2004) mittels MALDI-TOF-MS und ESI-MS/MS sowohl im negativen als auch im positiven Modus. Dabei zeigte sich, dass ESI-MS/MS besser als MALDI-TOF-MS zur Strukturaufklärung von Dextranen geeignet ist, da die durch Spaltung der glykosidischen Ringstruktur und der glykosidischen Bindung mittels negativer Ionisierung erhaltenen Fragmente charakteristisch für die 1,6-Verknüpfung der Glukosebausteine sind. Die Position der glykosidischen Bindung lässt sich hingegen mittels MALDI-MS nicht bestimmen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von ZHU und COLE (2001) überein. Der höhere Informationsgehalt bezüglich der Struktur von Dextranen des mittels negativer ESI erhaltenen Massenspektrums geht jedoch einher mit einer deutlich geringeren Empfindlichkeit, wie sie nach positiver Ionisierung beobachtet wird. Um Dextran in Urin nachzuweisen, entwickelten GUTIERREZ-GALLEGO und SEGURA (2003) eine Methode, bei der nach partieller Hydrolyse mit Trifluoressigsäure die erhaltenen Dextranbruchstücke mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Im resultierenden Massenspektrum werden die Natriumaddukte der Quasimoleküle mit bis zu 18 Monosaccharideinheiten mit einem Massenunterschied von 162 Da (Glukose-H₂O) detektiert. Dieser Ansatz zum Nachweis von Dextran, der auch die Identifizierung von HES erlaubt, zeichnet sich durch eine einfache Probenvorbereitung und eine hohe Empfindlichkeit aus. Das erhaltene Massenspektrum lässt jedoch keine Unterscheidung von z. B. 1,4- oder 1,6-verknüpfter Glukose zu, was die Ergebnisse der Arbeit von CMELIK et al. bestätigen. Durch die fehlende Spezifität der Methode könnte eine Verteidigung der Ergebnisse nach WADA Regularien erschwert sein, da nur polymere 1,6-verknüpfte Glukose (Dextran) auf der Liste der verbotenen Substanzen aufgeführt ist.

2.2.7 ESI/APCI-Tandem-Massenspektrometrie

Für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrische Methode zur Bestimmung von Dextran wurde ein API 2000[®] *Triple Quadrupole*-Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Um die Analytmoleküle massenspektrometrisch erfassen zu können, müssen diese in Gasphasen-Ionen überführt werden, was durch weiche Ionisierungstechniken gelingt.

Hierzu bietet das verwendete Instrument u.a. die Möglichkeiten der Elektrospray-Ionisation (ESI) und der „Chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck“ (*atmospheric pressure chemical ionisation, APCI*), wobei die Ionisation in beiden Fällen bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure ionisation, API*) erfolgt.

Elektrospray-Ionisation

Bei der Elektrospray-Ionisation gelangt der Flüssigkeitsstrom der LC über eine Stahlkapillare, an deren Ende eine Spannung von mehreren kV anliegt, in die Ionenquelle. Dabei wird in der Flüssigkeit eine elektrochemische Umsetzung induziert, die zu einer Aufladung der Flüssigkeit führt. Beim Austritt aus der Kapillaren gehen die ionisierten Anteile der Probenlösung eine elektrophoretische Bewegung aufgrund des einwirkenden elektrischen Feldes ein, wodurch es zu einer Anhäufung von erzeugten Ladungen am Ende der ESI-Kapillare kommt. Zum Beispiel bewegen sich bei Anliegen einer positiven Spannung die Anionen in Richtung der Metallkapillare, wobei sich die Kationen von der Metallkapillare weg in Richtung der Gegenelektrode (Massenanalysator) bewegen und sich dabei an der Flüssigkeitsoberfläche ansammeln. Sobald eine ausreichend hohe elektrische Feldstärke erreicht wird und die Oberflächenspannung der Flüssigkeit überwunden werden kann, bildet sich am Kapillarende ein charakteristischer Flüssigkeitskonus, der sogenannte „Taylor-Cone“, aus dem kontinuierlich ein filamentartiger Flüssigkeitsstrom emittiert wird. Dabei entstehen feinste Tröpfchen, die z. B. bei positiver Polarisierung aufgrund der elektrophoretischen Ladungstrennung einen Überschuss an positiven Ladungen tragen. Durch Verdunstung des Lösungsmittels nimmt die Größe der geladenen Tröpfchen stetig ab, wobei die Ladung konstant bleibt. Dadurch wird die elektrostatische Abstoßung zwischen den Ladungen immer stärker, bis sie das sog. Rayleigh-Limit erreicht, an dem sich die Kraft der elektrostatischen Abstoßung und der Oberflächenspannung ausgleichen. Unterschreitet der Tröpfchenradius diese kritische Grenze durch Verdunstung, kommt es schließlich aufgrund der starken Abstoßungskräfte zu einem explosionsartigen Zerfall der Tröpfchen (Coulomb-Explosion). Dieser Vorgang wiederholt sich bis die Tröpfchen schließlich so klein und so hoch geladen sind, dass Gasphasen-Ionen aus ihnen entstehen können (Abb. 6).

Die Bildung der Gasphasen-Ionen wird durch zwei verschiedene Theorien beschrieben. Die ältere von DOLE et al. (1968) wird als *charge-residue model* (CRM) bezeichnet und geht davon aus, dass sich durch eine Reihe von Coulomb-Explosionen ein

Tröpfchen bildet, welches eine oder mehrere Ladungen trägt, aber nur ein einziges Ion enthält. Durch weitere Verdunstung des Lösungsmittels wird dann genau ein Gasphasen-Ion freigesetzt (Abb. 6). Diese Theorie wurde von Röllgen unterstützt und zur SIDT-Theorie (*single-ion in droplet theory*) ausgebaut (LOTTSPREICH 1998).

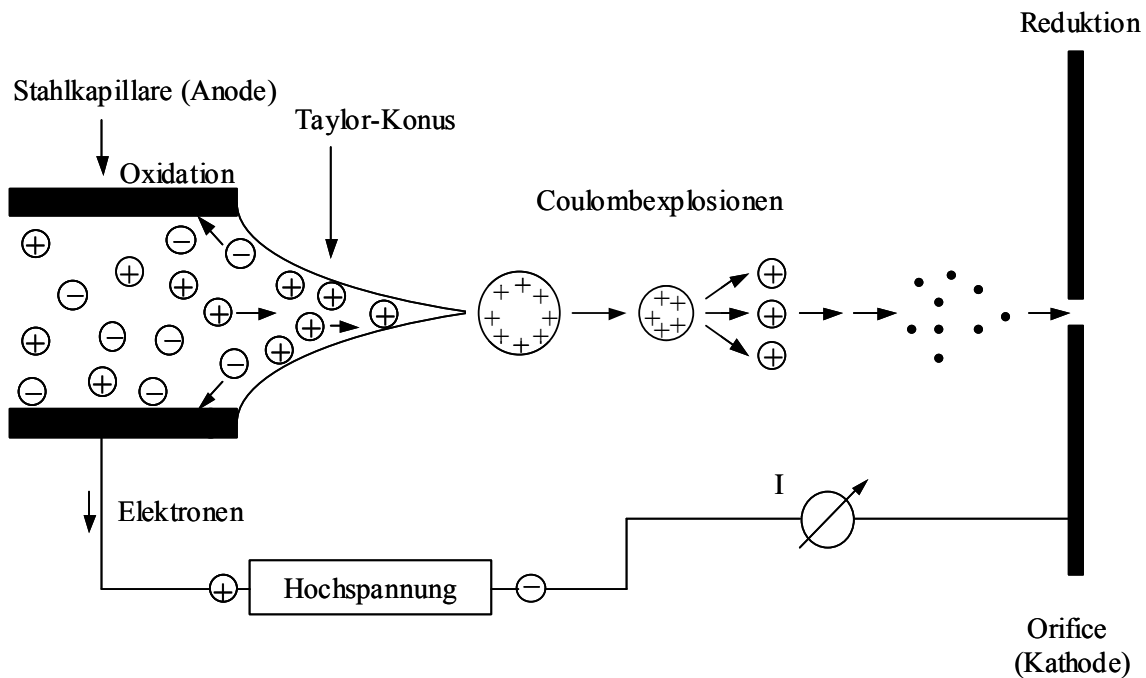


Abb. 6: Prozess der Ionenbildung bei ESI (nach LOTTSPREICH): Coulombexplosionen führen zu extrem kleinen Tröpfchen, aus denen genau ein Gasphasen-Analyt entsteht (*charge-residue model*).

Das zweite von IRIBARNE und THOMSON entwickelte Ionen-Emissionsmodell (*ion evaporation model*, IEM-Theorie) geht davon aus, dass noch vor dem Erreichen des Rayleigh-Limits die Ionen direkt in die Gasphase emittiert werden. Dabei sollen die geladenen Analytmoleküle in die Gasphase übertreten, sobald der Radius des hochgeladenen Tropfens durch Verdunstung eine geeignete Größe erreicht hat (<10 nm) und dadurch die Ladungsdichte an der Oberfläche des Tropfens groß genug geworden ist (COLE 2000, GASKELL 1997).

Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)

Wie in Abb. 7 dargestellt, gelangt der Eluent im Fall der APCI über eine spannungslose Stahlkapillare in ein auf 400-500 °C erhitztes Quarzrohr. Mit Hilfe eines axialen Stickstoffstroms wird dort die Flüssigkeit zu einem Spray zerstäubt und gleichzeitig die Desolvatisierung unterstützt. Der so entstandene Flüssigkeitsnebel gelangt in die Ionenquelle, in der sich eine nadelförmige Elektrode befindet, an der eine Spannung von wenigen kV anliegt. Über diese Elektrode wird eine Koronarentladung (2-10µA) aufrechterhalten, durch die Elektronen freigesetzt werden, die eine Kette von Reaktionen in Gang setzen.

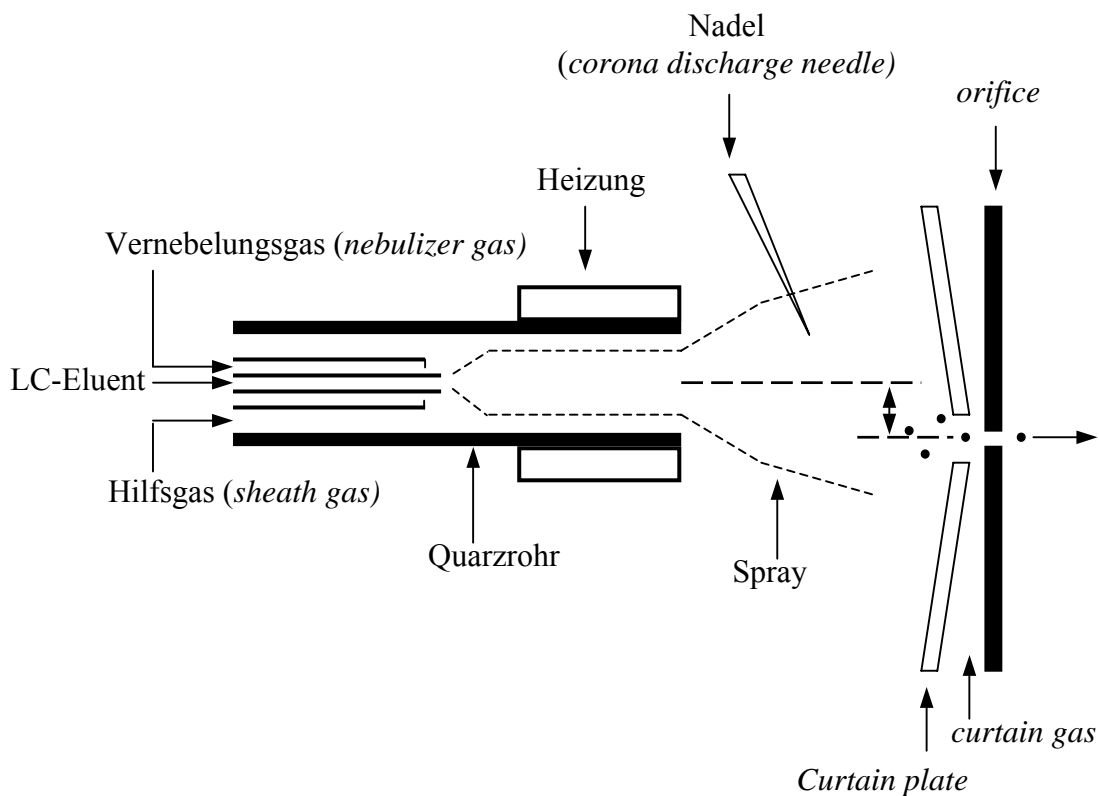


Abb. 7: APCI-Quelle (*heated nebulizer*, vgl. Applied Biosystems/PE Sciex)

Es kommt schließlich in einem dreistufigen Prozess zur Erzeugung von Analytmolekülonen. So wird z. B. bei der positiven Ionisierung zunächst der zum Zerstäuben verwendete Stickstoff unter Bildung von Radikalkationen der Form N_2^+ oder N_4^+ ionisiert, welche im folgenden mit den Eluentmolekülen reagieren. Dabei entstehen z. B. H_3O^+ oder NH_4^+ Ionen, die in einem nächsten Schritt mit den Analytmolekülen

unter Clusterbildung reagieren. Nach Zerstörung der Cluster, welche mit Hilfe eines axialen Stickstoffstroms dem sog. *curtain gas* unterstützt wird, gelangen die protonierten Analytmolekülonen der Form $[M+H]^+$ oder $[M+NH_4]^+$ über das Interface in den Massenanalysator. Im Vergleich zur ESI, bei der auch mehrfach geladene Ionen gebildet werden können, entstehen bei der APCI hauptsächlich einfach geladene Analytionen (ABIAN 1999, LIM 2002).

Tandem-Massenspektrometrie

Das verwendete API 2000[®] *triple quadrupole*-Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) bietet die Möglichkeit der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Dabei besitzt das Gerät eigentlich vier Quadrupole, von denen der erste aber nur die Funktion eines Hilfsquadrupols (Q0) einnimmt. Hier liegt lediglich eine Wechsellspannung an, um die Ionen zu fokussieren und somit ein optimales Eintreten der Ionen in den Ionenpfad zu gewährleisten. Dieses Fokussieren der Ionen im Vorvakuumbereich des Q0 wird bei dem verwendeten Gerät durch Stickstoff unterstützt, indem die Ionen bei ca. 1 Pa Gasdruck (Stickstoff) durch „sanfte“ Kollisionen abgebremst werden und gleichzeitig die Amplitude der Schwingung verringert wird. Im Hochvakuumbereich ($1,3 \times 10^{-3}$ Pa) des Gerätes befinden sich die Quadrupole Q1/Q2/Q3, von denen Q1 und Q3 als Massenfilter dienen und Q2 die Ionen durch eine Kollisionszelle führt. In Q1 können Analytionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) getrennt werden, die im Folgenden in der Stoßzelle des Q2 durch Kollisionen mit Stickstoff Fragmentationen bilden. Nach erneuter Trennung der erzeugten Fragmentationen in Q3 werden diese detektiert. Um bei der Tandem-Massenspektrometrie eine effektive Fragmentierung zu erreichen, werden die *precursor*-Ionen, die eine niedrige kinetische Energie von einigen eV besitzen, mit einer Kollisionsenergie (CE) von etwa 20-150 V beschleunigt. Einen weiteren Parameter, der die Fragmentierung beeinflusst, stellt der Gasdruck in der Kollisionszelle dar, da mit zunehmendem Druck die Anzahl an Mehrfachstößen und somit die Anregungsenergie zunimmt. Diese Art der durch Niedrigenergie-Stoßaktivierung herbeigeführten Fragmentierung wird auch als Kollisions-induzierter Zerfall (*collision induced dissociation*, CID) bezeichnet (LOTTSPREICH 1998).

2.3 Mannitol

2.3.1 Allgemeines zu Mannitol

Durch Reduktion von Mannose entsteht der sechswertige Zuckeralkohol Mannitol. Zu dieser Gruppe der Hexitole gehören neben den beiden Mesoformen Allitol und Galactitol (Dulcitol) die D- und L-Isomeren des Glucitols (Sorbitol), Iditols, Mannitols und Altritols. Von diesen zehn möglichen Hexitolen kommt hauptsächlich D-Glucitol (Sorbitol), aber auch D-Mannitol (Abb. 8) natürlicherweise in Früchten wie Äpfeln vor. Technologisch wird D-Mannitol durch die Hydrierung von D-Fruktose gewonnen und findet als Zuckeraustauschstoff in diätetischen Lebensmitteln und zahnschonenden Bonbons oder Kaugummis, als Feuchthaltemittel und als Weichmacher in Lebensmitteln Anwendung (BELITZ und GROSCH 1992). Im klinischen Bereich werden ausschließlich die D-Formen beider Substanzen als osmotische Diuretika eingesetzt, wobei D-Mannitol das am häufigsten verwendete Diuretikum aus dieser Gruppe darstellt (LÜLLMANN 1999).

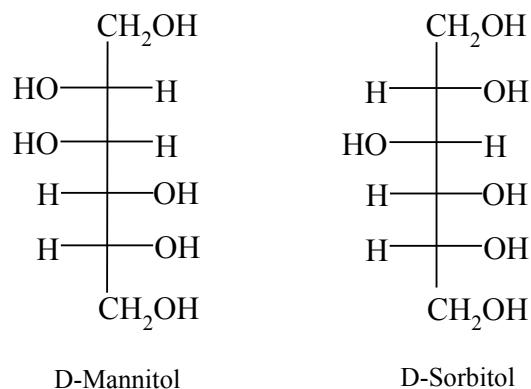


Abb. 8: Struktur von D-Mannitol und D-Sorbitol (Fischer-Projektion)

2.3.2 Anwendung und Wirkungsweise

Das intravenös verabreichte osmotische Diuretikum Mannitol wird angewendet, um Patienten mit akutem Nierenversagen, Hirnödemen oder erhöhtem Augeninnendruck zu behandeln. Aufgrund der gesteigerten Diurese können außerdem Giftstoffe schneller aus

der Blutbahn eliminiert werden. Oral verabreicht gilt Mannitol als osmotisch wirkendes Laxans, da es nur in sehr geringem Maße im Darm resorbiert wird (LÜLLMANN 1999).

Dadurch, dass intravenös verabreichtes Mannitol in der Niere glomerulär filtriert, jedoch nicht tubulär zurück resorbiert wird, steigt der osmotische Druck im Tubuluslumen an. Dieses hat zur Folge, dass es zu einer vermehrten Wasser- und Salzausscheidung kommt, durch die der kolloidosmotische Druck des Blutes ansteigt. Daraus resultiert analog der Wirkungsweise von Plasmavolumenexpandern ein Einstrom von Gewebeflüssigkeit in den intravasalen Raum (FORTH 1992, DÜSING 1986). Das Prinzip wird therapeutisch genutzt, um z. B. Flüssigkeit aus Hirnödemen zu entfernen. Aufgrund der fehlenden tubulären Rückresorption wird intravenös verabreichtes Mannitol in entsprechenden Mengen in den Urin ausgeschieden. Dabei erfolgt die Ausscheidung über die Niere mit einer Ausscheidungshalbwertszeit von ca. 100 min (LÜLLMANN 1999, MARTINDALE 1996). Um stärkere Diuresen auszulösen, werden beim Erwachsenen gewöhnlich 50-100g Mannitol appliziert. Typische Infusionslösungen wie Eufusol M 20[®], Osmofundin 10[®] und Osmofundin 20[®] enthalten 10-20 % Mannitol (FORTH 1992, MARTINDALE 1996).

2.3.3 Missbrauch und Anwendung im Sport

Die gesteigerte Harnausscheidung, die durch die intravenöse Zufuhr von Mannitol erreicht wird, kann im Sport zu Manipulationszwecken missbraucht werden. Der durch die ausgelöste Diurese erzielte „Verdünnungseffekt“ kann bei Substanzen, die in sehr geringer Konzentration vorliegen oder ab einem bestimmten Grenzwert als verboten gelten, zu einem negativen Untersuchungsergebnis führen. Zusätzlich kann durch die ausgelöste forcierte Diurese ein rascher Gewichtsverlust erreicht werden, der einem Athleten in Sportarten mit Gewichtsklassen einen Vorteil verschaffen kann. Aus diesen Gründen sind Diuretika im Allgemeinen sowie das Osmodiuretikum Mannitol im Sport verboten (WADA 2005).

2.3.4 Analytik von Zuckeralkoholen

Die Identifizierung von Zuckeralkoholen aus biologischen Matrices erfolgt hauptsächlich durch gaschromatographische Trennung der derivatisierten Polyalkohole und einer anschließenden massenspektrometrischen Detektion. Um eine gaschromatographische Trennung zu ermöglichen, können die Zuckeralkohole mit *n*-Butyl-Borsäure zu den entsprechenden Tributylboronaten umgesetzt werden. Die Hexitole Mannitol, Sorbitol und Dulcitol können auf diese Weise quantitativ bestimmt werden (RENNER et al. 1998, EADES et al. 1989, KIYOSHIMA et al. 2001, MARUNAKA et al. 1983). Eine weitere Möglichkeit zur Derivatisierung bieten die klassischen Methoden der Trimethylsilylierung und Acetylierung (PETTIT et al. 1980), die jedoch nach RENNER et al. und EADES et al. den Nachteil haben, dass für eine ausreichende gaschromatographische Trennung der per-TMS und peracetylierten Derivate des Mannitols und Sorbitols sehr lange Chromatographiezeiten notwendig sind.

Neben den massenspektrometrischen Verfahren lässt sich Mannitol in Urin auch enzymatisch mit NAD^+ unter Katalyse mit Mannitoldehydrogenase nachweisen. Anhand der umgesetzten NADH Menge, die der zu bestimmenden Mannitol Menge äquivalent ist, kann die Mannitolkonzentration indirekt photometrisch bestimmt werden (HESSELS et al. 2003, GRAEFE et al. 2003). Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von Zuckeralkoholen in Urin oder Serum bietet die Hochleistungsflüssigkeits-Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) (BAO et al. 1996, COX et al. 1997). Mit dem gleichen Verfahren werden verschiedene Mono- und Disaccharide wie z. B. Fruktose, Galaktose, Glukose und Saccharose sowie Mannitol auch in Lebensmitteln (z. B. löslicher Kaffee) nachgewiesen (PRODOLLIET et al. 1995). Andere flüssigkeitschromatographische Verfahren ermöglichen die Bestimmung von Mannitol und anderen Zuckeralkoholen nach Derivatisierung (Benzoylierung) und Detektion mittels UV (GALENSA 1983).

3 Experimenteller Teil

3.1 Bestimmung von Dextran mittels GC/MS

Wie bereits in Kap. 2.2.6.1 besprochen, soll die Identifizierung und Quantifizierung des Plasmavolumenexpanders Dextran nach der in der Dopinganalytik bereits etablierten Identifizierungsmethode der permethylierten Alditol Acetate (PMAA) zum Nachweis von HES erfolgen (THEVIS 2000b). Dabei soll die Methode vor allem für die quantitative Bestimmung von Dextran hinsichtlich der einzelnen Reaktionsschritte und der Wahl des internen Standards optimiert werden. Für alle Bestimmungen werden Aliquote von Urinen, die auf die Abwesenheit von 1,6-verknüpfter Glukose getestet wurden (Blankurine), mit entsprechenden Mengen eines Dextran Referenzstandards versetzt.

3.1.1 Probenaufarbeitung

Methylierung:

Ein 20 µl Aliquot des Urins wird in ein Schliffreagenzglas gegeben (Eppendorff Research) und für mindestens 2 h unter reduziertem Druck in einem Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Danach wird der Rückstand mit 200 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem Ultraschallbad angelöst (5 min). Die Methylierung erfolgt durch Zugabe von 200 µl einer wasserfreien Natriumhydroxid/DMSO-Suspension (s.u.) und 50 µl Methyljodid nach intensivem Schütteln (Vortex) in einem Ultraschallbad (10 min). Anschließend wird das methylierte Dextran mit 2 ml Chloroform durch zweimaliges Ausschütteln gegen je 2 ml Reinstwasser (Millipore) extrahiert. Die obere Wasserphase wird nach Zentrifugation (5 min, 1250 g) der Lösung abgenommen und verworfen.

Herstellung der Suspension aus NaOH und DMSO:

Zur Herstellung der Suspension werden 0,1 ml einer 50 %igen wässrigen NaOH-Lösung mit 0,2 ml Methanol versetzt und dreimal mit je 5 ml DMSO kräftig geschüttelt

(Vortex). Nach jedem Schütteln wird die Suspension 5 min lang zentrifugiert (1250 g) und das überstehende DMSO dekantiert. Die fertige Suspension wird schließlich durch Aufschütteln des wasserfreien NaOH-Rückstandes mit 2 ml DMSO erhalten.

Hydrolyse:

Für die Hydrolyse wird die verbleibende Chloroformphase an einem Rotationsverdampfer bei 60°C entfernt. Nach Zugabe von 500 µl wässriger Salzsäure (c=3 mol/l) werden die Proben 60 min lang bei 100°C erhitzt.

Reduktion:

Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer bei 60°C bis zur Trockne eingengt. Um die vorliegende, teilweise methylierte Glukose zu reduzieren, werden die Proben nach Zugabe von 200 µl einer Lösung aus Natriumborhydrid (c=5 mg/ml) in Methanol und 0,03 M wässriger Natriumhydroxidlösung (30:70, v:v) 16 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 20 µl Eisessig werden die Proben bei 50°C Wassertemperatur am Rotationsverdampfer getrocknet. Überschüssiges, die Acetylierung störendes Borhydrid wird in Anlehnung an die Methode von HELLERQVIST (1990) durch Ansäuern in Methylborat überführt, welches durch zweimaliges Anlösen des Rückstands in 1 ml methanolischer Salzsäure (0,1 %) und anschließender Trocknung bei 50°C am Rotationsverdampfer entfernt wird.

Acetylierung:

Der Rückstand wird mit 350 µl eines Gemisches aus Essigsäureanhydrid, Acetonitril und Pyridin (3:3:1, v:v:v) versetzt und 2 h bei 80°C im Heizblock erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 2 ml Chloroform und 2 ml Reinstwasser zugegeben. Nach kräftigem Schütteln und anschließendem Entfernen der wässrigen Phase (s.o.) wird die Chloroformphase am Rotationsverdampfer (60°C) zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 200 µl Isopropanol angelöst und mittels GC/MS analysiert.

3.1.2 GC/MS Parameter

Alle Messungen wurden auf einem HP 6890/HP 5973 GC/MS System von Hewlett-Packard (Waldbronn, Deutschland) mit folgenden Parametern durchgeführt:

| | |
|--------------------------|--|
| Injektor: | split/splitless-Injektor, Temperatur: 300°C |
| Kapillarsäule: | HP-5MS; Länge: 17 m; Innerer Durchmesser: 0,2 mm; Filmdicke: 0,25 µm |
| Trägergas: | Helium; Fluss: 1,5 ml/min |
| Injektionsvolumen: | 2 µl; Splitverhältnis: 1:10 |
| Ofen-Temperaturprogramm: | 0 min 100°C, + 10°C/min auf 210°C, + 20°C/min bis 320°C; Laufzeit: 16,5 min |
| Interface-Temperatur: | 300°C |
| Ionenquellentemperatur: | 230°C |
| Massenbereich: | 40-450 Da |
| Ionisation: | EI (70 eV) |

3.1.3 Quantitative Bestimmung

Für die quantitative Bestimmung von Dextran wurden 20 µl Aliquote eines Blankurins mit entsprechenden Mengen Dextran Referenzsubstanz versetzt und nach der unter Kap. 3.1.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Bezüglich der Quantifizierung von Dextran wurden dabei folgende Parameter für die Optimierung der Methode variiert:

| | |
|--------------------|---|
| Interner Standard: | $^{13}\text{C}_6$ -Glukose, $^{13}\text{C}_6$ -Stärke, Amylose |
| Arbeitsbereich: | 10 µg - 20 mg; 10 µg - 2mg; 30 µg - 10 mg; 30 µg - 1 mg; 250 µg - 3 mg; 250 µg - 2,5 mg; 1 mg – 5,5 mg; 1 mg – 3 mg |
| Derivatisierung: | Menge der Derivatisierungsreagenzien, Derivatisierungs- dauer und -temperatur |
| Matrix: | Verschiedene Blankurine |
| Reaktionsröhrchen: | Borosilicat-Glas, silyliertes Borosilicat-Glas und Kunststoff (HDPE, PS) |

3.1.3.1 Relative Standardabweichung einzelner Teilschritte der PMAA-Methode

Nach der Optimierung der Methode wurde die relative Standardabweichung als Maß für die Reproduzierbarkeit der einzelnen Teilschritte der Methode bestimmt. Dazu wurden Aliquote eines Urins ($c_{\text{Dextran}} = 100 \mu\text{g abs.}$) mit $^{13}\text{C}_6$ -Stärke ($c = 10 \mu\text{g abs.}$) als internem Standard wie folgt aufgearbeitet:

1. Relative Standardabweichung der Methode ohne Methylierung:

Die Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben mit dem Unterschied, dass die Aliquote nach der Methylierung vereinigt wurden. Aus diesem Gemisch wurden 10 Aliquote gleichen Volumens ($c_{\text{Dextran}} (\text{theor.}) = 20 \mu\text{g abs.}$) abgenommen und anschließend weiter aufgearbeitet.

2. Relative Standardabweichung der Methode ohne Methylierung und Hydrolyse:

Es wurden wiederum 10 Aliquote gleichen Volumens ($c_{\text{Dextran}} (\text{theor.}) = 20 \mu\text{g abs.}$) aus dem nach der Hydrolyse vereinigten Gemisch abgenommen, hydriert und anschließend acetyliert.

3. Relative Standardabweichung der Methode ohne Methylierung, Hydrolyse und Hydrierung:

10 Aliquote gleichen Volumens ($c_{\text{Dextran}} (\text{theor.}) = 20 \mu\text{g abs.}$) wurden aus dem nach der Hydrierung vereinigten Gemisch abgenommen und anschließend acetyliert.

4. Relative Standardabweichung der gesamten PMAA Methode:

Dazu wurden 10 Aliquote ($c_{\text{Dextran}} (\text{theor.}) = 20 \mu\text{g abs.}$) einer Dextranlösung mit $^{13}\text{C}_6$ -Stärke ($c = 10 \mu\text{g abs.}$) als internem Standard analog Kap. 3.1.1 aufgearbeitet.

3.2 Bestimmung von Dextran mittels LC/MS

3.2.1 Methodenentwicklung

Das Prinzip der entwickelten Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Dextran beruht auf einer Spaltung des Polymers durch das Enzym Dextranase. Die dabei entstehende Isomaltose wird nach anschließender Acetylierung mittels LC-APCI-MS/MS bestimmt. Als interner Standard (IS) für die Bestimmung des Analyten dient $^{13}\text{C}_6$ -markierte Glukose.

3.2.1.1 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Charakterisierung der peracetylierten Isomaltose und der $^{13}\text{C}_6$ -markierten Glukose erfolgte nach ESI der in Ammoniumacetatpuffer ($c=5\text{mmol/l}$ +1% Eisessig, $\text{pH}=3,5$)/Acetonitril (1:1, v:v) gelösten peracetylierten Referenzsubstanzen ($c=5\ \mu\text{g/ml}$), die mit einer Spritzenpumpe bei einem Fluss von $3\ \mu\text{l/min}$ direkt injiziert wurden. Die verschiedenen Geräteparameter wie z. B. *Declustering*-, *Entrance*-Potential und Kollisionsenergie wurden für die im *full-scan* Modus erhaltenen intensivsten Quasimolekülonen $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ und die anschließend durch CID erhaltenen Produktionen im *Autotune*-Modus des Instruments optimiert, um die höchst mögliche Empfindlichkeit für jeden Ionenübergang zu erreichen. Die Quasimolekülonen der peracetylierten Isomaltose und $^{13}\text{C}_6$ -markierten Glukose wurden im *Multiple-Reaction-Monitoring* (MRM) Modus des Instrumentes zu den in Tab. 3 angegebenen Ionenübergängen dissoziiert. Um Rückschlüsse auf das Fragmentierungsverhalten der peracetylierten Isomaltose ziehen zu können, wurde Isomaltose mit $^2\text{H}_6$ -Essigsäureanhydrid umgesetzt. Von der erhaltenen ($^2\text{H}_{24}$)-peracetylierten Isomaltose wurde analog der oben beschriebenen Vorgehensweise mittels ESI und anschließender CID ein Produktionenspektrum erzeugt.

Tab. 3: Zusammenstellung der im MRM-Modus aufgenommenen Ionenübergänge für die Quasimolekülonen $[M+NH_4]^+$ der peracetylierten Isomaltose und $^{13}C_6$ -Glukose (IS).

| Analyt | Ionenübergang | Kollisionsenergie (CE) |
|---|---------------|------------------------|
| Isomaltose peracetyliert | m/z 696→331 | 25 eV |
| | m/z 696→169 | 33 eV |
| | m/z 696→127 | 43 eV |
| | m/z 696→109 | 43 eV |
| | m/z 696→97 | 99 eV |
| | m/z 696→81 | 97 eV |
| $^{13}C_6$ -Glukose peracetyliert (IS) | m/z 414→337 | 15 eV |
| | m/z 414→175 | 21 eV |
| | m/z 414→115 | 29 eV |

3.2.1.2 Flüssigkeitschromatographie

Das Gradientenprogramm für die Trennung der peracetylierten Analyten wurde auf einer Zorbax SB-C18 Säule (Agilent, Waldbronn) unter Verwendung der Laufmittel Ammoniumacetatpuffer (pH=3,5, c=5 mmol/l, 1% Eisessig) und Acetonitril entwickelt. Dazu wurde ein Mischstandard der peracetylierten Disaccharide Lactose (c=100 µg/ml), Saccharose (c=250 µg/ml) und Isomaltose (c=500 µg/ml) verwendet.

3.2.1.3 Enzymatische Hydrolyse

In Anlehnung an die bei JANSON und PORATH (1966) beschriebene Methode zur enzymatischen Hydrolyse von Dextran wurden zur Herstellung der Dextranase-Arbeitslösung 500 Einheiten des Enzyms 1,6- α -D-Glucan 6-glucohydrolase (Sigma) in 2 ml Reinstwasser gelöst. Dabei setzt eine Einheit des Enzyms 1 µmol Isomaltose pro Minute aus Dextran frei (37°C, pH=6). Um eine schnelle und quantitative Umsetzung der zu erwartenden Dextranmengen bis in den unteren mg/ml-Bereich zu gewährleisten, wurde die Dextranase-Arbeitslösung im Überschuß (5 µl, bzw. 1,25 Einheiten) für die

Hydrolyse eingesetzt. Zur pH-Wert Einstellung wurde ein Zitronensäurepuffer (0,1 mol/l, pH=6) verwendet. Die Kinetik der enzymatischen Hydrolyse wurde überprüft, indem Aliquote eines aus 5 verschiedenen Blankurinen bestehenden Mischurins ($c_{\text{Dextran}}=500 \mu\text{g/ml}$) mit 5 μl Dextranase-Arbeitslösung und 40 μl Zitronensäurepuffer versetzt wurden. Nach unterschiedlich langen Hydrolysezeiten von 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h und 8 h wurde der Gehalt an Isomaltose in den Lösungen bestimmt.

3.2.2 Identifizierung und quantitative Bestimmung von Dextran

3.2.2.1 Probenvorbereitung

Ein Volumen von 20 μl Urin wird in ein 1,5 ml Polypropylen Reaktionsgefäß (Eppendorff, Hamburg) gegeben und für die enzymatische Hydrolyse mit 40 μl eines auf pH 6 eingestellten Zitronensäurepuffers ($c=0,1 \text{ mol/l}$) und 5 μl Dextranase-Arbeitslösung ($c=1,5 \text{ mg/ml}$) versetzt. Danach wird die Lösung geschüttelt (Vortex), 60 sec lang bei 1250 g zentrifugiert und anschließend für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 40 μl einer wässrigen $^{13}\text{C}_6$ -markierten Glukose-Lösung ($c=50 \mu\text{g/ml}$, stabilisiert mit 1% Natriumazid) als IS, erneutem Schütteln und Zentrifugieren (60 sec, 1250 g) wird die Lösung in Schliffreagenzgläser überführt. Die Probe wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt und danach für mind. 2h unter reduziertem Druck in einem Exsikkator über Phosphorpentoxid nachgetrocknet. Zur Acetylierung wird eine Mischung aus Essigsäureanhydrid, Acetonitril und Pyridin (3:3:1, v:v:v) zugegeben und anschließend 2 h lang bei 80°C im Heizblock erhitzt. Nach flüssig/flüssig Extraktion mit je 2ml Chloroform und Reinstwasser wird die obere wässrige Phase entfernt und die verbleibende Chloroformphase am Rotationsverdampfer eingeengt. Die fertige Messlösung wird schließlich durch Anlösen des Rückstandes in 200 μl Acetonitril erhalten.

3.2.2.2 LC/MS-Parameter

Chromatographische Parameter

| | |
|--------------------|--|
| HPLC-System: | 1100 Series (Agilent, Waldbronn) |
| Säule: | Zorbax SB-C18 (150 x 4,6 mm; Korngröße: 3,5 µm) (Agilent, Waldbronn) |
| Eluenten: | A: Ammoniumacetatpuffer (pH= 3,5, c=5 mmol/l) mit 1% Eisessig und B: Acetonitril |
| Gradient: | 0 min 90% A 10% B 20 min 10% A 90% B Reequilibrierungszeit: 4 min |
| Flussrate: | 0,8 ml/min, Split: 1:10 (statisch) |
| Temperatur: | Raumtemperatur |
| Injektionsvolumen: | 10 µl |

Massenspektrometrische Parameter

| | |
|-----------------------|---|
| Massenspektrometer: | API 2000 Triple Quadrupole Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) |
| Software: | Analyst, Ver. 1.3 (Applied Biosystems/MDS Sciex) |
| Ionisierung: | APCI im positiven Modus |
| Messmodus: | MRM |
| Interface Temperatur: | 400 °C |
| Kollisionsgas: | Stickstoff (Whatmann 75-72 K727, Stickstoffgenerator), Druck: 2.93×10^{-3} Pascal |

3.2.2.3 Quantitative Bestimmung

Die quantitative Bestimmung von Dextran erfolgt durch externe Kalibrierung mit $^{13}\text{C}_6$ -markierter Glukose als internem Standard (IS). Dazu werden jeder Kalibrierlösung entsprechende Mengen Dextran und IS (2 µg abs.) zugesetzt. Aus den Quotienten der Signalflächen der Ionenübergänge m/z 696→169 der peracetylierten Isomaltose bzw. Maltose und m/z 414→175 des peracetylierten IS in den entsprechenden

Kalibrierlösungen wird eine Kalibrierfunktion erstellt, über die der Gehalt an Dextran in den Proben ermittelt wird.

Jede Probe wird dabei einmal mit und einmal ohne enzymatische Hydrolyse aufgearbeitet, um den Dextrangehalt (polymer 1,6-verknüpfte Glukose) aus der Differenz der Isomaltose, bzw. Maltosemenge nach und vor der enzymatischen Hydrolyse zu berechnen.

3.2.3 Validierung

Die Validierungsparameter Selektivität, Präzision, Richtigkeit, Linearität, Verfahrensnachweisgrenze und Verfahrensbestimmungsgrenze sind in Anlehnung an die Richtlinien der „International Conference on Harmonisation“ (ICH, 2005), der DIN 38402, Teil 51 (1986) und den Vorgaben des „*international standard for laboratories*“ der WADA (2005) ermittelt worden. Für alle Bestimmungen wurden 20 µl Aliquote von Blankurinen, denen entsprechende Mengen Dextran Referenzsubstanz und interner Standard ($^{13}\text{C}_6$ -Glukose) zugesetzt wurde, nach der unter Kap. 3.2.2.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet.

3.2.3.1 Arbeitsbereich

Für die Methode wurde ein Arbeitsbereich zwischen 12,5 µg/ml (LLOQ) und 1250 µg/ml gewählt, der sowohl eine Bestimmung geringer physiologischer Isomaltosemengen in Urin als auch urinäre Dextrankonzentrationen im Bereich des später diskutierten Grenzwertes ermöglicht.

3.2.3.2 Spezifität

Um die Spezifität der Methode zu überprüfen, wurden 10 verschiedene Blankurine auf die Abwesenheit von interferierenden urinären Matrixkomponenten hin untersucht. Die Spezifität der Methode wurde bezüglich der Unterscheidung von verschiedenen

physiologisch vorkommenden Disacchariden wie Laktose und Saccharose, die das gleiche Molekulargewicht wie Isomaltose aufweisen, bestimmt. Um eine eventuelle Störung der Dextranbestimmung durch die Anwesenheit des Plasmavolumenexpanders HES festzustellen, wurde ein Urin, welchem HES zugegeben wurde ($c_{\text{HES}}=600 \mu\text{g/ml}$), untersucht. Desweiteren wurde die Substratspezifität der Dextranase anhand eines Urins der Amylose in einer Konzentration von $1250 \mu\text{g/ml}$ enthielt, überprüft.

3.2.3.3 Präzision

Zur Bestimmung der „Intra-day“ Präzision wurden je 10 Wiederholungen einer niedrigen ($c=53 \mu\text{g/ml}$), einer mittleren ($c=526 \mu\text{g/ml}$) und einer hohen Konzentrationstufe ($c=1186 \mu\text{g/ml}$) innerhalb des Arbeitsbereiches aufgearbeitet. Für die Ermittlung der entsprechenden „inter-day“ Präzision wurde die Aufarbeitung dieser Proben ($n=30$) an 3 verschiedenen Tagen wiederholt.

3.2.3.4 Richtigkeit

Für die Bestimmung der Richtigkeit des Verfahrens wurde jeweils einem Liter eines aus fünf verschiedenen Blankurinen bestehenden Mischurins entsprechende Mengen Dextran Referenzsubstanz hinzugefügt. Die so erhaltenen Konzentrationsstufen von $375 \mu\text{g/ml}$, $630 \mu\text{g/ml}$ und $877 \mu\text{g/ml}$ wurden jeweils 10-fach aufgearbeitet und der Gehalt der Proben ($n=30$) gegen eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von $54 \mu\text{g/ml}$ bis $1215 \mu\text{g/ml}$ ermittelt.

3.2.3.5 Kalibrierfunktion

Zur Überprüfung der Linearität wurden Kalibrierfunktionen über verschiedene Konzentrationsbereiche innerhalb des Arbeitsbereichs von $12,5 \mu\text{g/ml}$ bis $1250 \mu\text{g/ml}$ anhand der Bestimmung von 10 Kalibrierlösungen ermittelt.

3.2.3.6 Verfahrensnachweis- und Verfahrensbestimmungsgrenze

Die Verfahrensnachweis- (LLOD) und Verfahrensbestimmungsgrenze (LLOQ) wurde durch die Ermittlung des Signal/Rausch-Verhältnisses von 10 verschiedenen Blankurinen und 10 Blankurinen, denen Dextran ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) zugesetzt wurde, bestimmt. Dabei wurde für die Bestimmung des LLOD ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 und für das LLOQ von 9:1 vorausgesetzt (KROMIDAS 1999).

3.2.3.7 Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden 10 Aliquote eines Blankurins mit Dextran Referenzsubstanz ($c_{\text{Dextran}} = 100 \mu\text{g/ml}$) versetzt und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Außerdem wurden 10 Aliquote des gleichen Urins aufgearbeitet, denen anstelle von Dextran vor dem Anlösen äquivalente Mengen peracetylierte Isomaltose zugegeben wurde.

Peracetylierte Isomaltose war als Referenzstandard kommerziell nicht erhältlich und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert, indem 25 mg Isomaltose Referenzsubstanz mit Essigsäureanhydrid, Acetonitril und Pyridin (3:3:1, v:v) peracetyliert wurden. Anschließend wurde die peracetylierte Isomaltose mit 10 ml Chloroform durch Ausschütteln im Scheidetrichter gegen 10 ml Wasser extrahiert. Nach Entfernen des Chloroforms und Trocknen des Produkts konnte die peracetylierte Isomaltose als Hauptprodukt mittels LC/MS identifiziert werden. Die Aufreinigung und Trennung der peracetylierten Isomaltose erfolgte über eine semipräparative HPLC-Säule (Nucleosil C18).

3.2.3.8 Stabilität

Stabilität der Kalibrierlösungen

Für die Bestimmung der Stabilität der Kalibrierlösungen wurden 1 ml Aliquote einer wässrigen Dextran-Stammlösung (SL, $c = 111,9 \mu\text{g/ml}$) und -Arbeitslösung (AL, $c = 11,2 \mu\text{g/ml}$) bei $+ 4^\circ\text{C}$ gelagert und je 20 μl zweier Aliquote der SL und AL nach 0 h, 3, 7,

10 und 14 Tagen analysiert. Die Stabilität wurde überprüft, indem die aus den Peakflächen des Analyten und des internen Standards erhaltenen Quotienten in den verschiedenen Lösungen mit entsprechenden Aliquoten von frisch hergestellten Stamm- und Arbeitslösungen verglichen wurden.

Stabilität von Dextran in Urin

Um den Einfluss verschiedener urinärer Matrices auf die Stabilität von Dextran in Urin zu berücksichtigen, wurde zunächst ein Mischurin aus 5 unterschiedlichen Blankurinen hergestellt. Durch Zugabe entsprechender Mengen Dextran Referenzsubstanz wurden Urine mit einer niedrigen ($c=255,7 \mu\text{g/ml}$), einer mittleren ($c=517,0 \mu\text{g/ml}$) und einer hohen Dextrankonzentration ($c=978,5 \mu\text{g/ml}$) erhalten. Um den Einfluss der Lagertemperatur auf die Stabilität zu ermitteln, wurden 1 ml Aliquote der so erhaltenen Urine bei Raumtemperatur, $+4^\circ\text{C}$ und -20°C gelagert. Nach 0, 3, 30, 60 und 90 Tagen wurde die Stabilität des Dextrans durch Doppelbestimmung der unterschiedlich gelagerten und konzentrierten Aliquote überprüft. Dazu wurde die Ist-Konzentration des Dextrans in den Proben mit Hilfe einer Kalibriergeraden ($125 \mu\text{g/ml}$ bis $1250 \mu\text{g/ml}$) ermittelt und mit der theoretischen Soll-Konzentration verglichen.

3.2.4 Probengut

3.2.4.1 Bestimmung der Basalwerte von polymer 1,6-verknüpften

Glukosestrukturen in Humanurin

Um mögliche urinaire Gehalte an polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen und die Gesamtmengen an Isomaltose und Maltose (1,6- und 1,4-verknüpfte Glukose) zu bestimmen, wurden insgesamt 488 anonymisierte Urinproben von 332 männlichen, 108 weiblichen Athleten und 48 Athleten unbekanntes Geschlechts untersucht, die im Rahmen des Dopingkontrollprogramms der WADA in verschiedenen Sportarten entnommen wurden.

In allen Urinproben ($n=488$, s. Tab. 4) wurde die Gesamtkonzentration an Isomaltose und Maltose (1,6- und 1,4-verknüpfte Glukose) nach enzymatischer Hydrolyse ermittelt.

Für die Bestimmung der Basalwerte an polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen wurden 238 der 488 Urinproben (s. Tab. 5) zusätzlich ohne enzymatische Hydrolyse aufgearbeitet. Aus der Differenz der Isomaltose, bzw. Maltosemenge nach und vor der enzymatischen Hydrolyse wurde die Konzentration an polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen in den Urinen (n=238, Tab. 5) berechnet.

Die Quantifizierung erfolgte nach der unter Kap. 3.2.2.3 beschriebenen Vorgehensweise. Dabei wurden die Kalibrierfunktionen anhand von 6 Dextran Kalibrierstandards im Konzentrationsbereich von 12,5 µg/ml bis 250 µg/ml erstellt. Zur Abschätzung der Nachweisgrenze wurde zusätzlich ein Kalibrierstandard mit einer Dextrankonzentration von 3,9 µg/ml vermessen.

Tab. 4: Anzahl der aus den verschiedenen Sportarten untersuchten Proben zur Bestimmung der Gesamtkonzentration an Isomaltose und Maltose (1,6- und 1,4-verknüpfter Glukose) in Urin.

| Sportart | Anzahl der untersuchten Proben (n) |
|----------------|------------------------------------|
| Fußball | 163 |
| Eisschnelllauf | 61 |
| Skisport | 60 |
| Radfahren | 50 |
| Basketball | 34 |
| Bodybuilding | 18 |
| Schießen | 15 |
| Schwimmen | 13 |
| Leichtathletik | 12 |
| Eistanz | 10 |
| Judo | 8 |
| Billard | 6 |
| Bobsport | 6 |
| Eishockey | 5 |
| Sonstige | 27 |

Tab. 5: Anzahl der aus den verschiedenen Sportarten untersuchten Proben zur Bestimmung der Basalwerte von polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen in Urin.

| Sportart | Anzahl der untersuchten Proben (n) |
|---------------------------|------------------------------------|
| Fußball | 131 |
| Radfahren | 42 |
| Eisschnelllauf | 20 |
| Bodybuilding | 18 |
| Schießen | 15 |
| Leichtathletik (Marathon) | 12 |

3.2.4.2 Bestimmung der urinären Dextrankonzentration nach intravenöser Applikation von Dextran

Um die Gehalte an Dextran in Urin zu bestimmen, die nach einer intravenösen Applikation des Plasmavolumenexpanders auftreten, wurden 7 Urinproben von 3 weiblichen und 4 männlichen Patienten (s. Tab. 6) des Johanna-Etienne Krankenhauses in Neuss untersucht, denen 500 ml des Präparates Longasteril[®] (Dextran 70, Fresenius) im Rahmen einer klinischen Therapie intravenös verabreicht wurde.

Die Patienten wurden über den Zweck der wissenschaftlichen Studie informiert und gaben dazu ihre Einverständniserklärung ab. Der Urin der Patienten wurde für die in Tab. 6 angegebene Zeit mittels Katheter gesammelt, bevor die Urinprobe abgenommen wurde.

Aufgrund der hohen Dextrangehalte in den Proben, die außerhalb des Arbeitsbereichs der Methode lagen, wurden die Dextrankonzentrationen anhand einer Kalibrierfunktion im Konzentrationsbereich von 500-20000 µg/ml ermittelt.

Tab. 6: Übersicht über die anthropometrischen Daten der Probanden, die applizierte Dosis und den Zeitpunkt der Probennahme.

| | Geschlecht | Alter [Jahre] | Grösse [cm] | Gewicht [kg] | Dosis | Urinabnahme (Zeit nach Infusionsende) |
|-----------|------------|------------------|----------------|-----------------|--|---|
| Patient 1 | w | 90 | 153 | 51 | 500 ml Longasteril® (6% Dextran 70) in 30 min | 10 h |
| Patient 2 | m | 72 | 177 | 105 | | 11 h |
| Patient 3 | m | 70 | 177 | 85 | | 19 h |
| Patient 4 | w | 43 | 176 | 67 | | 9 h |
| Patient 5 | m | 77 | 164 | 70 | | 7 h |
| Patient 6 | w | 80 | 160 | 60 | | 8 h |
| Patient 7 | m | 62 | 180 | 73 | | 8,5 h |

3.3 Bestimmung von Mannitol mittels GC/MS

3.3.1 Methodenentwicklung

Um Mannitol in Urin zu identifizieren und zu quantifizieren, wurde eine Methode entwickelt, die eine gaschromatographische Trennung der möglicherweise in Urin vorkommenden Zuckeralkohole Allitol, Altritol, Dulcitol, Iditol, Sorbitol und Mannitol ermöglicht. Um diese Trennung zu gewährleisten, wurden die Zuckeralkohole in Anlehnung an die bei PETIT et al. (1980) und THEVIS et al. (2000b) beschriebenen Methoden durch Acetylierung in ihre Peracetate überführt und mittels GC/MS bestimmt. Die Identifizierung der Analyten erfolgte durch Analyse der peracetylierten Einzelsubstanzen Allitol, Altritol, Dulcitol, Iditol, Sorbitol und Mannitol (je 10 µg abs.) in urinärer Matrix mittels MS und chromatographisch durch Retentionszeitvergleich gegenüber $^{13}\text{C}_1$ -markiertem Mannitol (1 µg abs.). Zusätzlich wurden einem acetylierten Mischstandard der Analyten (10 µg/Substanz) die jeweiligen peracetylierten Einzelsubstanzen nacheinander zugegeben, um den jeweiligen Analyt durch den resultierenden Signalanstieg zu identifizieren. Es wurden ausschließlich die D-Formen von Sorbitol, Iditol, Mannitol und Altritol, bzw. die Mesoformen von Allitol und Galactitol als Referenzsubstanzen verwendet.

3.3.2 Probenvorbereitung

Ein Volumen von 20 µl des zu untersuchenden Urins wird zusammen mit 20 µl einer wässrigen Lösung des IS Allitol ($c=1$ mg/ml) in ein Schliffreagenzglas gegeben und für 2h im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Acetylierung erfolgt nach Zugabe einer Mischung aus Essigsäureanhydrid, Acetonitril und Pyridin (3:3:1, v:v:v). Nach zweistündigem Erhitzen bei 80°C und anschließender flüssig/flüssig Extraktion mit je 2 ml Chloroform und Reinstwasser wird die wässrige Phase entfernt und die verbleibende Chloroformphase am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 100 µl Isopropanol aufgenommen und mittels GC/MS untersucht.

3.3.3 GC/MS Parameter

| | |
|--------------------------|--|
| GC: | 6890 Series (Agilent, Waldbronn) |
| MS : | 5973 MSD (Agilent, Waldbronn) |
| Injektor: | split/splitless-Injektor, Temperatur: 300°C |
| Kapillarsäule: | HP-5MS; Länge: 16 m; Innerer Durchmesser: 0,2 mm; Filmdicke: 0,25 µm |
| Trärgas: | Helium; Fluss: 1,5 ml/min |
| Injektionsvolumen: | 2 µl; Splitverhältnis: 1:10 |
| Ofen-Temperaturprogramm: | 0 min 140°C, + 10°C/min auf 220°C, + 40°C/min bis 320°C; Laufzeit 10,5 min |
| Interface-Temperatur: | 280°C |
| Ionenquellentemperatur: | 230°C |
| Massenbereich: | 50-600 Da |
| Ionisation: | EI (70 eV) |

3.3.4 Ausscheidungsstudie

Um die urinäre Mannitol- und Sorbitolkonzentration nach oraler Applikation der entsprechenden Zuckeralkohole zu bestimmen, wurde eine Ausscheidungsstudie durchgeführt. Die teilnehmenden Probanden wurden über den Zweck der wissenschaftlichen Studie informiert und gaben dazu ihre Einverständniserklärung ab. Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Deutschen Sporthochschule Köln genehmigt.

Durchführung:

Drei männlichen und drei weiblichen gesunden Probanden (Tab. 7) wurde an 3 nicht aufeinanderfolgenden Versuchstagen (V) wässrige Lösungen von 10 g Mannitol (V 1), 10 g Sorbitol (V 2) und je 5 g Mannitol und Sorbitol (V 3) verabreicht. Die Urinabgabe erfolgte kurz vor der Applikation (0 h) und nach 2, 4, 6, 8 und 24 h.

Tab. 7: Übersicht über die anthropometrischen Daten der Probanden.

| | Geschlecht | Alter [Jahre] | Grösse [cm] | Gewicht [kg] |
|-----------|------------|------------------|----------------|-----------------|
| Proband 1 | m | 29 | 182 | 80 |
| Proband 2 | w | 28 | 170 | 55 |
| Proband 3 | w | 33 | 165 | 60 |
| Proband 4 | w | 31 | 168 | 65 |
| Proband 5 | m | 29 | 190 | 93 |
| Proband 6 | m | 33 | 180 | 75 |

Quantifizierung:

Für die Ermittlung der Mannitol- und Sorbitolkonzentration in den Ausscheidungsurinen wurden je 10 Kalibrierstandards in urinärer Matrix (Blankurin) im Konzentrationsbereich von 30 µg/ml bis 10000 µg/ml für die Bestimmung von Mannitol bzw. 5 µg/ml bis 400 µg/ml für die Bestimmung von Sorbitol nach der oben beschriebenen Methode aufgearbeitet. Der verwendete Blankurin wurde zuvor auf die Abwesenheit von Mannitol und Sorbitol hin untersucht. Aus den Verhältnissen der Peakflächen des Fragmentions m/z 289 des Analyten und des internen Standards in den entsprechenden Kalibrierlösungen wurde eine Kalibrierfunktion erstellt über die der Gehalt an Mannitol bzw. Sorbitol in den Ausscheidungsurinen bestimmt wurde.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Dextran

Mit dieser Arbeit sollte eine Methodik für die Bestimmung von Dextran in Urin entwickelt werden, die eine intravenöse Applikation des im Sport verbotenen Plasmavolumenexpanders zweifelsfrei anzeigt. Um dabei dem sehr hohen Probenaufkommen in der Dopinganalytik gerecht zu werden, sollte die Methodik, die bereits zum Screening und zur Identifizierung von HES dient, bezüglich einer Implementierung von Dextran evaluiert werden.

In der Screeningprozedur für HES führt die Anwesenheit von Dextran aufgrund der vollständigen Hydrolyse zu erhöhten Signalen der per-TMS Derivate der α - und β -D-Glukose im GC/MS-Chromatogramm. Durch Vergleich mit einem dextranhaltigen *quality control* Urin können nichtphysiologische Glukosegehalte semiquantitativ abgeschätzt und so verdächtige Proben identifiziert werden.

Mit der gaschromatographisch, massenspektrometrischen Untersuchung von 150 Urinproben nach der Methode der PMAAs (s. Kap. 2.2.6.3) wurde deutlich, dass geringe physiologische Gehalte an polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen in Urin vorkommen können. Aufgrund dieser Tatsache musste die entwickelte Methode neben der Identifizierung auch eine Quantifizierung der polymer 1,6-verknüpften Glukose ermöglichen, um ein Dopingvergehen durch Vergleich von physiologischen Werten in Urin vorkommender polymer 1,6-verknüpfter Glukose und erhöhten Konzentrationen, wie sie nach einer verbotenen Dextranapplikation gefunden werden, abzusichern.

4.1.1 Identifizierung von Dextran mittels GC/MS

Die gaschromatographisch-massenspektrometrische Charakterisierung des Analyten erfolgte anhand der Referenzsubstanz in urinärer Matrix. Dabei führte die Analyse des aus der Degradierung und Derivatisierung des Dextranpolymers (vgl. Kap. 3.1.1) erhaltenen PMAA zu dem in Abb. 9 dargestellten Chromatogramm. Als IS wurde hier $^{13}\text{C}_6$ -markierte Stärke verwendet, wobei nur das dominierende, aus der 1,4-Verknüpfung

der $^{13}\text{C}_6$ -Stärke resultierende PMAA 1,4,5-Triacetyl-2,3,6-trimethyl- $^{13}\text{C}_6$ -glucitol zur Auswertung verwendet wird, da dieses sowohl durch die gaschromatographische Trennung als auch massenspektrometrisch vom Analyten unterschieden werden kann. Wie das Chromatogramm in Abb. 9 zeigt, wird das Signal von 1,4,5-Triacetyl-2,3,6-trimethyl- $^{13}\text{C}_6$ -glucitol (IS) bei 4,78 min und das Signal des aus der Degradierung und Derivatisierung des Dextranpolymers entstandenen PMAA 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylglucitol bei 4,93 min detektiert.

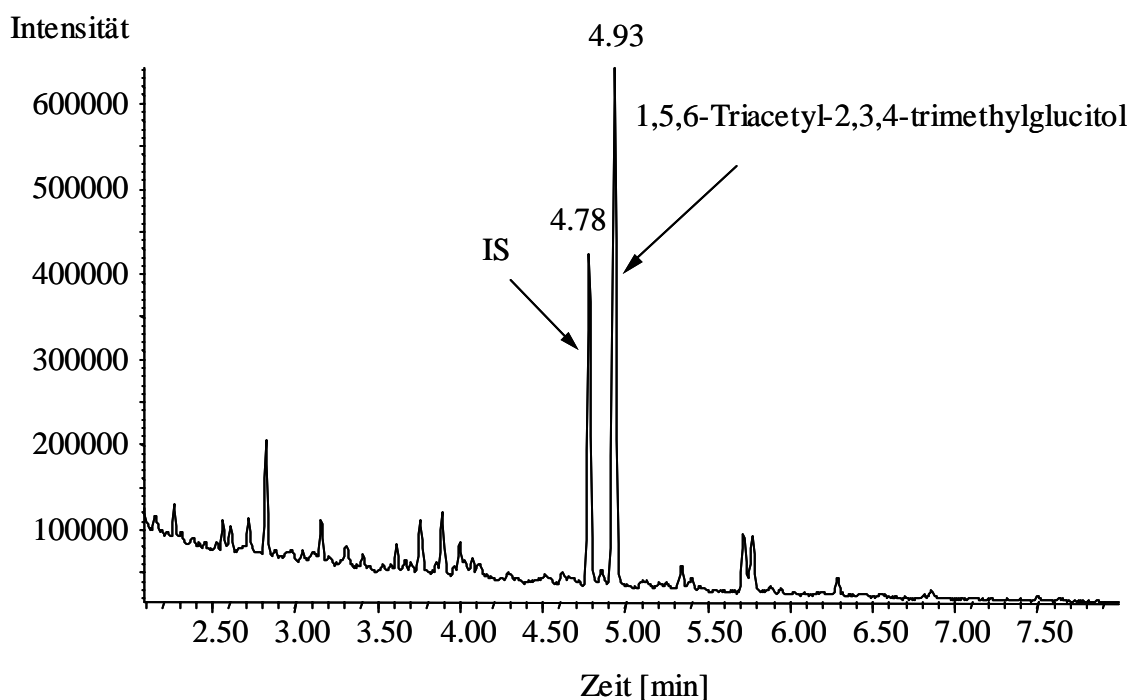


Abb. 9: Chromatogramm (TIC) eines Dextran-Referenzstandards in Urin ($c_{\text{Dextran}}=1$ mg/ml) mit den resultierenden PMAAs 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylglucitol (RT=4,93 min) und 1,4,5-Triacetyl-2,3,6-trimethyl- $^{13}\text{C}_6$ -glucitol (IS, $c_{\text{IS}}=0,5$ mg/ml, RT=4,78 min).

Das mittels EI erhaltene Massenspektrum von 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylglucitol (RT=4,93 min, Abb. 9) ist in Abb. 10 dargestellt. Dabei findet die Fragmentierung in ähnlicher Weise zu dem bei THEVIS et al. (2001) beschriebenen Fragmentierungsverhalten des PMAA der 1,4-verknüpften Glukose statt (s. Kap. 2.2.6.3).

Charakteristisch sind auch für 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylglucitol die durch den Bindungsbruch zwischen C-2 und C-3 entstandenen Fragmente mit m/z 233 und 117. Im Vergleich zum PMAA der 1,4-verknüpften Glukose (s. Abb. 5A) weisen die durch den

Bindungsbruch zwischen C-3 und C-4 entstandenen Fragmentionen m/z 189 und 161 jedoch deutlich höhere relative Intensitäten auf, da die Spaltung zwischen zwei benachbarten methoxylierten Kohlenstoffatomen gegenüber der Spaltung zwischen einem methoxylierten und einem acetoxylierten Kohlenstoffatom bevorzugt ist (BJÖRNDAL et al. 1970). Ausgehend von m/z 233, 189, 161 und 117 erklären sich durch die nachfolgende Abspaltung von Essigsäure (-60 Da), Keten (-42 Da), Methanol (-32 Da) oder Formaldehyd (-30 Da) die Fragmentationen bei m/z 173, 129, 101, 87 und 71. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von HELLERQVIST et al. (1990) überein, die in ihrer Arbeit bereits das gleiche Fragmentierungsverhalten des PMAA 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylglucitol beschrieben haben.

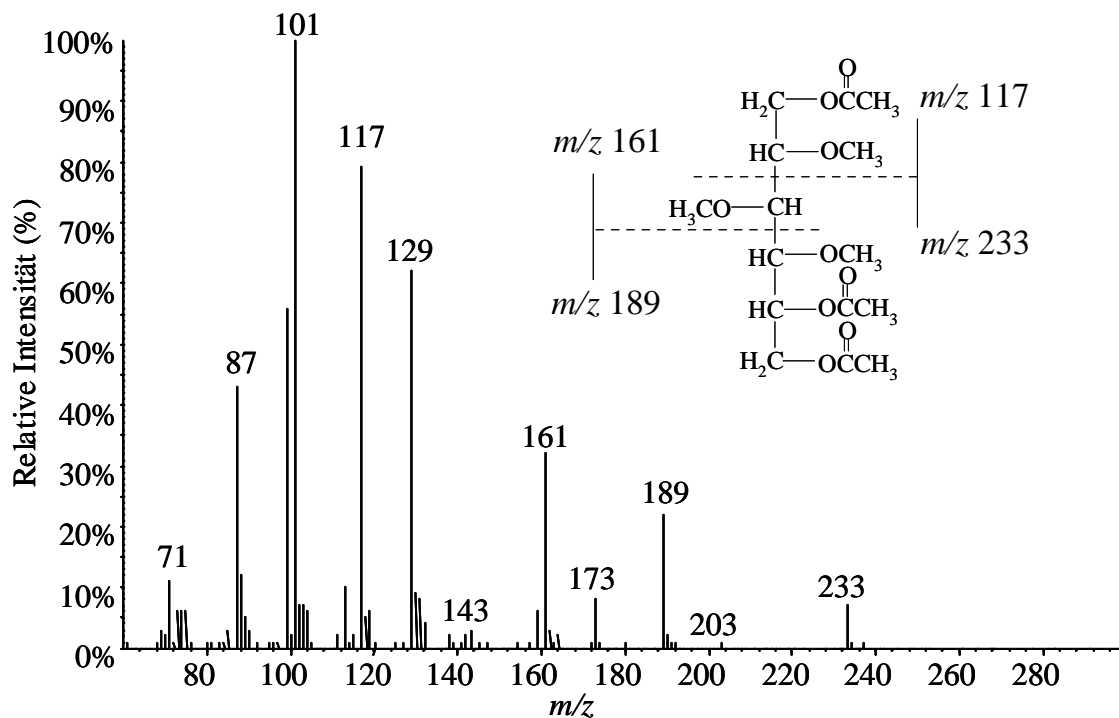


Abb. 10: EI-Massenspektrum des aus der Umsetzung von Dextran entstandenen PMAA 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylglucitol, $M_G=350$ Da.

Abbildung 11 zeigt das aus der Degradierung und Derivatisierung des IS ($^{13}\text{C}_6$ -Stärke) entstandene PMAA 1,4,5-Triacetyl-2,3,6-trimethyl- $^{13}\text{C}_6$ -glucitol. Obwohl sich die PMAAs strukturell unterscheiden, können aufgrund der ^{13}C -Markierung des 1,4,5-Triacetyl-2,3,6-trimethyl- $^{13}\text{C}_6$ -glucitols Rückschlüsse auf das Fragmentierungsverhalten von 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylglucitol gezogen werden. Im Vergleich zu 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylglucitol (Abb. 10) sind die durch den Bindungsbruch zwischen

C-2 und C-3, bzw. C-3 und C-4 entstandenen Fragmente aufgrund der vollständigen ^{13}C -Markierung des Glukosemoleküls um 2, 3 oder 4 Da verschoben, je nachdem wie viele markierte Kohlenstoffatome im Fragment verbleiben. So ist das korrespondierende Ion zu m/z 117 um 2 Da nach m/z 119, die korrespondierenden Ionen zu m/z 161 und 189 um 3 Da nach m/z 164 und 192 und schließlich das korrespondierende Fragment zu m/z 233 um 4 Da nach m/z 237 verschoben. Diese Ergebnisse untermauern die vorgeschlagene, durch Bindungsbruch der Kohlenstoffkette bestimmte Fragmentierung des aus der Degradierung und Derivatisierung des Dextranmoleküls entstandenen PMAA 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylglucitol. Die Fragmentationen bei m/z 164 und 192 weisen aufgrund der Spaltung zwischen einem methoxylierten und einem acetoxylierten Kohlenstoffatom im Vergleich zu den korrespondierenden Ionen von 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethylglucitol deutlich geringere relative Intensitäten auf.

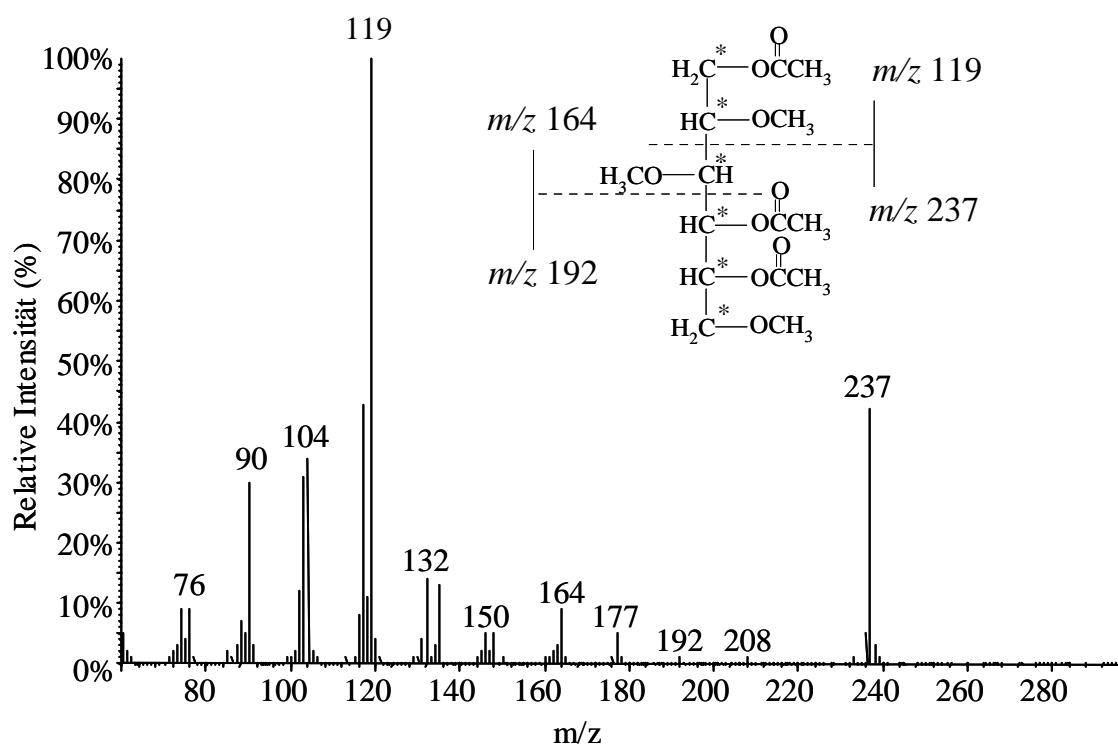


Abb. 11: EI-Massenspektrum des PMAA 1,4,5-Triacetyl-2,3,6-trimethyl- $^{13}\text{C}_6$ -glucitol, $M_G=356$ Da; markierte Kohlenstoffe sind mit * gekennzeichnet

Nachfolgende Fragmentierungsschritte des 1,4,5-Triacetyl-2,3,6-trimethyl- $^{13}\text{C}_6$ -glucitols (IS) bestehen wiederum in der Abspaltung von Essigsäure (-60 Da), Keten (-42

Da) oder Methanol (-32 Da), die zu den Fragmentionen m/z 177, 150, 132 und 104 führen.

Die Methode der PMAAs erlaubt eine eindeutige Identifizierung des aus Dextran (polymer 1,6-verknüpfter Glukose) entstandenen PMAA 1,5,6-Triacetyl-2,3,4-trimethyl-glucitol anhand der Retentionszeit und des Massenspektrums mit den charakteristischen Fragmentionen und deren relativen Intensitäten im TIC.

4.1.1.1 Methodenoptimierung zur quantitativen Bestimmung von Dextran mittels GC/MS

Wichtig für die quantitative Bestimmung von Dextran ist die Wahl des IS, da aufgrund der Komplexität der Probenaufarbeitung mit den Derivatisierungsschritten Methylierung und Acetylierung, der salzsauren Hydrolyse des Polymers, der Reduktion der entstehenden Glukosemonomere und einer zweimaligen flüssig/flüssig-Extraktion eine Kontrolle der einzelnen Schritte und Korrektur über einen IS für die Quantifizierung unerlässlich ist. Im Rahmen der Methodenoptimierung wurden als ISs die kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen $^{13}\text{C}_6$ -Glukose, $^{13}\text{C}_6$ -Stärke und Amylose getestet, die sich während der Aufarbeitung und der anschließenden Analyse aufgrund ihrer Struktur und ihren chemischen Eigenschaften als Mono- oder Polysaccharide ähnlich dem Analyten verhalten sollten.

$^{13}\text{C}_6$ -Glukose

Für $^{13}\text{C}_6$ -markierte Glukose, die zu Beginn der Aufarbeitung in wässriger Lösung zugegeben wurde, zeigten die mittels verschiedener Kalibrierlösungen erhaltenen Kalibrierfunktionen keinerlei Linearität und eine schlechte Reproduzierbarkeit. Eine Veränderung einzelner Parameter der Derivatisierung, wie die Menge der Derivatisierungsreagenz, die Derivatisierungsdauer und -temperatur sowie eine Variation des Arbeitsbereiches und der urinären Matrix, brachte keine deutliche Verbesserung. Mögliche Ursachen für die fehlende Eignung des IS bezüglich der quantitativen Bestimmung von Dextran könnten in der fehlenden Kontrolle der salzsauren Hydrolyse und im unterschiedlichen Verhalten des als Monomer vorliegenden IS gegenüber den einzelnen Derivatisierungsschritten liegen.

¹³C₆-Stärke

Um die aufgrund der monomeren Struktur von ¹³C₆-Glukose auftretenden Probleme zu lösen, wurde ¹³C₆-markierte Stärke als IS getestet. Das Polysaccharid ermöglicht die Kontrolle der Hydrolyse und sollte sich bezüglich der einzelnen Derivatisierungsschritte, im Gegensatz zu ¹³C₆-Glukose, dem Analyten ähnlicher verhalten. Aufgrund der Wasserunlöslichkeit des IS wurde dieser in DMSO gelöst und vor dem Anlösen zu den getrockneten Proben gegeben.

Zunächst wurden Kalibrierfunktionen im Konzentrationsbereich von 10 µg/ml bis 2 mg/ml ermittelt (Abb. 12). Der Graph zeigt den Quotienten des Ions *m/z* 233 (Dextran) zu *m/z* 237 (IS) in Abhängigkeit von der Konzentration. Die gezeigte Kalibrierfunktion folgt einem Regressionsmodell zweiten Grades. Es wurde jedoch mit der wiederholten Aufarbeitung der Kalibrierlösungen deutlich, dass die in Abb. 12 dargestellten Ergebnisse nicht reproduzierbar waren.

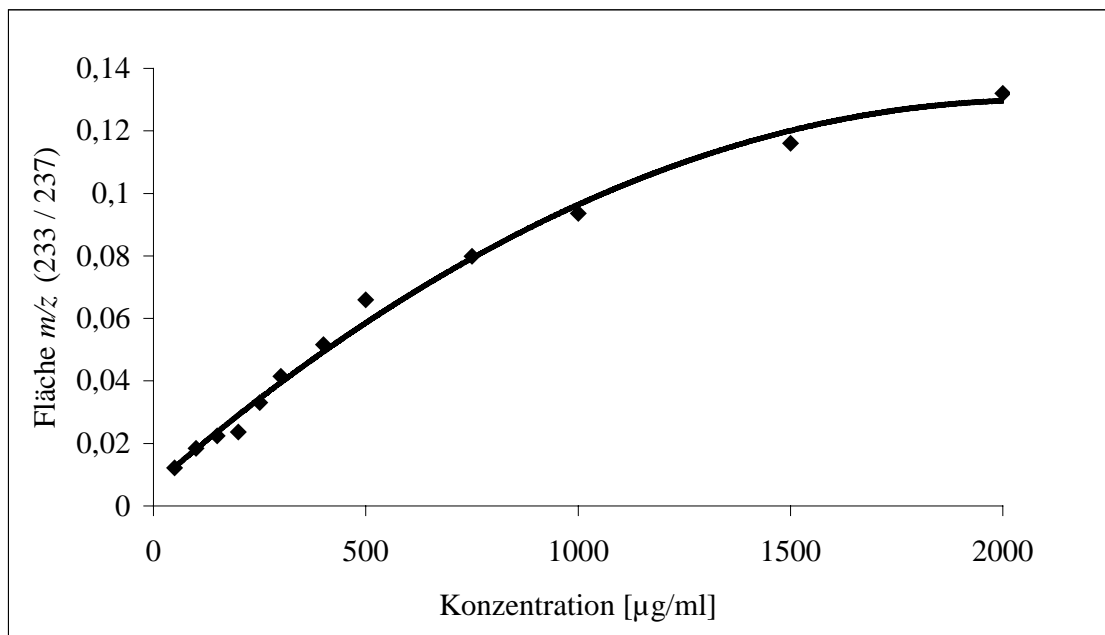


Abb. 12: Dextran-Kalibrierfunktion im Konzentrationsbereich von 10 µg/ml bis 2 mg/ml

Der Arbeitsbereich der Methode muss sowohl die Quantifizierung von physiologisch vorkommenden Mengen an polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen, welche im unteren µg/ml-Bereich liegen können, als auch die Bestimmung urinärer Dextrankonzentrationen im unteren mg/ml-Bereich, wie sie nach einer Infusion auftreten können (vgl. Kap. 4.1.6), gewährleisten. Eine Variation sowie die Trennung

des Arbeitsbereiches auf einen niedrigen und einen hohen Konzentrationsbereich (s. Kap. 3.1.3) brachte jedoch keine Verbesserung der Ergebnisse mit sich.

Zusätzlich wurden einzelne kritische Schritte der Probenaufarbeitung verändert. Bezüglich der Methylierung wurde die Methyliodidmenge und die Dauer der Methylierung im Ultraschallbad variiert. Außerdem wurde der Einfluss der Temperatur, der Zeit und der Menge der Acetylierungsreagenzien auf die erhaltenen Ergebnisse bestimmt.

Weitere Parameter, die eine Bestimmung der PMAAs beeinflussen können, wie die urinaire Matrix und die Material- und Oberflächenbeschaffenheit der verwendeten Reaktionsröhrchen, wurden ebenfalls untersucht. Als Reaktionsröhrchen wurden verschiedene Borosilicat-Schliffreagenzgläser, von denen einige zusätzlich silyliert wurden, um die Glasoberfläche zu deaktivieren und Reaktionsröhrchen aus *high density*-Polyethylen und Polystyrol getestet. Die veränderte Probenvorbereitung und die Verwendung unterschiedlicher Reaktionsröhrchen brachte jedoch keine Verbesserung der Ergebnisse mit sich. Mit der Untersuchung des Einflusses der urinären Matrix wurde deutlich, dass diese nicht ausschließlich für die schlechte Reproduzierbarkeit der Methode verantwortlich sein kann, da die Reproduzierbarkeit auch bei der Bestimmung von rein wässrigen Dextran-Kalibrierlösungen nicht wesentlich verbessert war.

Möglicherweise liegen die Schwierigkeiten der Analytik weiterhin in der Wahl des IS begründet, da Stärke ($^{13}\text{C}_6$ -Stärke) und Dextran sich hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur zu stark unterscheiden. Stärke bildet im Gegensatz zu Dextran definierte Sekundärstrukturen in Form einer Doppelhelix aus (BELITZ und GROSCH 1992). Dextran hingegen besitzt nur eine geringe Tendenz zur Ausbildung stabiler geordneter Bereiche mit definierter Sekundärstruktur und liegt in wässrigen Lösungen als stark hydratisiertes, weitgehend ungeordnetes Knäuel vor (GRUBER 1964). Diese strukturellen Unterschiede könnten den Grund für ein unterschiedliches Verhalten während der Aufarbeitung darstellen. Die Verwendung von Amylose als IS führte zu deutlich verbesserten Ergebnissen. Dieser Ansatz wurde jedoch nicht weiter verfolgt, da die resultierenden PMAAs aus Amylose nicht von denen, aus physiologisch vorkommender 1,4-verknüpfter Glukose zu unterscheiden sind und somit Amylose als IS nicht geeignet ist. Es bleibt festzustellen, dass die Ursachen für die schlechten Ergebnisse nicht abschließend geklärt werden konnten.

4.1.1.2 Relative Standardabweichung einzelner Teilschritte der PMAA-Methode

Zur Identifizierung der kritischen Punkte während der Aufarbeitung, die für die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verantwortlich sind, wurde die relative Standardabweichung einzelner Teilschritte der PMAA-Methode mit Hilfe der Gleichung (1) ermittelt.

$$S_{\text{ges}}^2 = S_{\text{Me}}^2 + S_{\text{Hy}}^2 + S_{\text{Hd}}^2 + S_{\text{Ac}}^2 \quad (1)$$

| | |
|--------------------|--|
| S_{ges} : | relative gesamte Standardabweichung |
| S_{Me} : | relative Standardabweichung der Methylierung |
| S_{Hy} : | relative Standardabweichung der Hydrolyse |
| S_{Hd} : | relative Standardabweichung der Hydrierung |
| S_{Ac} : | relative Standardabweichung der Acetylierung |

Um die relative Standardabweichung der Teilschritte Methylierung, Hydrolyse, Hydrierung und Acetylierung zu ermitteln, wurde zunächst die relative Standardabweichung (S_{ges}) der gesamten Methode bestimmt (vgl. 3.1.3.1., 4.). Als interner Standard diente dabei $^{13}\text{C}_6$ -Stärke. Gemäß der nach 3.1.3.1, 1. bis 3. durchgeführten Bestimmungen konnte mittels der oben angegebenen Formel die rel. Standardabweichung der einzelnen in Tab. 8 genannten Teilschritte errechnet werden. Wie in Tab. 8 ersichtlich wird, besitzt die Methylierung mit 46,1 % eine hohe rel. Standardabweichung, die sich im Bereich von S_{ges} der Methode bewegt. Die rel. Standardabweichung der Hydrierung ist mit 18,6 % ebenfalls nicht befriedigend. Mit der Ermittlung der rel. Standardabweichungen der Teilschritte wird deutlich, dass neben der Hydrierung die Methylierung hauptsächlich für die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verantwortlich ist.

Tab. 8: Rel. Standardabweichung einzelner Teilschritte der PMAA-Methode

| | Relative Standardabweichung |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| Gesamte Methode (S_{ges}) | 50,4 % |
| Methylierung (S_{Me}) | 46,1 % |
| Hydrolyse (S_{Hy}) | 6,2 % |
| Hydrierung (S_{Hd}) | 18,6 % |
| Acetylierung (S_{Ac}) | 5,5 % |

Die hier angewendete Methode zur Methylierung soll nach CIUCANU und KEREK (1984) quantitativ verlaufen und Ausbeuten von ca. 98 % ermöglichen. Diese Ergebnisse wurden jedoch nur bei der Untersuchung von Mono- und Disacchariden erhalten. Kritische Punkte während der Probenvorbereitung können unerwünschte Nebenreaktionen darstellen. So können während der Methylierung die Hydroxylgruppen eines Kohlenhydrats durch Oxidationsreaktionen bei der Umsetzung mit Methyljodid und DMSO in Gegenwart von NaOH in ihre Aldehydform überführt werden (CIUCANU 2003). Weitere unerwünschte Nebenprodukte können durch Demethylierungsreaktionen während der salzsauren Hydrolyse entstehen (BJÖRNDAL 1970, HANISCH 1994).

Die Eignung der PMAA-Methode zur Quantifizierung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So soll die Methode nach BJÖRNDAL et al. (1970) quantitative Aussagen ermöglichen, nach HANISCH (1994) ist die quantitative Aussagekraft jedoch deutlich beschränkt. Die in der Literatur diskutierten Ergebnisse basieren in erster Linie auf der Analyse der reinen Referenzsubstanzen oder der durch geeignete Probenvorbereitung isolierten Analyten. Die quantitative Bestimmung von Dextran wird durch die äußerst komplexe Matrix Urin mit einer Vielzahl möglicher vorkommender Kohlenhydrate erschwert. Dazu kommt, dass ein geeigneter IS nicht gefunden werden konnte. Die damit verbundenen Probleme wie die schlechte Reproduzierbarkeit konnten mit der Methodenoptimierung nicht gelöst werden. Es wurde deshalb ein anderer Methodenansatz unter Umgehung der komplexen Probenvorbereitung, vor allem der Methylierung, zur Quantifizierung von Dextran verfolgt.

4.1.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von Dextran mittels LC-APCI-MS/MS

Die Kombination der Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie stellt eine wichtige Technik in der Analytik von schwerflüchtigen Verbindungen wie z. B. Kohlenhydraten dar. Hierbei wird die Elektrospray-Ionisation als die am weitesten verbreitete Kopplungstechnik bei der Bestimmung von Zuckern eingesetzt und bildet in Kombination mit der Massenspektrometrie auf der Basis einer kollisions-induzierten Dissoziation (CID) eine unverzichtbare Technik zur Strukturaufklärung von Kohlenhydraten (OHASHI 1997, MANO 2003). Die Ionisierung mittels APCI findet hingegen in der Kohlenhydratanalytik bisher seltener Anwendung.

Um Dextran mittels LC-MS/MS quantitativ bestimmen zu können, wird das polydisperse Polymer in Anlehnung an die bei JANSON und PORATH (1966) beschriebene Methode in einem ersten Schritt enzymatisch gespalten. Wie in Abb. 13 dargestellt, katalysiert dabei das verwendete Enzym Dextranase (1,6- α -D-glukan 6-glukano-Hydrolase), eine α -1,6-Glukosidase, die endohydrolytische Spaltung der α -1,6-glykosidischen Bindungen des Polymers, welche zu einer Freisetzung von Isomaltoseuntereinheiten führt.

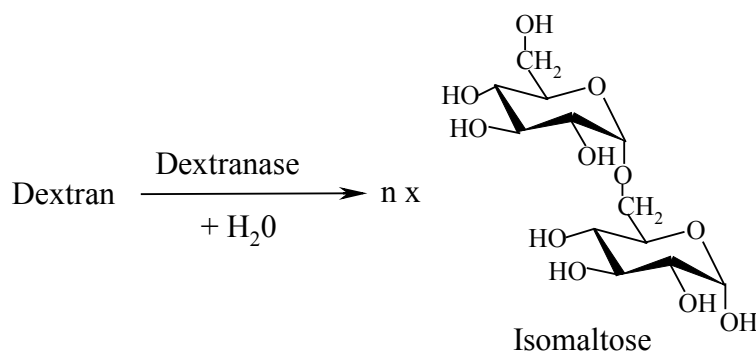


Abb. 13: Enzymatische Spaltung von Dextran durch Dextranase

Für die spezifische Bestimmung der aus Dextran freigesetzten Isomaltose sollte die zu entwickelnde Methode eine chromatographische Trennung des Analyten von physiologisch in Urin vorkommenden Disacchariden wie Saccharose, Lactose und Maltose ermöglichen. Zu Beginn der Methodenentwicklung wurde zunächst das

chromatographische Verhalten der underivatisierten „freien“ Disaccharide untersucht. Unter Verwendung einer speziellen Säule zur Trennung von Kohlenhydraten (Nucleosil Carbohydrate, Macherey-Nagel) konnte dabei eine Auftrennung von Isomaltose und Maltose erreicht werden. Jedoch konnten die Analyten weder nach positiver noch nach negativer Ionisierung mittels Elektrospray und anschließender massenspektrometrischer Detektion empfindlich nachgewiesen werden.

Um zum Einen die Empfindlichkeit zu steigern und zum Anderen eine unkomplizierte Implementierung der Methode in die bestehende LC-MS/MS Routine-Dopinganalytik zu ermöglichen, wurden die Analyten, wie in Abb. 14 dargestellt, peracetyliert und anschließend mittels LC-APCI-MS/MS bestimmt.

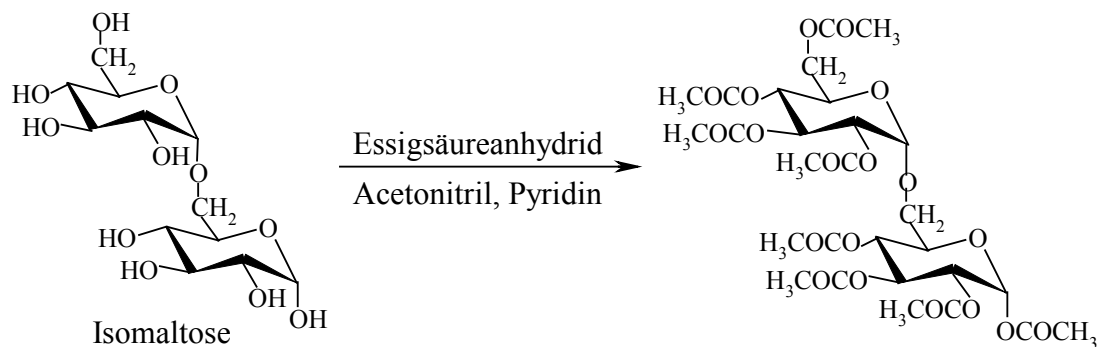


Abb. 14: Peracetylierung der freigesetzten Isomaltose

Während der Derivatisierung werden acht Acetylgruppen in das Isomaltosemolekül eingeführt, was zu einem Molekulargewicht von 678 Da führt. Als IS für alle Bestimmungen wurde $^{13}\text{C}_6$ -markierte Glukose verwendet, welche zwar keine Kontrolle der enzymatischen Hydrolyse jedoch eine Kontrolle aller anderen Schritte der Probenvorbereitung erlaubt. Die Verwendung von methyliertem Dextran (Eigensynthese) als IS, bei dem pro Glukoseeinheit eine Methylgruppe eingeführt wurde, scheiterte an der ausbleibenden enzymatischen Spaltung durch die verwendete Dextranase. Ein IS, der sich während der gesamten Probenvorbereitung ideal verhält, wie z. B. ^{13}C -markiertes Dextran, stand nicht zur Verfügung.

4.1.2.1 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Charakterisierung

Das massenspektrometrische Verhalten der peracetylierten Isomaltose und des peracetylierten IS $^{13}\text{C}_6$ -Glukose wurde nach Elektrospray-Ionisation im positiven Modus untersucht. Dabei wiesen die Signale der Ammoniumadduktionen $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ der peracetylierten Isomaltose (m/z 696) und des IS $^{13}\text{C}_6$ -Glukose (m/z 414) im *full-scan* Modus des Instrumentes die höchste Intensität auf. Der kollisions-induzierte Zerfall (CID) der Ammoniumadduktionen ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, m/z 696) der peracetylierten Isomaltose führt zu dem in Abb. 15 dargestellten Produktionspektrum.

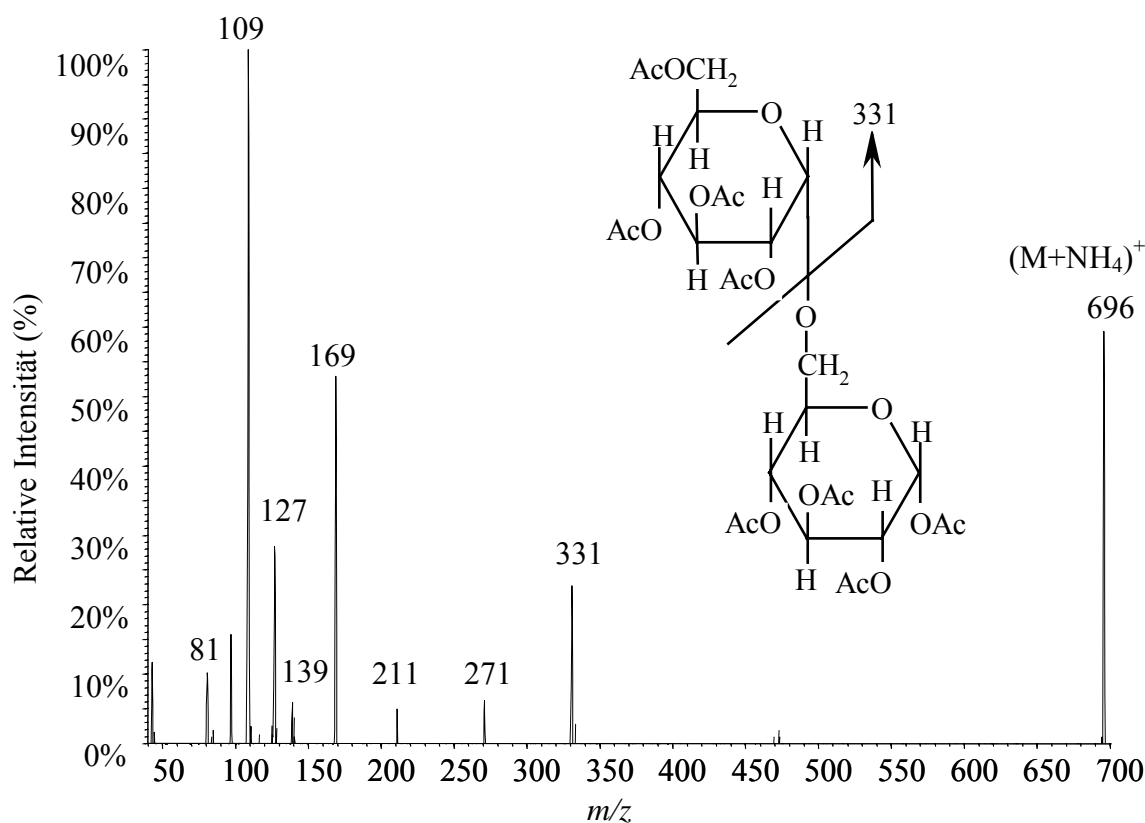


Abb. 15: ESI-Produktionspektrum der peracetylierten Isomaltose ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, m/z 696)

Um Rückschlüsse auf das Fragmentierungsverhalten der peracetylierten Isomaltose zu gewinnen, wurde mit stabilen Isotopen markierte ($^2\text{H}_{24}$)-peracetylierte Isomaltose hergestellt und vermessen (Abb. 16).

Es ist als wahrscheinlich anzusehen, dass der Verlust von Ammoniak und die nachfolgende Spaltung der glykosidischen Bindungen zu dem in Abb. 15 dargestellten Fragmentation m/z 331 führt, da das korrespondierende Fragment im Fall von ($^2\text{H}_{24}$)-peracetylierter Isomaltose um 12 Da nach m/z 343 verschoben ist (Abb. 16). Dies macht deutlich, dass das Fragment m/z 331 noch 4 Acetylgruppen trägt. Ausgehend von m/z 331 besteht die weitere Fragmentierung zu m/z 271 und m/z 211 aus einer aufeinanderfolgenden Abspaltung von Essigsäure (-60 Da). Analog wird bei der deuterierten Verbindung (Abb. 16) ausgehend von m/z 343 der aufeinanderfolgende Verlust von ($^2\text{H}_3$)-Essigsäure (-63 Da) beobachtet, der zu m/z 280 und m/z 217 führt. Aus Fragment m/z 211 entstehen möglicherweise durch die aufeinanderfolgende Abspaltung von Keten (-42 Da) weitere Produktionen bei m/z 169 und m/z 127.

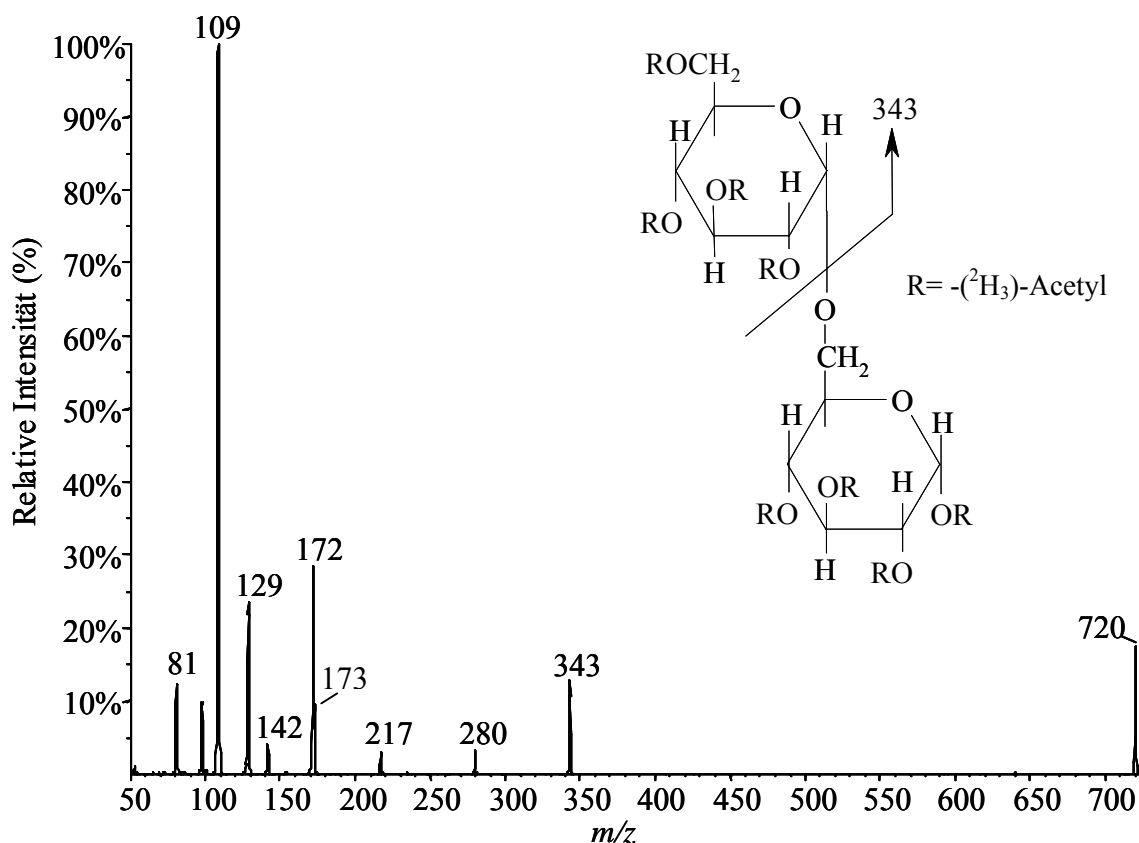


Abb. 16: ESI-Produktionenspektrum der ($^2\text{H}_{24}$)-peracetylierten Isomaltose ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, m/z 720)

Diese Annahme wird unterstützt von der Tatsache, dass aus dem entsprechenden Fragment m/z 217 in Abb. 16, welches noch sechs Deuterien trägt, durch den wiederholten Verlust von ($^2\text{H}_2$)-Keten (-44 Da) die Produktionen m/z 173 und 129

generiert werden. Das Produktion m/z 109 geht wahrscheinlich wiederum durch Verlust von Essigsäure aus Fragment m/z 169 hervor. Diese Abspaltung kann auch im Produktionenspektrum der ($^2\text{H}_{24}$)-peracetylierten Isomaltose postuliert werden, bei der aus Fragment m/z 172 durch Verlust von ($^2\text{H}_3$)-Essigsäure (-63 Da) das Ion m/z 109 entsteht, das offensichtlich keine Deuterien mehr trägt.

Im Vergleich zum massenspektrometrischen Verhalten der peracetylierten Isomaltose zeigen die aus den Ammoniumadduktionen $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ der $^{13}\text{C}_6$ -markierten Glukose (m/z 414, IS) generierten Produktionen eine Massenverschiebung von 6 Da, die mit der Einführung von sechs ^{13}C -markierten Kohlenstoffatomen in das Glukosemolekül einhergeht (Abb. 17). Durch den Verlust von Essigsäure und Ammoniak entsteht wahrscheinlich aus dem Ammoniumadduktion m/z 414 das korrespondierende Fragmentation zu m/z 331 (Abb. 15), das bei m/z 337 detektiert wird.

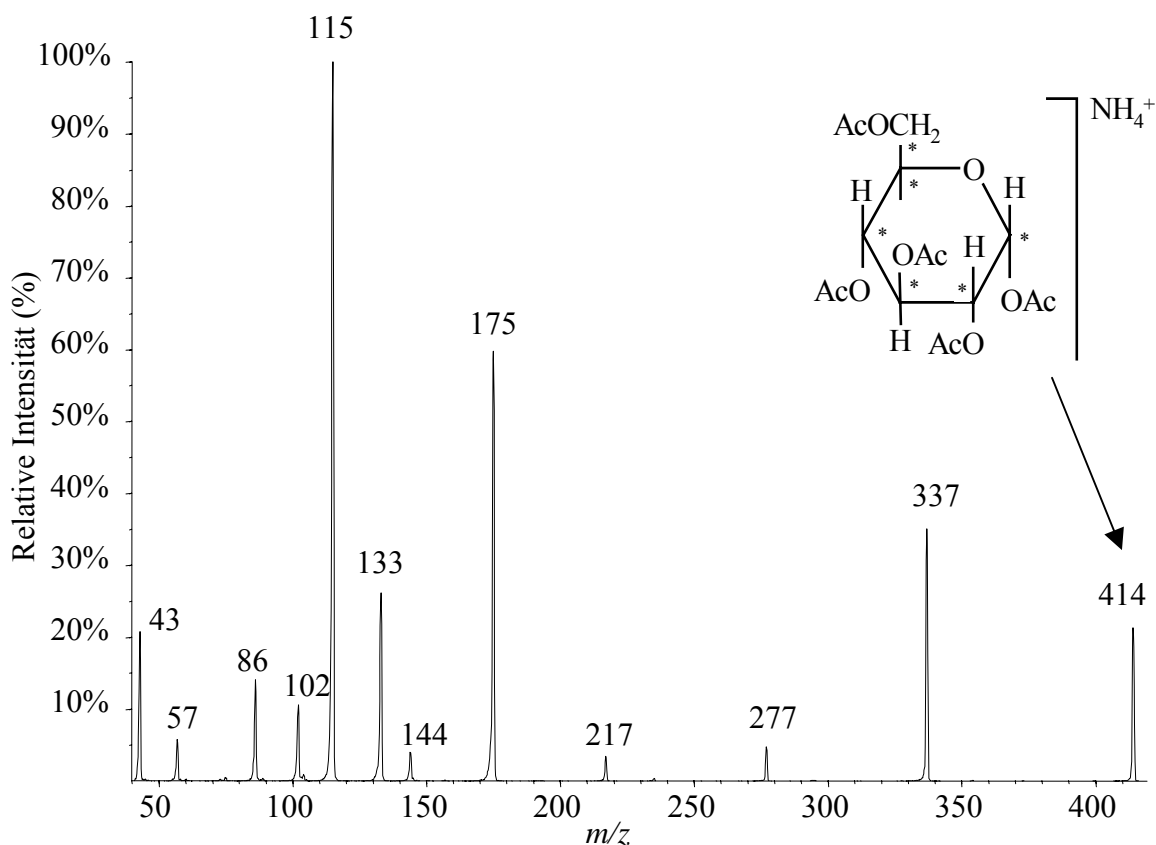


Abb. 17: ESI-Produktionenspektrum der peracetylierten $^{13}\text{C}_6$ -Glukose ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, m/z 414)

Weitere Fragmentationen bei m/z 277 und 217, bzw. m/z 175, m/z 133 und m/z 115 könnten wiederum aus dem aufeinanderfolgenden Verlust von Essigsäure (-60 Da), bzw. aus dem Verlust von Essigsäure und Keten (-42 Da) hervorgehen. Die Tatsache,

dass die Mehrzahl der Fragmente alle sechs markierten Kohlenstoffe trägt, bestätigt den vorgeschlagenen Fragmentierungsweg, der hauptsächlich durch die Abspaltung der Acetatgruppen bedingt wird.

Es bleibt festzustellen, dass eine Unterscheidung der isomeren Analyten Isomaltose und Maltose massenspektrometrisch nicht möglich ist. Vergleicht man das in Abb. 18 dargestellte Produktionenspektrum der peracetylierten Maltose mit dem der Isomaltose (Abb. 15), so wird deutlich, dass beide Substanzen nahezu identische Verhältnisse in den erzeugten Produktionen aufweisen.

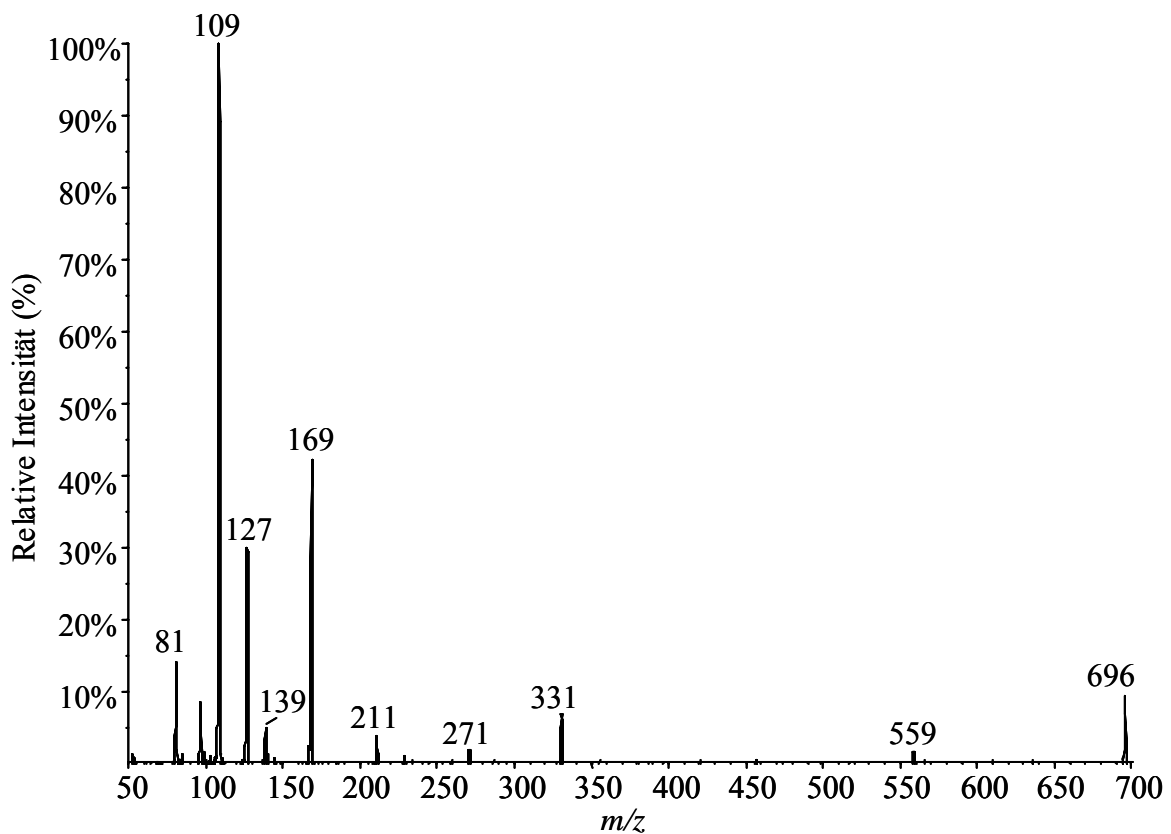


Abb. 18: ESI-Produktionenspektrum der peracetylierten Maltose ($[M+NH_4]^+$, m/z 696)

Den einzigen Unterschied im Produktionenspektrum der Maltose stellt das bei m/z 559 detektierte Fragment dar, das wahrscheinlich durch den Verlust von Ammoniak und die zweifache Abspaltung von Essigsäure entsteht. Aufgrund der geringen relativen Intensität des Produktions von ca. 2 % im Produktionenspektrum der reinen

Referenzsubstanz wird es jedoch nicht zur Unterscheidung der Analyten in Urin herangezogen.

4.1.2.2 Flüssigkeitschromatographie

Die Trennung der isomeren, peracetylierten Disaccharide Lactose, Saccharose und Isomaltose, die mit den gleichen Ionenübergängen detektiert werden, gelingt auf einer Zorbax SB-C18 Säule (Agilent, Waldbronn) durch den angewendeten linearen Gradienten. Dabei wird der Acetonitrilanteil von anfänglich 10% innerhalb von 20 min auf 90% erhöht. Die Identifizierung der einzelnen Analyten wurde dabei durch Messung der Einzelverbindungen und durch Zudotierungsexperimente bestätigt. Peracetylierte Maltose und Isomaltose können im Vergleich zu der oben erwähnten Trennung der unterivatisierten Disaccharide unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen nicht getrennt werden. Auch mit der Veränderung des Gradientenprogramms und der Verwendung chromatographischer Trennsäulen mit unterschiedlichen stationären Phasen konnte keine Trennung erreicht werden. Der sich daraus ergebende Spezifitätsmangel wird jedoch bei der später näher erläuterten Vorgehensweise zur Bestimmung von Dextran berücksichtigt, indem jede Probe einmal mit und einmal ohne enzymatische Hydrolyse aufgearbeitet wird (s. Kap. 4.1.3). Mittels dieser Doppelbestimmung lässt sich nun indirekt die Isomaltosemenge bestimmen, die aus der enzymatischen Hydrolyse des Dextrans hervorgeht.

Wie in Abb. 19 dargestellt, werden die peracetylierten Analyten $^{13}\text{C}_6$ -Glukose (IS, m/z 414 \rightarrow 175) bei 12,67 min, Laktose (m/z 696 \rightarrow 169) bei 14,60 min, Saccharose (m/z 696 \rightarrow 169) bei 14,84 min und Isomaltose (m/z 696 \rightarrow 169) bei einer Retentionszeit von 15,08 min detektiert.

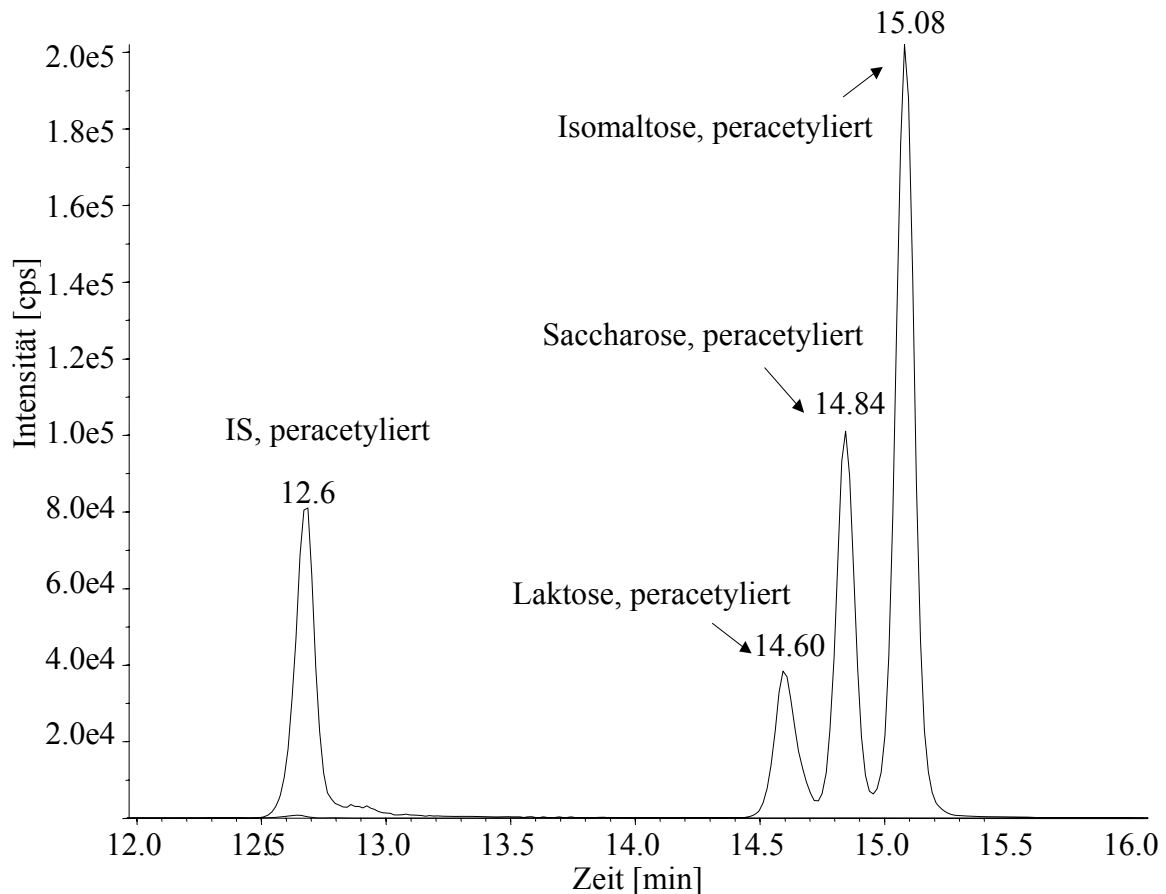


Abb. 19: Chromatogramm der Ionenübergänge m/z 696→169 der peracetylierten Disaccharide Laktose ($c=100 \mu\text{g/ml}$), Saccharose ($c=250 \mu\text{g/ml}$) und Isomaltose ($c=500 \mu\text{g/ml}$) und m/z 414→175 der peracetylierten $^{13}\text{C}_6$ -Glukose ($c_{\text{IS}}=100 \mu\text{g/ml}$)

4.1.2.3 Enzymatische Hydrolyse

Für die erforderliche Quantifizierung von Dextran sollte die enzymatische Hydrolyse vollständig sein, da eine Kontrolle der Hydrolyse mit dem verwendeten IS nicht möglich ist. Es wurde daher die Kinetik der enzymatischen Hydrolyse untersucht, indem Aliquote eines Mischurins ($c_{\text{Dextran}}=500 \mu\text{g/ml}$) unterschiedlich lange (0,25–8 h) hydrolysiert wurden. Die optimale Temperatur (37 °C) und der optimale pH-Wert (6) für die enzymatische Hydrolyse wurden, wie vom Hersteller (Sigma) angegeben, übernommen. Wie in Abb. 20 deutlich wird, ist unter den gegebenen Bedingungen die Hydrolyse bereits nach 0,5 h vollständig abgeschlossen. Um auch eine vollständige Hydrolyse höherer Dextranskonzentrationen zu gewährleisten, wurden für die Probenaufarbeitung Hydrolysezeiten von 1 h festgelegt. In dieser Zeit sollten nach

Herstellerangaben bei Verwendung von 1,25 U der Dextranase ca. 26 mg Isomaltose aus Dextran freigesetzt werden.

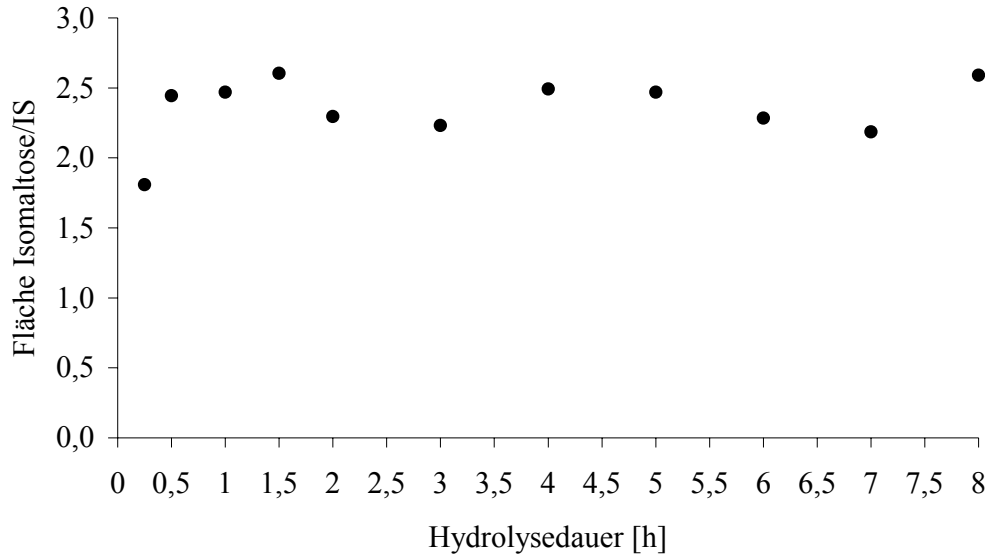


Abb. 20: Kinetik der enzymatischen Hydrolyse von Dextran ($c_{\text{Dextran}}=500 \mu\text{g/ml}$) unter Verwendung von 1,25 U Dextranase (Temp.= 37 °C, pH=6)

4.1.3 Identifizierung und quantitative Bestimmung von Dextran in Humanurin

In der Dopinganalytik erfolgt die Identifizierung verbotener Substanzen mittels LC-MS/MS nach den Kriterien der WADA (WADA 2005), die einen Vergleich der Retentionszeit und der relativen Intensitäten mindestens dreier Ionenübergänge des Analyten mit einem externen Kalibrierstandard vorsieht (Abb. 21). Voraussetzung ist dabei, dass Substanzen mit ähnlichen Massenspektren chromatographisch getrennt werden. Dies konnte für Isomaltose und dem Strukturisomer Maltose im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht werden. Eine Identifizierung von Dextran wird jedoch aufgrund des angewendeten Messprinzips und der Spezifität von Dextranase ermöglicht.

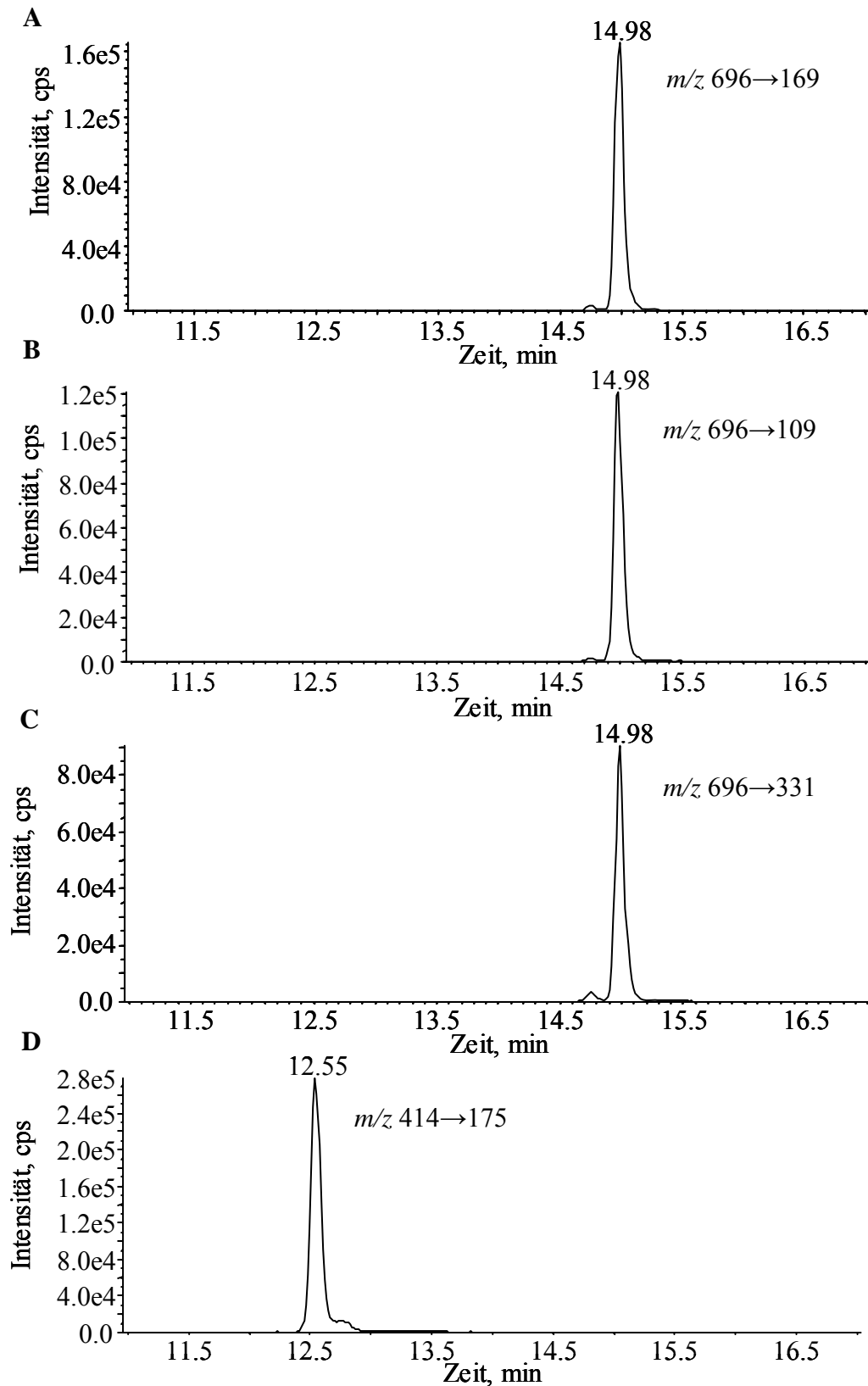


Abb. 21: Chromatogramm eines Dextran-Kalibrierstandards in urinärer Matrix: Ionenübergänge m/z 696 \rightarrow 169 (A), m/z 696 \rightarrow 109 (B) und m/z 696 \rightarrow 331 (C) der peracetylierten Isomaltose und m/z 414 \rightarrow 175 (D) der peracetylierten $^{13}\text{C}_6$ -Glukose (IS).

Die Identifizierung des Plasmavolumenexpanders Dextran in Humanurin erfordert eine Doppelbestimmung einer jeden Probe (Abb. 22). Dabei wird jede Probe einmal mit und einmal ohne enzymatischer Hydrolyse aufgearbeitet.

In Abb. 22 A ist das, mit der Bestimmung eines nicht enzymatisch hydrolysierten Dextran-Kontrollurins (QC, $c_{\text{Dextran}}=500 \mu\text{g/ml}$) erhaltene Chromatogramm dargestellt. Aus der Intensität des bei 14,98 min detektierten Signals des Ionenübergangs m/z 696 \rightarrow 169, ergibt sich ein möglicher Basiswert, der physiologisch ist, aber aufgrund der fehlenden Spezifität der Methode nur einer Summe von möglicherweise in Urin vorkommender „freier“ Isomaltose, Maltose und nicht weiter bekannten interferierenden Substanzen zugeordnet werden kann.

Wird der gleiche Dextran-Kontrollurin enzymatisch hydrolysiert, so erhält man das in Abb. 22 B gezeigte Chromatogramm. Hier ergibt sich aus der Intensität des bei 14,99 min detektierten Signals des Ionenübergangs m/z 696 \rightarrow 169 der Gesamtwert an Isomaltose und Maltose (1,6- und 1,4-verknüpfte Glukose), der sich aus 2 Anteilen zusammensetzt. Ein Anteil an Isomaltose der durch die substratspezifische enzymatische Hydrolyse von Dextran durch das Enzym Dextranase freigesetzt wird und ein zusätzlicher unspezifischer Anteil, der als Basiswert ohne Hydrolyse vorliegt (s. oben).

Die Differenz entspricht der Menge an Isomaltose, die aus Dextran freigesetzt wird. Wie unter Kap. 3.2.2.3 beschrieben kann so der Dextrangehalt in den Proben ermittelt werden, indem die berechnete Konzentration des Signals mit der Retentionszeit für Isomaltose der nichthydrolysierten Probe (Abb. 22 A) von der entsprechend berechneten Konzentration der enzymatisch hydrolysierten Probe (Abb. 22 B) subtrahiert wird.

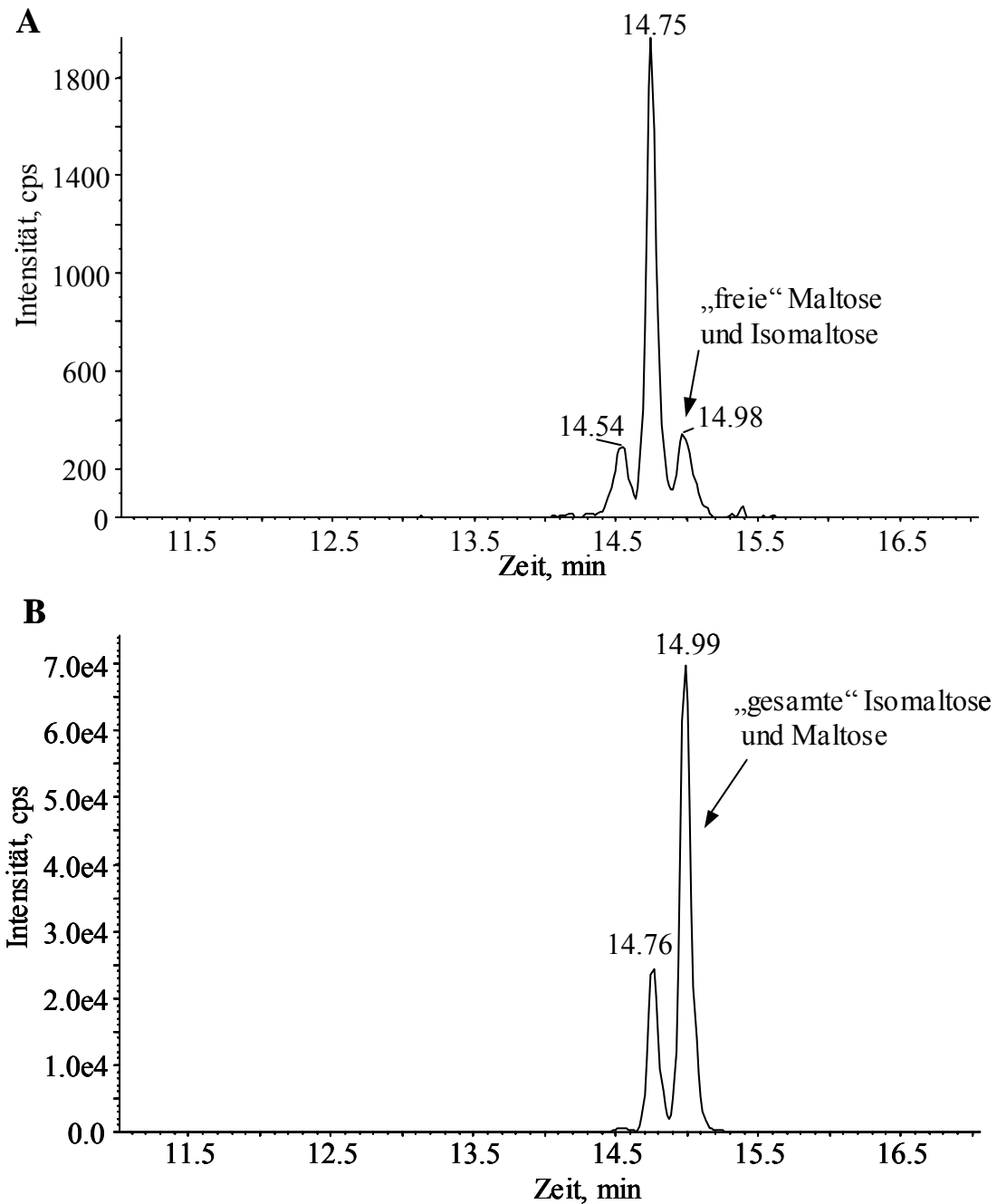


Abb. 22: Messprinzip für die Identifizierung von Dextran (Doppelbestimmung)

Chromatogramme eines Dextran-Kontrollurins (QC, $c_{\text{Dextran}} = 500 \mu\text{g/ml}$); Ionenübergang m/z 696 \rightarrow 169 der peracetylierten Isomaltose, bzw. Maltose

A: Chromatogramm des nicht enzymatisch hydrolysierten Dextran-Kontrollurins

B: Chromatogramm des enzymatisch hydrolysierten Dextran-Kontrollurins

4.1.4 Validierung

Die Validierung der Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Dextran in Humanurin wurde in Anlehnung an die Richtlinien der ICH (2005), der DIN 38402, Teil 51 (1986) und den Vorgaben des „*international standard for laboratories*“ der WADA (2005) durchgeführt. Dabei umfasste die Validierung die Parameter Arbeitsbereich, Spezifität, Präzision, Richtigkeit, Linearität, Verfahrensnachweisgrenze, Verfahrensbestimmungsgrenze, Wiederfindung und die Stabilität der Kalibrierlösung sowie die Stabilität von Dextran in Urin.

4.1.4.1 Arbeitsbereich

Für die Validierung der Methode wurde ein Arbeitsbereich von 12,5 bis 1250 µg/ml festgelegt. Die untere Grenze repräsentiert dabei das LLOQ der Methode. Mit diesem Arbeitsbereich können einerseits Isomaltosemengen in niedriger Konzentration, die durch die enzymatische Hydrolyse von physiologisch im Urin vorkommenden polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen freigesetzt werden, quantitativ bestimmt werden. Andererseits muss die Methode, um eine verbotene Anwendung des Plasmavolumenexpanders anzeigen zu können, eine genaue Bestimmung der Dextrangehalte, die im Bereich des später diskutierten Grenzwertes von 500 µg/ml (s. Kap. 4.1.7) liegen, ermöglichen.

4.1.4.2 Spezifität

Die Analyse von 10 verschiedenen Blankurinen zur Untersuchung der Spezifität machte deutlich, dass Signale für Laktose und Saccharose häufig in Urin detektiert werden.

Beide Disaccharide können chromatographisch von Isomaltose getrennt werden und stören die Bestimmung von Dextran nicht (Abb. 19). In Abb. 23 ist beispielhaft ein Chromatogramm eines untersuchten Blankurins dargestellt. Zur entsprechenden Retentionszeit für Isomaltose, bzw. Maltose (RT ≈ 15,1 min) wurde bei den untersuchten Blankurinen ein geringfügig erhöhter Untergrund festgestellt. Es konnten

jedoch in keinem der Blankurine signifikante Signale für Isomaltose, bzw. Maltose detektiert werden.

Bezüglich der Substratspezifität der Dextranase führt die Anwesenheit des Plasmavolumenexpanders HES in Urin wie erwartet zu keiner Störung der Dextranbestimmung, was die Untersuchung eines mit HES versetzten Urins ergab. Bei Amylose konnte eine ca. 10 prozentige Umsetzung beobachtet werden, die zu erhöhten Signalen für Isomaltose und Maltose führte.

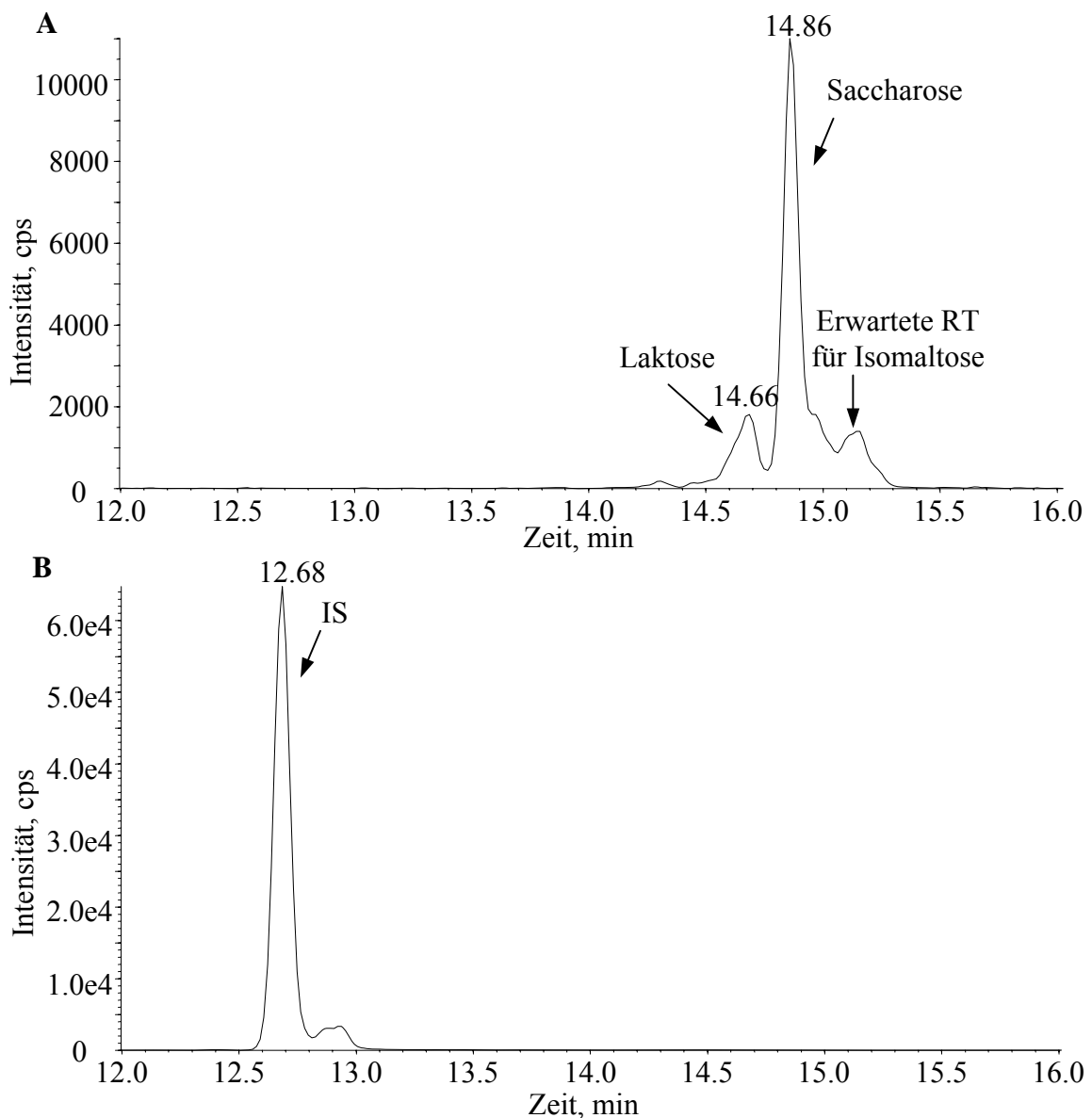


Abb. 23: Chromatogram eines untersuchten Blankurins zur Überprüfung der Spezifität. (A) Ionenübergang m/z 696 \rightarrow 169 der peracetylierten Disaccharide; (B) Ionenübergang m/z 414 \rightarrow 175 der peracetylierten $^{13}\text{C}_6$ -Glukose (IS).

4.1.4.3 Präzision

Die Präzision gibt den Grad der Streuung einzelner Werte um den Mittelwert an, die durch zufällige Fehler bestimmt werden (KROMIDAS 1999). Um die zufälligen Fehler der entwickelten Methode zu bestimmen, wurde die *intra-day* Präzision, welche die Probenabnahme, die Probenaufarbeitung, die Messung und die Auswertung berücksichtigt, bestimmt. Desweiteren wurde die *inter-day* Präzision ermittelt, die zusätzlich die Aufarbeitung an drei verschiedenen Tagen berücksichtigt. Als Maß für die Präzision dient der mit der Analyse der verschiedenen Messreihen erhaltene Variationskoeffizient (V_k , s. Anh. 6.1).

Tab. 9: Präzision der Methode

| Konz. [$\mu\text{g/ml}$] | V_k [%] <i>intra-day</i> (n=10) | V_k [%] <i>inter-day</i> (n=30) |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 53 | 5,3 | 6,2 |
| 527 | 6,0 | 7,3 |
| 1186 | 4,9 | 5,8 |

Die erhaltenen Messergebnisse wurden einem Ausreißertest nach Grubbs (P=99%) unterzogen (s. Anh. 6.1). Da keine Ausreißer ermittelt wurden, konnten alle Werte zur Ermittlung der Variationskoeffizienten herangezogen werden. Für die *intra-day* Präzision liegen die Variationskoeffizienten bei 5,3 %, 6,0 % und 4,9 % für die untere, mittlere und hohe Konzentrationsstufe von 53, 527 und 1186 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 9). Die mit der Bestimmung der *inter-day* Präzision erhaltenen Variationskoeffizienten betragen 6,2 %, 7,3 % und 5,8 % (Tab. 9).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Methode, auch bei fehlender Kontrolle der enzymatischen Hydrolyse durch den verwendeten IS, durch eine gute Präzision auszeichnet.

4.1.4.4 Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt die Übereinstimmung zwischen dem gemessenen Wert und einem als richtig geltenden Wert an. Das Maß der Übereinstimmung wird dabei durch systematische Fehler bestimmt (KROMIDAS 1999).

Die Richtigkeit der Methode wurde durch Soll-/Istwert Vergleich ermittelt. Dazu wurden Urine mit bekanntem Dextrangehalt (Sollwert, Konz.=375 µg/ml, 630 µg/ml, 877 µg/ml) wiederholt aufgearbeitet (n=10) und die Konzentration in den Proben über eine Kalibriergerade ermittelt (Istwert).

Tab. 10: Bestimmung der Richtigkeit

| Soll | [µg/ml] | [%] | [µg/ml] | [%] | [µg/ml] | [%] |
|-------------------------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|
| | 375,2 | 100,0 | 629,8 | 100,0 | 876,8 | 100,0 |
| Ist (n=10) | 383,7 | 102,3 | 671,3 | 106,6 | 965,5 | 110,1 |
| | 405,4 | 108,1 | 657,1 | 104,3 | 976,2 | 111,3 |
| | 400,9 | 106,8 | 667,3 | 106,0 | 932,8 | 106,4 |
| | 416,5 | 111,0 | 705,1 | 112,0 | 930,4 | 106,1 |
| | 411,2 | 109,6 | 704,4 | 111,9 | 984,4 | 112,3 |
| | 400,7 | 106,8 | 678,5 | 107,7 | 937,8 | 107,0 |
| | 363,6 | 96,9 | 672,3 | 106,8 | 921,5 | 105,1 |
| | 400,5 | 106,7 | 675,2 | 107,2 | 929,3 | 106,0 |
| | 398,9 | 106,3 | 660,9 | 105,0 | 971,5 | 110,8 |
| | 387,1 | 103,2 | 639,4 | 101,5 | 916,1 | 104,5 |
| mittlere Wiederfindung | 396,8 | 105,8 | 673,2 | 106,9 | 946,6 | 108,0 |
| V_k | 3,6% | | 2,8% | | 2,5% | |

Als Maß für die Richtigkeit dient die in Tab. 10 angegebene mittlere Wiederfindung. Diese liegt für die entsprechenden Dextrankonzentrationen mit einem V_k von 2,5 – 3,6 %, zwischen 105,8 % und 108,0 %.

4.1.4.5 Kalibrierfunktion

Zur Überprüfung der Linearität wurden Kalibrierfunktionen über verschiedene Konzentrationsbereiche innerhalb des Arbeitsbereichs von 12,5 µg/ml bis 1250 µg/ml ermittelt. Abb. 24 zeigt exemplarisch eine anhand von 10 Bestimmungen im Konzentrationsbereich von 50,8 µg/ml bis 1142,4 µg/ml resultierende Kalibrierfunktion.

Die rechnerische Überprüfung der Linearität erfolgte nach DIN 38402, Teil 51 (Anpassungstest nach Mandel, s. Anh. 6.1). Die Überprüfung nach Mandel ergab, dass eine Anpassung 1. Ordnung (linear, P=99%) erlaubt ist. Der Korrelationskoeffizient (R) der Linearen ($y=0,0061x-0,1098$) beträgt 0,998. Diese Ergebnisse konnten mit der wiederholten Bestimmung von Kalibrierfunktionen innerhalb des Arbeitsbereichs bestätigt werden.

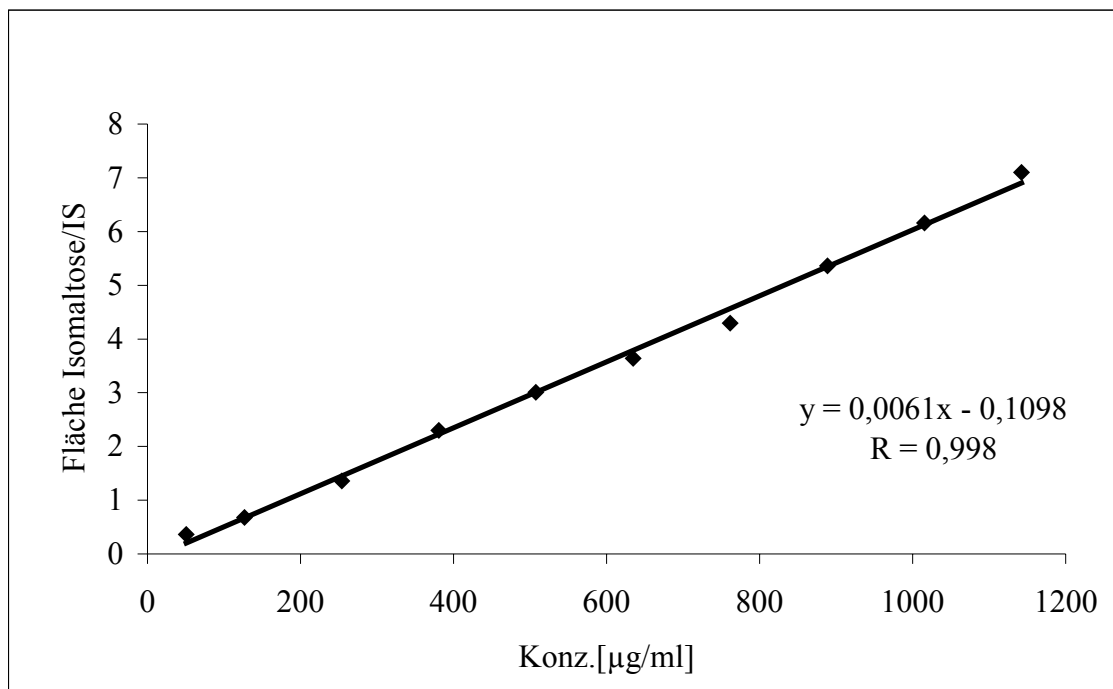


Abb. 24 : Dextran-Kalibrierfunktion im Konzentrationsbereich von 50,8 bis 1142,4 µg/ml

4.1.4.6 Verfahrensnachweis- und Verfahrensbestimmungsgrenze

Die Verfahrensnachweisgrenze (LLOD) bzw. Verfahrensbestimmungsgrenze (LLOQ) bezeichnet die kleinste Analytkonzentration, die mit der vorliegenden Methode gerade noch nachweisbar bzw. quantifizierbar ist (KROMIDAS 1999).

Das LLOD und LLOQ wurden über das Signal/Rausch-Verhältnis bestimmt, indem die gemessenen Signalintensitäten in wiederholt aufgearbeiteten Urinen ($c_{\text{Dextran}} = 5 \mu\text{g/ml}$, $n=10$) mit denen von entsprechenden Blankurinen verglichen wurden. Dabei wurde ein Signal/Rausch-Verhältnis für das LLOD von 3:1 und für das LLOQ von 10:1 vorausgesetzt (ICH 2005). Das LLOD der Methode zur Bestimmung von Dextran beträgt demnach $3,9 \mu\text{g/ml}$ und das LLOQ $12,5 \mu\text{g/ml}$.

4.1.4.7 Wiederfindung

Wie unter Kap. 3.2.3.7 beschrieben, wurden für die Bestimmung der Wiederfindung der Methode 10 Aliquote eines mit Dextran dotierten Blankurins ($c_{\text{Dextran}} = 100 \mu\text{g/ml}$) und 10 Aliquote eines Blankurins, denen anstelle von Dextran vor dem Anlösen äquivalente Mengen peracetylierter Isomaltose zugegeben wurde, aufgearbeitet. Die Wiederfindung wurde durch Vergleich der Verhältnisse der Signalintensitäten von Analyt und IS in den verschiedenen Messreihen berechnet. Dabei ergab sich für Dextran eine mittlere Wiederfindung von 10,5 %.

Ein Grund für die geringe Wiederfindung der Methode liegt in einer geringen Ausbeute des peracetylierten Produktes bei der Derivatisierung. Diese Annahme wird durch die mittels LC-MS *full-scan* Analyse verschiedener Dextrankalibrierstandards erhaltenen Ergebnisse unterstützt, die die Anwesenheit von penta-, hexa- und hepta-acetylierter Isomaltose anzeigten. Die Ausbeute der peracetylierten Isomaltose konnte jedoch durch eine Veränderung der Derivatisierungsbedingungen wie Temperatur und Zeit nicht erhöht werden.

Für den Nachweis von Dextran wirkt sich die geringe Wiederfindung jedoch nicht nachteilig aus, da sich die Methode zum Einen durch eine hohe Empfindlichkeit auszeichnet und zum Anderen die zu erwartenden Dextrankonzentrationen nach einer verbotenen Applikation im unteren mg/ml-Bereich angesiedelt sind.

4.1.4.8 Stabilität

Stabilität der Kalibrierlösung

Um bei der quantitativen Bestimmung von Dextran Referenzsubstanz und Zeit einzusparen, sollen die Kalibrierlösungen längere Zeit verwendet werden. Um zu überprüfen, ob eine Lagerung möglich ist, wurden daher Aliquote einer Dextran-Stammlösung ($c_{\text{Dextran}}=111,9 \mu\text{g/ml}$) und einer Dextran-Arbeitslösung ($c_{\text{Dextran}}=11,2 \mu\text{g/ml}$) unterschiedlich lange bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und anschließend analysiert. Die Stabilität wurde überprüft, indem die aus den Peakflächenverhältnissen des Analyt und des IS erhaltenen Quotienten der gelagerten Aliquote mit denen entsprechender Aliquote frisch hergestellter Stamm- und Arbeitslösungen verglichen wurden (vgl. Kap. 3.2.3.8).

Für die Dextran-Stammlösung konnte bei einer Lagerungstemperatur von $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ eine Stabilität von 14 Tagen gezeigt werden. Die Dextrankonzentration der Arbeitslösung hingegen nahm bereits ab dem 3. Tag der Lagerung ab, so dass diese für alle Bestimmungen stets frisch aus der Stammlösung angesetzt werden.

Stabilität in Urin

Die Stabilität von Substanzen im Urin hängt von den Lagerungsbedingungen (z. B. Temperatur, Zeit), den chemischen Eigenschaften der Substanz, der urinären Matrix und von dem Material des Probengefäßes ab. Um den Einfluss verschiedener urinärer Matrices auf die Stabilität von Dextran zu berücksichtigen, wurden 5 verschiedene Blankurine zu einem Mischurin vereinigt. Aus diesem Mischurin wurden durch Zudotieren von Dextran Urine mit einer niedrigen ($255,7 \mu\text{g/ml}$), mittleren ($517,0 \mu\text{g/ml}$) und hohen Konzentration ($978,5 \mu\text{g/ml}$) hergestellt.

Da die vorgeschriebene Lagerungstemperatur von Dopingkontrollproben während der ersten Tage $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ und im Folgenden $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ beträgt und die Kühlkette hinsichtlich der Lagerungsbedingungen bei der Probenvorbereitung mehrfach unterbrochen wird, werden die Proben auch für eine gewisse Zeit der Raumtemperatur (RT) ausgesetzt. Daher wurden Aliquote der verschieden konzentrierten Urine in Schliffreagenzgläsern bei RT, $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ über verschiedene Zeiträume gelagert und anschließend analysiert. Über eine Kalibrierfunktion wurde die Dextrankonzentration in den Proben bestimmt und mit der theoretischen Soll-Konzentration verglichen.

Für alle 3 Konzentrationsstufen des Urins konnte die Stabilität von Dextran bei einer Lagerungstemperatur von -20 °C über einen Zeitraum von 90 Tagen und bei einer Lagerungstemperatur von $+4\text{ °C}$ von 30 Tagen gezeigt werden. Bei RT hingegen zeigte sich bereits nach dem dritten Tag der Lagerung ein Abbau von Dextran. Ein Abbau zu Isomaltose fand dabei nicht statt, was die Analyse der nicht enzymatisch hydrolysierten Proben zeigte. Die Ursachen für den schnellen Abbau von Dextran bei RT konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Mit der Überprüfung der Stabilität konnte gezeigt werden, dass unter den vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen für Dopingkontrollproben kein Abbau von Dextran zu erwarten ist. Die eingeschränkte Stabilität bei RT ist für die Bestimmung von Dextran als unproblematisch anzusehen, da die Urinproben zum Aliquotieren nur für wenige Minuten bei RT lagern.

4.1.5 Bestimmung der Basalwerte von polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen in Humanurin

Wie unter Kap. 4.1 beschrieben, wurde durch Analyse von ca. 150 Urinproben deutlich, dass geringe physiologische Gehalte an polymer 1,6-verknüpften, dem Dextran analogen Glukosestrukturen in Urin vorkommen können. Die Bestimmung dieser basalen Konzentrationen in Humanurin ist notwendig, um durch den Vergleich mit erhöhten Gehalten, die nach einer intravenösen Anwendung von Dextran in Urin auftreten, ein Dopingvergehen zweifelsfrei aufdecken zu können.

Als Probengut dienten insgesamt 488 Humanurinproben von Spitzenathleten, die im Rahmen des Dopingkontrollprogramms der WADA in verschiedenen Sportarten entnommen wurden. In allen Urinen wurde nach enzymatischer Hydrolyse der Gesamtgehalt an Isomaltose und Maltose (1,6- und 1,4-verknüpfte Glukose) bestimmt (vgl. Kap. 4.1.3).

Die quantitative Bestimmung der Basalwerte an polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen erfolgte in 238 der 488 Urinproben, die dazu zusätzlich ohne enzymatische Hydrolyse aufgearbeitet wurden (vgl. Kap. 4.1.3).

Die Bestimmung der Isomaltose- und Maltosemenge in den Proben erfolgte wie unter Kap. 3.2.4.1 beschrieben über eine externe Kalibriergerade.

In Abb. 25 ist die Verteilung der ermittelten Gesamtgehalte an Isomaltose und Maltose (1,6- und 1,4-verknüpfter Glukose) in 488 untersuchten Urinproben dargestellt, die mit der Bestimmung der enzymatisch hydrolysierten Probe erhalten wurden.

In 320 (66 %) Proben konnten weder „frei“ vorliegende Isomaltose, bzw. Maltose noch polymer 1,6-verknüpfte Glukosestrukturen identifiziert werden. Weitere 112 (23 %) Urine wiesen Gesamtkonzentrationen unterhalb des LLOQ auf. Lediglich in 56 (11 %) untersuchten Urinen konnten die Gesamtgehalte an Isomaltose und Maltose mit Werten zwischen 12,5 µg/ml und 219 µg/ml quantitativ bestimmt werden.

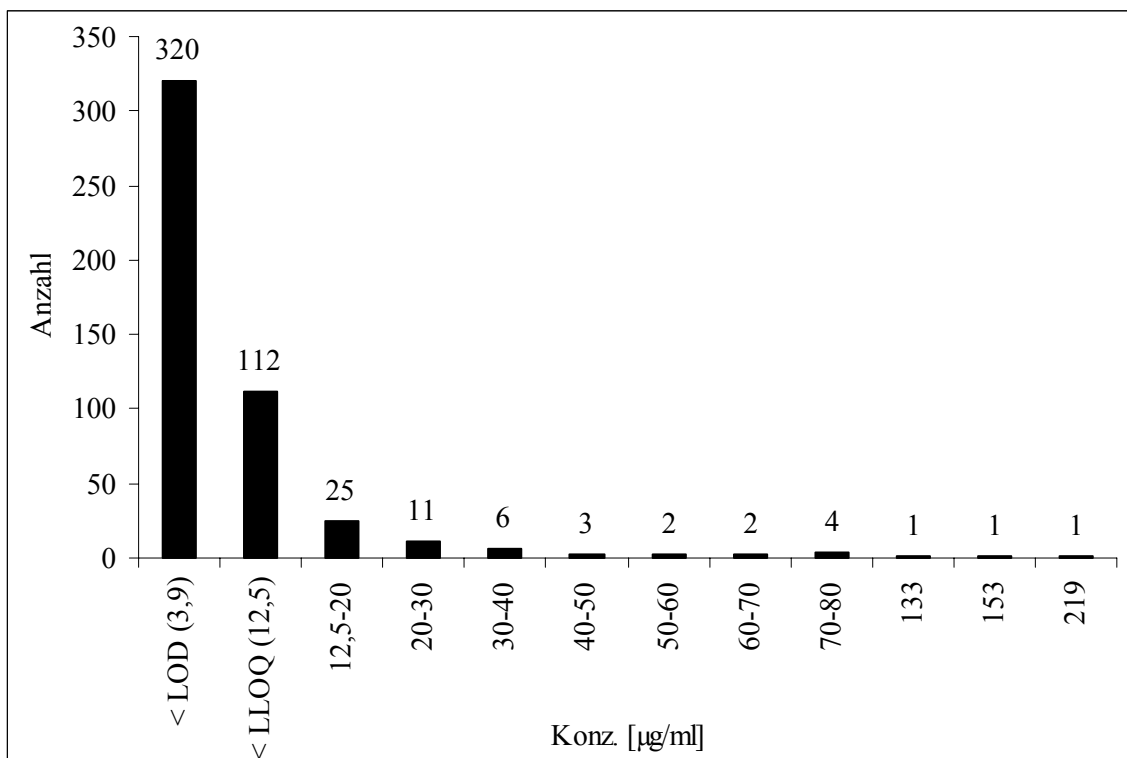


Abb. 25: Verteilung der Gesamtkonzentrationen an Isomaltose und Maltose (1,6- und 1,4-verknüpfte Glukose) in 488 Urinproben

In Abb. 26 ist die Verteilung der ermittelten Konzentrationen an polymer 1,6-verknüpften, dem Dextran analogen Glukosestrukturen in 238 der 488 untersuchten Urinen dargestellt. In 209 Proben (87,8 %) konnten keine polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen nachgewiesen werden und in weiteren 19 Urinen (8,0 %) lag der Gehalt unter dem LLOQ von 12,5 µg/ml. Lediglich in 10 Proben (4,2 %) konnten Gehalte zwischen 13,7 µg/ml und 68,3 µg/ml bestimmt werden, die im Einzelnen in Tab. 11 aufgeführt sind.

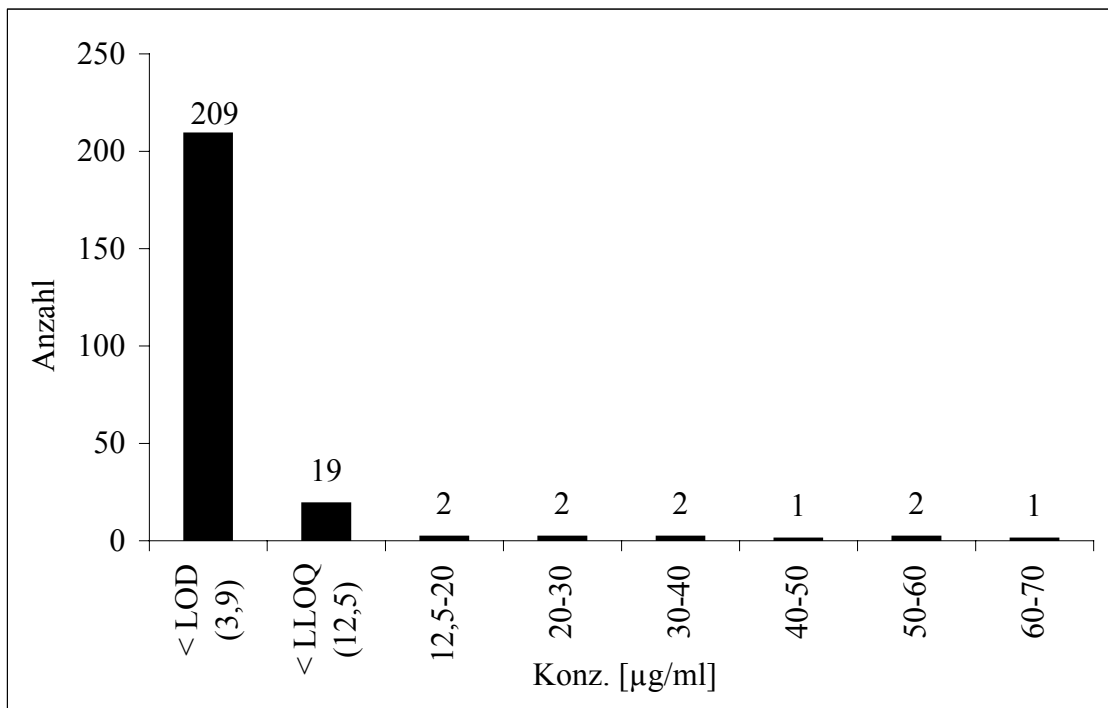


Abb. 26: Bestimmung der Basalwerte von polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen in 238 untersuchten Urinen

Die Ermittlung der Basalwerte von polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen macht deutlich, dass diese nur in sehr geringem Maße mit dem Urin ausgeschieden werden. In über 95 % der untersuchten Proben konnten keine polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen bestimmt werden. Selbst die gefundenen Gesamtgehalte an Isomaltose und Maltose (1,6- und 1,4-verknüpfte Glukose) lagen in 89 % der untersuchten Proben unter dem LLOQ von 12,5 µg/ml.

Tab. 11: Bestimmung der Basalwerte von polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen: Konzentration an polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen und Gesamtkonzentration an Isomaltose und Maltose (1,6- u. 1,4-verknüpfte Glukose) in 10 (> LLOQ) der 238 untersuchten Urinproben

| Sportart | Konzentration an polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen [$\mu\text{g/ml}$] | Gesamtkonzentration an Isomaltose und Maltose [$\mu\text{g/ml}$] |
|----------------|---|--|
| Radfahren | 68,3 | 164,1 |
| Fußball | 54,5 | 219,3 |
| Radfahren | 50,5 | 132,7 |
| Radfahren | 47,5 | 47,5 |
| Fußball | 31,7 | 31,7 |
| Radfahren | 30,7 | 30,7 |
| Radfahren | 25,3 | 52,4 |
| Eisschnelllauf | 22,6 | 35,1 |
| Radfahren | 13,7 | 153,2 |
| Radfahren | 12,5 | 12,5 |

Mögliche physiologische Quellen für die gefundenen geringen Gehalte an oligo- und polymer 1,6-verknüpfter Glukose könnten verschiedene in Urin vorkommende Oligosaccharide bilden. So konnten KUMLIEN et al. (1988) unter verschiedenen pathologischen Zuständen, wie Störungen des Glykolipid-, Glykoprotein- oder des Glykogenmetabolismus, aber auch unter physiologischen Bedingungen, die Anwesenheit eines aus α -1,4- und α -1,6-verknüpfter Glukose bestehenden Tetrasaccharids in Urin nachweisen, dessen Ausscheidung nach Mahlzeiten, vor allem nach kohlenhydratreicher Diät und nach intensiver körperlicher Belastung erhöht sein soll. KLEIN et al. (1998) konnten sogar aus α -1,4- und α -1,6-verknüpfter Glukose bestehende Oligosaccharide mit bis zu 10 Glukoseeinheiten identifizieren, die jedoch nur in sehr geringer Konzentration in Urin vorliegen. Eine weitere Quelle könnten durch Deglykosylierung von Glykoproteinen freigesetzte Oligosaccharide, die α -1,6-glykosidisch gebundene Glukose enthalten, darstellen (DURAND und SETA 2000).

4.1.6 Bestimmung der urinären Dextrankonzentration nach intravenöser Applikation von Dextran

Um zu erwartende urinäre Dextrankonzentrationen nach einer Applikation des Plasmavolumenexpanders abschätzen zu können, wurden 7 Ausscheidungsurine von Patienten untersucht, die im Rahmen einer klinischen Therapie Dextran intravenös verabreicht bekamen. In Tab. 12 sind die ermittelten Dextrankonzentrationen und die Gesamtkonzentration an Isomaltose und Maltose (1,6- und 1,4-verknüpfte Glukose) dargestellt.

Tab. 12: Ermittelte Dextrankonzentrationen und Gesamtkonzentrationen an Isomaltose und Maltose (1,6- u. 1,4- verknüpfte Glukose) in 7 Ausscheidungsurinen nach intravenöser Applikation von Dextran.

| | Dextrankonzentration [mg/ml] | Gesamtkonzentration an Isomaltose und Maltose [mg/ml] |
|-----------|---------------------------------|---|
| Patient 1 | 17,9 | 18,4 |
| Patient 2 | 9,6 | 10,0 |
| Patient 3 | 7,2 | 7,3 |
| Patient 4 | 5,6 | 5,8 |
| Patient 5 | 9,2 | 9,6 |
| Patient 6 | 14,7 | 15,0 |
| Patient 7 | 18,7 | 18,9 |

Die ermittelten Dextrankonzentrationen in den untersuchten Ausscheidungsurinen reichen von 5,6 mg/ml bis 18,7 mg/ml. Auffällig ist, dass die Gehalte der „freien“ Disaccharide Isomaltose und Maltose im Vergleich zu den bei der Basalwertbestimmung (vgl. Tab. 11) ermittelten Gehalten mit Werten von 0,1 mg/ml bis 0,5 mg/ml erhöht sind. Unter Berücksichtigung der zuvor untersuchten urinären Stabilität von Dextran, bei der kein Abbau zu Isomaltose festgestellt werden konnte, kann ein geringer Abbau des Polymers zu Isomaltose im Körper des Menschen nicht

ausgeschlossen werden (vgl. Kap. 2.2.4). In Abb. 27 und 28 sind exemplarisch die, mit der Analyse eines untersuchten Ausscheidungsurins (Patient 3) erhaltenen Chromatogramme dargestellt.

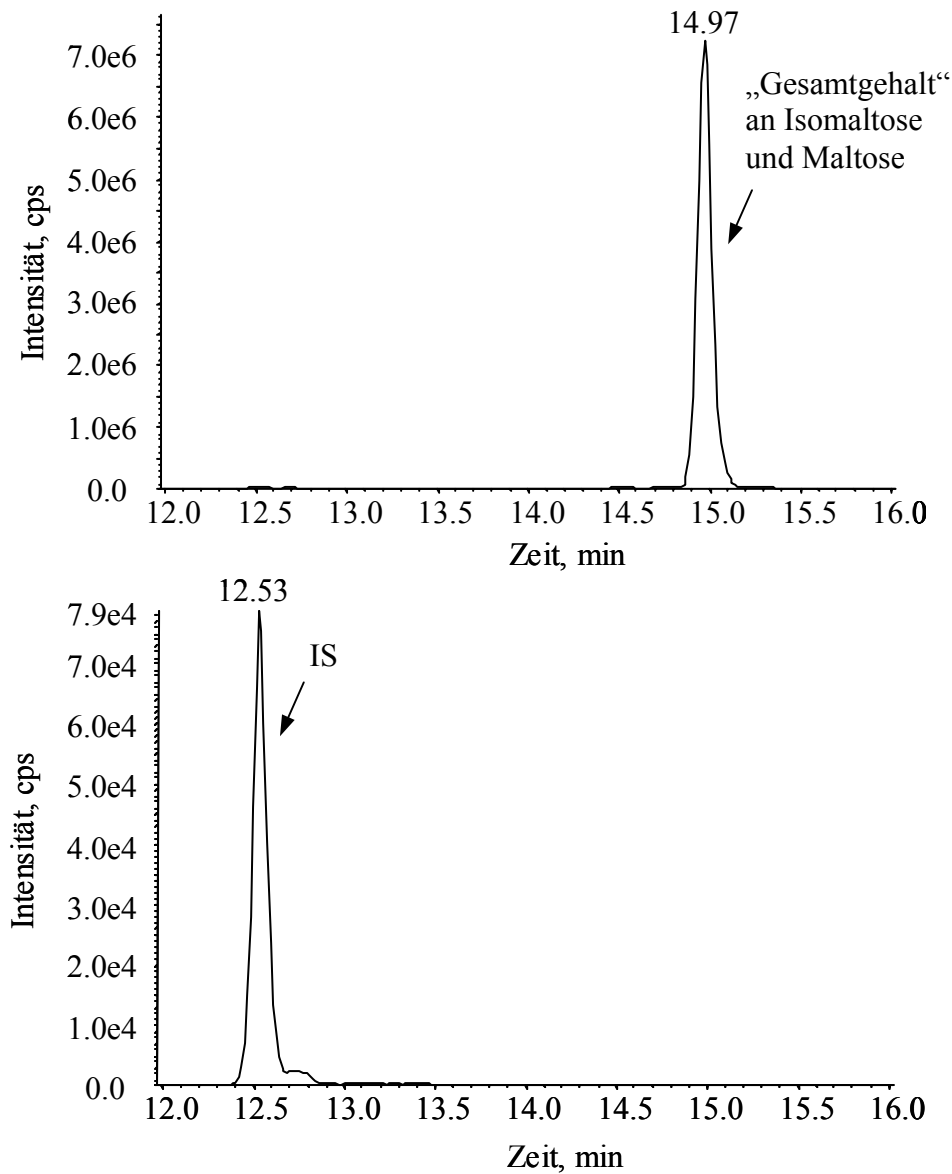


Abb. 27: Chromatogramm des enzymatisch hydrolysierten Ausscheidungsurins (Patient 3). Gesamtgehalt an Isomaltose und Maltose (1,6- u. 1,4- verknüpfte Glukose); Ionenübergänge m/z 696 \rightarrow 169 der peracetylierten Isomaltose, bzw. Maltose (oben) und m/z 414 \rightarrow 175 der peracetylierten $^{13}\text{C}_6$ -Glukose (IS, unten).

Das in Abb. 27 gezeigte Chromatogramm repräsentiert die enzymatisch hydrolysierte Probe, aus der sich der Gesamtgehalt an Isomaltose und Maltose (1,6- u. 1,4-verknüpfte

Glukose) ergibt. Abb. 28 zeigt das Chromatogramm der nicht enzymatisch hydrolysierten Probe, aus der sich der Gehalt an „freier“ Isomaltose und Maltose ergibt. Aus der Differenz des Gesamtgehaltes (Abb. 27) und dem Gehalt an „freier“ Isomaltose und Maltose (Abb. 28) wurde eine Dextrankonzentration von 7,2 mg/ml in der Probe berechnet.

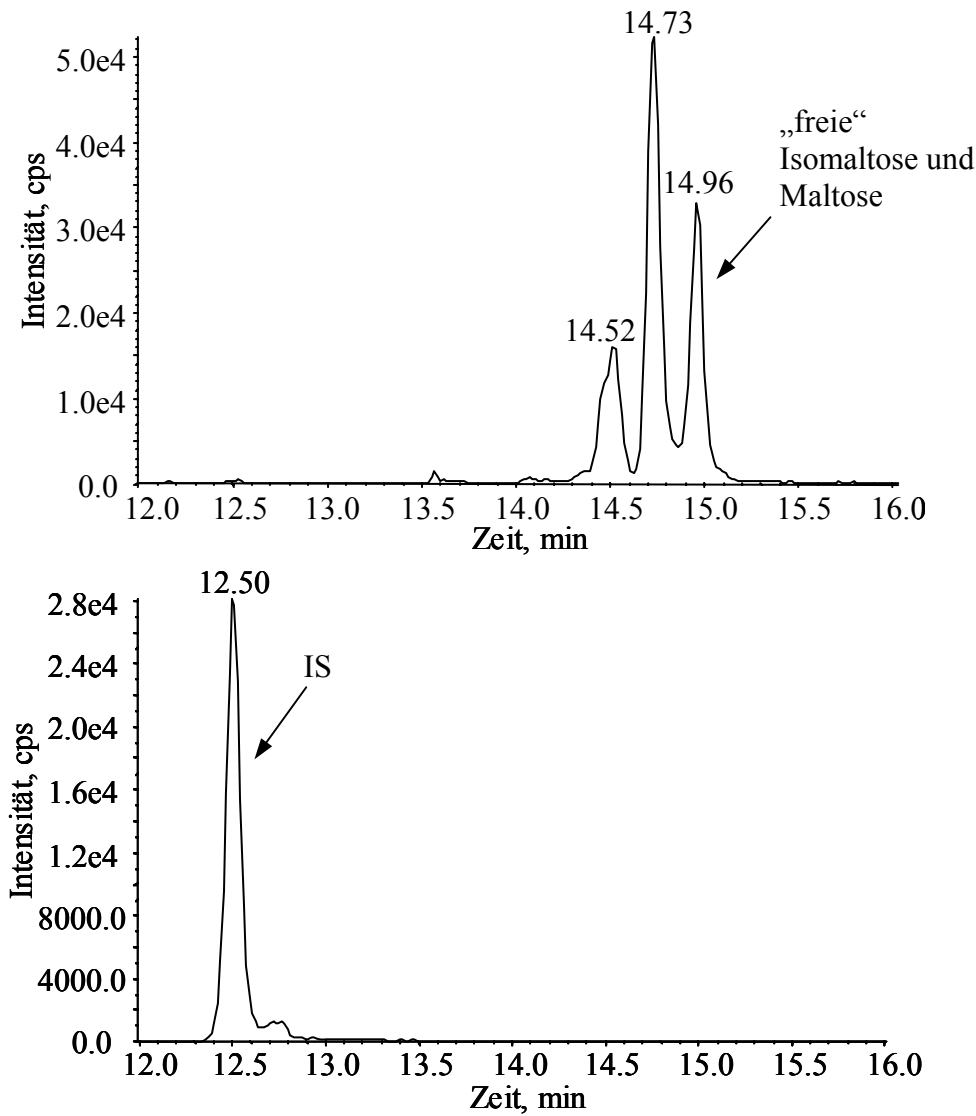


Abb. 28: Chromatogramm des nicht enzymatisch hydrolysierten Ausscheidungsurins (Patient 3). Gehalt an „freier“ Isomaltose und Maltose; Ionenübergänge m/z 696→169 der peracetylierten Isomaltose, bzw. Maltose (oben) und m/z 414→175 der peracetylierten $^{13}\text{C}_6$ -Glukose (IS, unten).

Die erhaltenen Ergebnisse stimmen gut mit den in der Literatur diskutierten Daten bezüglich der Ausscheidung von Dextran überein. Die Patienten bekamen 500 ml einer Dextran 70 Lösung (Longasteril[®], Fresenius) über einen Zeitraum von ca. 30 min infundiert, was einer absoluten Menge von 30 g Dextran entspricht. Laut Literaturangaben werden 50 % der intravenös verabreichten Menge innerhalb von 24 h mit dem Urin ausgeschieden (MARTINDALE 1996). Näherungsweise ergibt sich daraus für die untersuchten mittels Katheter gesammelten Urine, unter Berücksichtigung eines üblichen Urinvolumens von ca. 1,5 bis 2 l/Tag, eine theoretische Dextranskonzentration zwischen 7,5 und 10 mg/ml.

4.1.7 Grenzwert

Der beabsichtigte Effekt einer ausreichend großen Expansion des Plasmavolumens zum Zeitpunkt der Dopingkontrolle ist aufgrund der Halbwertszeit des Dextrans (MARTINDALE 1996) auf ca. 12 Stunden limitiert. Wie bereits in Kap. 2.2.3 besprochen beträgt z. B. die effektive Wirkdauer einer Dextran 60 Applikation sogar nur 5-6 h. Um eine effektive Absenkung der Hämatokrit- und Hämoglobinkonzentration auf ein physiologisches Niveau zu gewährleisten ist daher davon auszugehen, dass die verabreichte Menge an Dextran im Fall eines Dopingvergehens mit der applizierten Dosis bei einer klinischen Anwendung vergleichbar ist. Auch wenn die untersuchten Urine der Patienten nicht den Urin von Athleten repräsentieren, sind bei einer verbotenen intravenösen Applikation des Plasmavolumenexpanders vergleichbare Konzentrationen an Dextran im Bereich einiger Milligramm/ml Urin zu erwarten.

Die mit der Untersuchung der Basalwerte von polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass selbst die höchsten gefundenen Gehalte (Tab. 11) noch um den Faktor 100 bis 300 niedriger liegen als die Dextranskonzentrationen, die in den Ausscheidungsurinen der Patienten ermittelt wurden (Tab. 12).

Um eine intravenöse Dextranapplikation eindeutig nachzuweisen, wurde auf der Basis der durchgeführten Untersuchungen ein Grenzwert von 500 µg Dextran pro Milliliter Urin vorgeschlagen. Generell ist davon auszugehen, dass eine Erzeugung falsch positiver Ergebnisse durch eine Ernährung mit einem hohen Anteil an Kohlenhydraten, die 1,6-glykosidisch gebundene Glukose enthalten, wie Stärke, Glykogen oder Dextran

aufgrund der allgemeinen Stoffwechselwege von Kohlenhydraten, die nur die intestinale Aufnahme von Monosacchariden erlauben, auszuschließen ist (LÖFFLER und PETRIDES 1987). Der auf Grundlage dieser Arbeit vorgeschlagene Grenzwert wurde von der medizinischen Kommission der WADA akzeptiert und ist von Januar 2005 an allen WADA akkreditierten Laboratorien für Dopinganalytik als Kriterium für einen Dopingverstoß empfohlen worden.

4.1.8 Referenzmethodik zum *Screening* und zur Bestätigung von Dextran

Die Überprüfung des empfohlenen Grenzwertes bei der Untersuchung von Dopingkontrollproben erfolgt nach der auf Grundlage dieser Arbeit entwickelten Methodik, die von der WADA allen akkreditierten Laboratorien für Dopinganalytik weltweit zum *Screening* und zur Bestätigung von Dextran vorgeschlagen wurde.

Screening (GC/MS)

Als *Screening*-Prozedur dient die Methode zum Nachweis des Plasmavolumenexpanders HES (s. Kap. 2.2.6.2). Diese Methode erlaubt eine semi-quantitative Abschätzung der Glukosemenge, die aus der salzsauren Hydrolyse des Dextrans resultiert. Dabei wird die Einhaltung des Grenzwertes anhand einer *quality control* (QC) Urinprobe, der Dextran in einer Konzentration von 500 µg/ml zugesetzt wurde, überprüft. Dopingkontrollproben, deren Glukosegehalt den des QC übersteigt, gelten als verdächtig bezüglich der Anwesenheit von Dextran.

Identifizierung

Die erhöhten Glukosegehalte, die nach salzsaurer Hydrolyse in der *Screening*-Prozedur bestimmt werden, können jedoch auch durch die Anwesenheit anderer häufig in Urin vorkommender Disaccharide wie Saccharose oder Laktose verursacht werden. Um eventuell vorliegende Disaccharide zu identifizieren, werden daher die verdächtigen Proben in einer zweiten Prozedur nach der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode mittels LC-MS/MS untersucht. Der Gehalt an Isomaltose, bzw. Maltose in den Proben wird wiederum durch Vergleich mit einem QC ($c_{\text{Dextran}}=500 \mu\text{g/ml}$) abgeschätzt (Abb. 29). Um bei diesem zweiten Screening Zeit einzusparen, werden die Proben im Gegensatz zu dem unter Kap. 4.1.3 erläuterten Messprinzip jedoch nur einmal mit

enzymatischer Hydrolyse aufgearbeitet (Gesamtgehalt an Isomaltose und Maltose). In Abb. 30 ist das Chromatogramm einer Probe dargestellt, bei der im ersten Screening Glukosegehalte über 500 µg/ml ermittelt wurden. Es wird deutlich, dass diese Glukosegehalte nicht durch die Hydrolyse von Dextran, sondern durch die von Saccharose entstanden sind. Von Januar bis August 2005 ergab die Untersuchung von 35 Proben, bei denen im ersten Screening Glukosegehalte von mehr als 500 µg/ml ermittelt wurden, dass diese ausschließlich auf erhöhte Mengen an Laktose und Saccharose zurückzuführen waren.

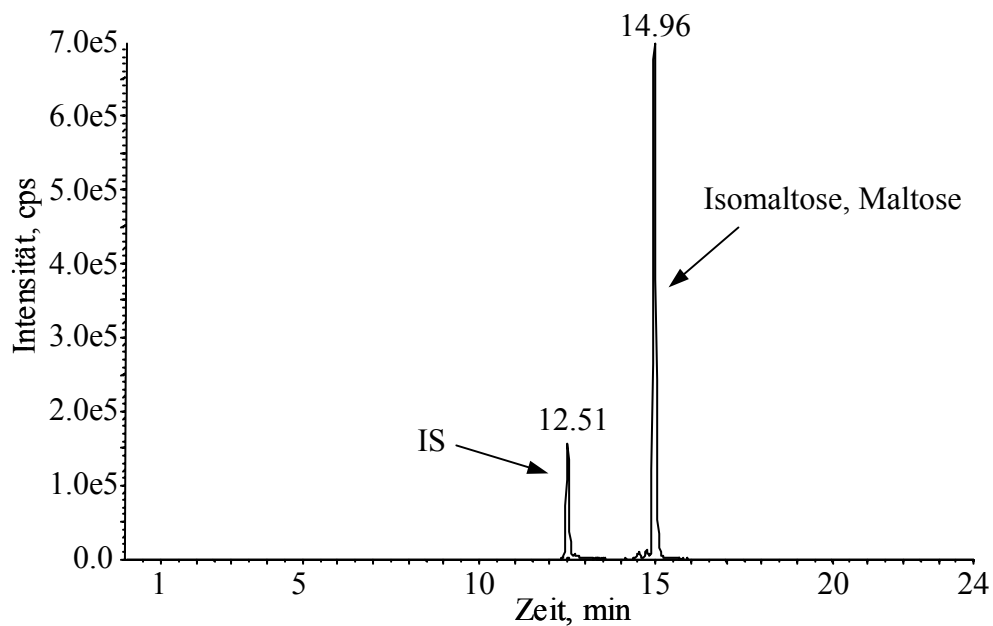


Abb. 29: Chromatogramm eines *quality control* Urins ($c_{\text{Dextran}}=500 \mu\text{g/ml}$); Ionenübergänge m/z 696→169 der peracetylierten Isomaltose bzw. Maltose und m/z 414→175 der peracetylierten $^{13}\text{C}_6$ -Glukose (IS).

Bestätigung und Quantifizierung

Wird in einer Probe bei der zuvor beschriebenen Identifizierungsprozedur eine Isomaltose-, bzw. Maltosekonzentration von mehr als 500 µg/ml ermittelt, so erfolgt die quantitative Bestimmung des Dextrangehalts wie unter Kap. 4.1.3 beschrieben. Bei einer ermittelten Dextrankonzentration von mehr als 500 µg/ml wird die Probe bezüglich einer Dextranapplikation als „positiv“ berichtet.

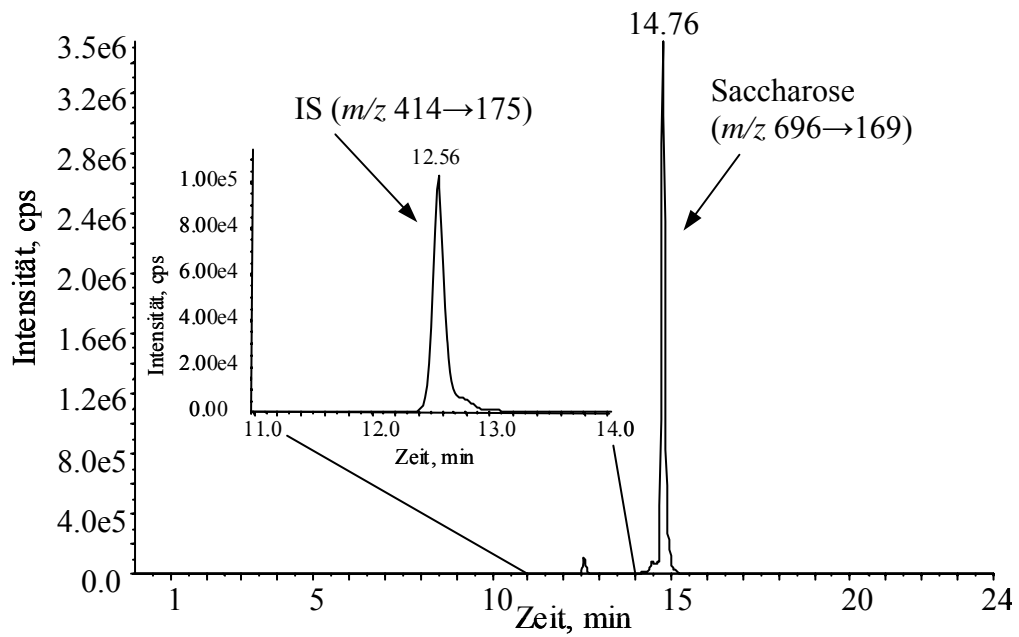


Abb. 30: Chromatogramm einer verdächtigen Probe; Ionenübergänge m/z 696→169 der peracetylierten Isomaltose bzw. Maltose und m/z 414→175 der peracetylierten $^{13}\text{C}_6$ -Glukose (IS).

4.2 Mannitol

Wie im Fall von Dextran erfüllt lediglich die intravenöse Applikation von Mannitol den Tatbestand eines Dopingvergehens (WADA 2005). Aufgrund des allgemeinen Stoffwechsels von Mannitol, der keine Metabolisierung des Zuckeralkohols vorsieht, kann eine orale Zufuhr, z. B. durch den Verzehr von mannitolhaltigen Früchten, Fruchtsäften oder Lebensmitteln, denen Mannitol als Zusatzstoff zugegeben wurde, zu erhöhten Konzentrationen im Urin führen. Ziel dieser Arbeit war es daher, neben der Entwicklung einer geeigneten Methodik zur Bestimmung von Mannitol in Humanurin, Kenntnisse über den Einfluss von oral zugeführtem Mannitol auf die resultierende urinäre Mannitol-Konzentration zu gewinnen. Um dies zu erreichen, wurde eine Ausscheidungsstudie durchgeführt, bei der Probanden D-Mannitol oral verabreicht wurde. Für den Nachweis eines Dopingvergehens ist die Unterscheidung zwischen der urinären Mannitol-Konzentration, die nach Verzehr mannitolhaltiger Lebensmittel oder nach intravenöser Applikation auftritt, essentiell. Für die durchgeführten Studien wurden ausschließlich die D-Formen des Mannitols und Sorbitols verwendet, da nur diese medizinisch Anwendung finden.

4.2.1 Identifizierung und quantitative Bestimmung von Mannitol mittels GC/MS

Die Bestimmung von Hexitolen mittels GC/MS wird in der Literatur mit verschiedenen Derivatisierungstechniken beschrieben, die eine gaschromatographische Trennung verschiedener Hexitole ermöglichen (vgl. Kap. 2.3.4). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in der Dopinganalytik weit verbreiteten Derivatisierungstechniken der Trimethylsilylierung und Acetylierung (PETIT et al. 1980, THEVIS 2000b) angewendet. Dabei zeigte sich, dass die chromatographische Trennung der massenspektrometrisch nicht zu unterscheidenden isomeren Hexitole meso-Allitol, meso-Dulcitol, D-Altritol, D-Iditol, D-Sorbitol und D-Mannitol nach Überführung in ihre Peracetate deutlich verbessert war. Die Acetylierung gelingt dabei wie im Fall von Dextran mit Essigsäureanhydrid, Acetonitril und Pyridin. Die Analyten wurden einzeln in urinärer Matrix auf einer Kapillarsäule (HP-5MS) (Agilent, Waldbronn) durch Retentionszeitvergleich gegenüber $^{13}\text{C}_1$ -markiertem D-Mannitol identifiziert. Zusätzlich

wurden zu einer fertigen Messlösung eines peracetylierten Mischstandards aller Hexitole die jeweiligen peracetylierten Einzelsubstanzen nacheinander zugegeben, um den entsprechenden Analyt durch den resultierenden Signalanstieg zu identifizieren. In Abb. 31 ist das *single ion* Chromatogramm (SIM, m/z 289) eines Mischstandards der verschiedenen peracetylierten Analyten dargestellt. Die Hexitole meso-Allitol (RT=5,95 min), D-Altritol (RT=6,12 min), D-Mannitol (RT=6,21 min) und D-Sorbitol (RT=6,27 min) sind deutlich voneinander getrennt. Bei meso-Dulcitol (RT=6,34 min) und D-Iditol (RT=6,38 min) konnte unter diesen Bedingungen eine Antrennung erreicht werden. Die anhand des Signal/Rausch-Verhältnisses ermittelte Nachweisgrenze des Verfahrens beträgt für D-Mannitol ca. 10 $\mu\text{g/ml}$.

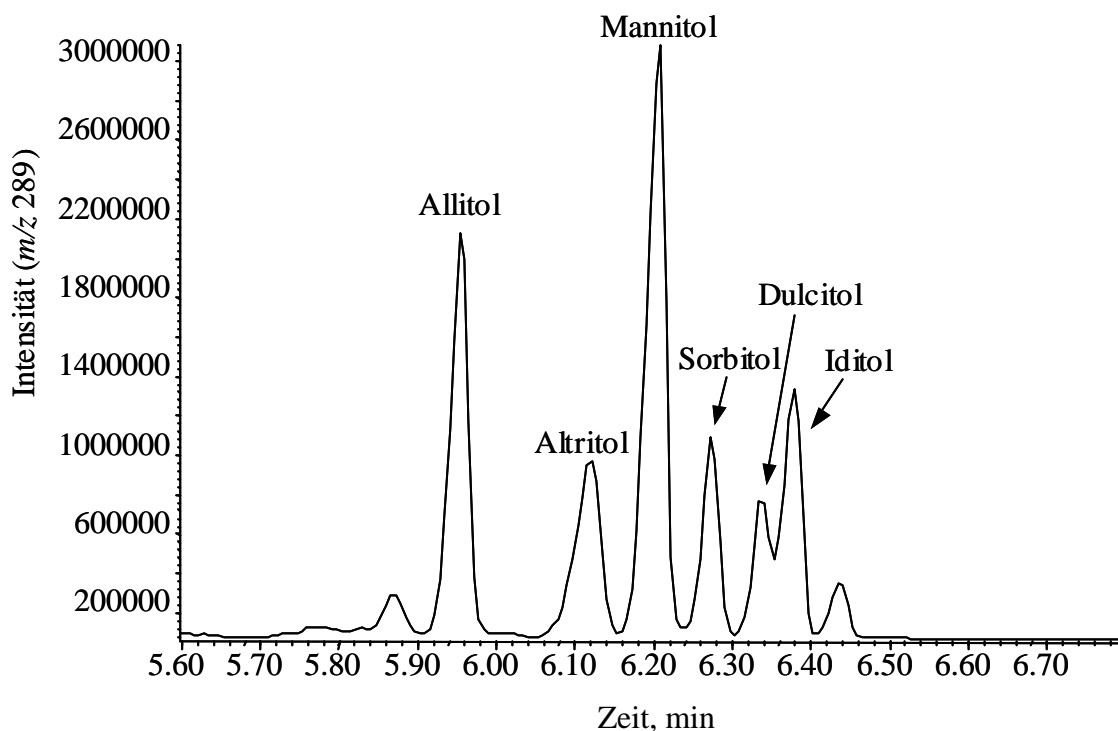


Abb. 31: *Single ion* Chromatogramm (SIM, m/z 289) eines Mischstandards der peracetylierten Zuckeralkohole meso-Allitol, D-Altritol, meso-Dulcitol, D-Iditol, D-Sorbitol und D-Mannitol (Konzentration je 500 $\mu\text{g/ml}$) in Urin.

Ein zusätzliches Identifizierungskriterium für die Anwesenheit eines Hexitols liefert das Massenspektrum, das jedoch erwartungsgemäß keine Unterscheidung der einzelnen Analyten zulässt. Das mittels EI erzeugte Massenspektrum von D-Mannitol ist in Abb. 32 dargestellt. Die Fragmentationen m/z 361 und m/z 73 entstehen wahrscheinlich durch

den Bindungsbruch der Kohlenstoffkette zwischen C-1 und C-2 bzw. C-5 und C-6. Nach Bruch der Bindung zwischen C-2 und C-3, bzw. C-4 und C-5 werden die Fragmente bei m/z 289 und m/z 145 generiert. Der Bruch zwischen C-3 und C-4 führt schließlich zu Fragment m/z 217. Weitere Fragmentierungsschritte bestehen wahrscheinlich in einer aufeinanderfolgenden Abspaltung von Essigsäure (-60 Da) und einem Verlust von Keten (-42 Da). Auf diese Weise könnten z. B. aus den Ionen bei m/z 361, m/z 289 und m/z 217 die Fragmente m/z 259, m/z 187 und m/z 115 entstehen.

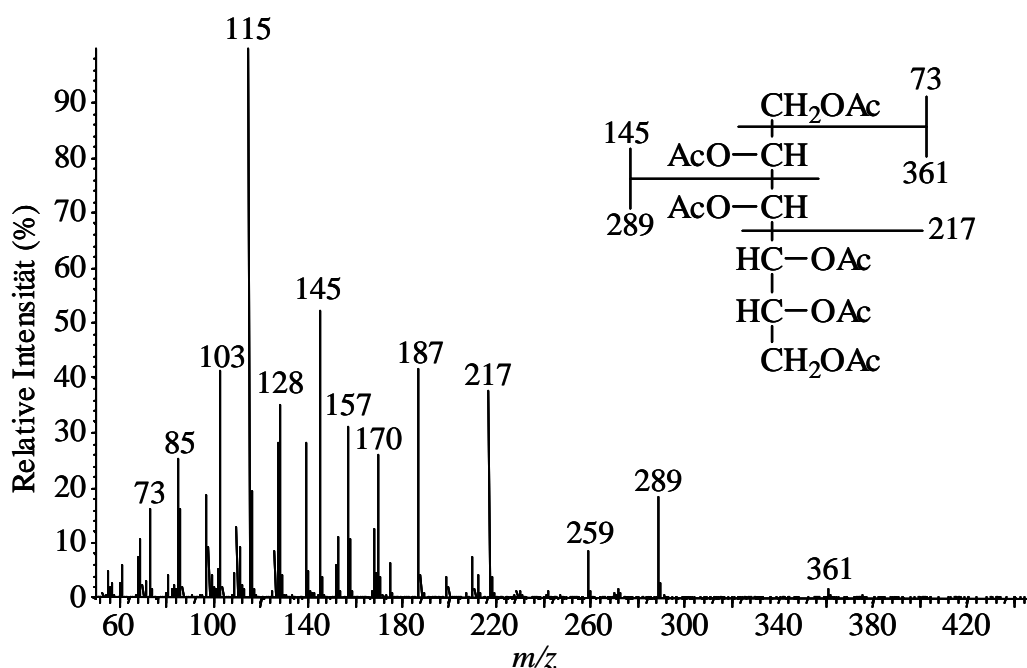


Abb. 32: EI-Massenspektrum des peracetylierten D-Mannitols ($M_G = 434$ Da)

4.2.2 Ausscheidungsstudie

Das Design der Studie sah eine orale Applikation der Zuckeralkohole D-Mannitol und D-Sorbitol vor. D-Sorbitol, das ebenfalls als Diuretikum klinische Anwendung findet, wurde in die vorliegende Studie integriert, um eine Beeinflussung der Mannitolausscheidung zu untersuchen.

Quantifizierung

Als IS für die Bestimmung von D-Mannitol und D-Sorbitol wurde meso-Allitol verwendet, da es den Analyten aufgrund seiner chemischen, chromatographischen und

massenspektrometrischen Eigenschaften sehr ähnlich ist, jedoch gaschromatographisch genügend abgetrennt wird und im Urin kaum vorkommt. Aus den Peakflächenverhältnissen des detektierten Hauptfragments m/z 289 des IS und des Analyten wurde anhand von Kalibrierfunktionen der Mannitol- und Sorbitolgehalt in den Proben bestimmt.

Studie 1: Mannitol

Am 1. Versuchstag nahmen die Probanden (P1-P6) 10 g D-Mannitol (E 421, Sigma) in Form einer wässrigen Lösung (200 ml) zu sich. Innerhalb der ersten 8 Stunden nach Applikation wurde der Urin in 2h Abständen gesammelt. Dabei wurde der gesamte Urin der Probanden gesammelt, um über das ausgeschiedene Volumen die Gesamtmenge an Mannitol in dieser Zeit bestimmen zu können.

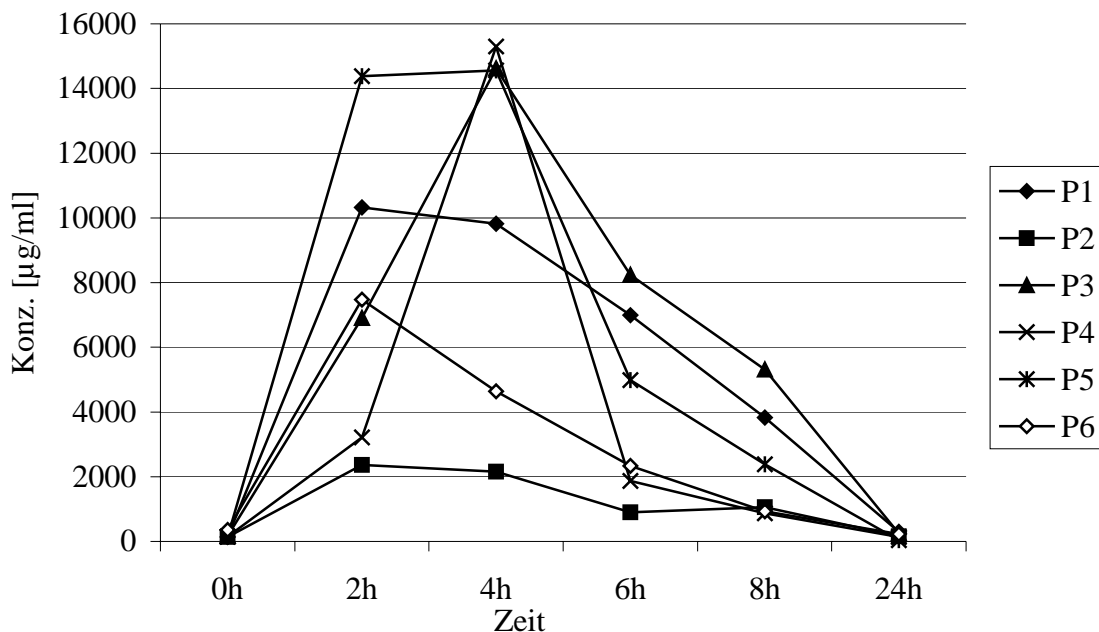


Abb. 33: Urinäre Mannitolkonzentrationen nach oraler Applikation von 10 g D-Mannitol; Probanden P1-P6

Die festgestellten Mannitol-Basalwerte ($t = 0$ h) lagen bei den Probanden P1 bis P5 zwischen 139 und 165 $\mu\text{g/ml}$, der Urin eines Probanden (P6) wies eine Mannitolkonzentration von 354 $\mu\text{g/ml}$ auf. Wie Abb. 33 zeigt, stiegen die urinären Konzentrationen nach Aufnahme von 10 g D-Mannitol schnell an und erreichten bei den

Probanden P1, P2, P5 und P6 zum Zeitpunkt $t = 2$ h ihr Maximum mit Werten von 2364 bis 14552 $\mu\text{g/ml}$. Bei 2 Probanden (P3, P4) wurden die Maximalwerte mit 14615 bzw. 15297 $\mu\text{g/ml}$ erst nach 4 h erreicht. Die Abnahme der Mannitolkonzentrationen erfolgte rasch und erreichte nach 24 h wieder das Ausgangsniveau.

Betrachtet man die Mengen an Mannitol, die nach 2, 4, 6 und 8 h ausgeschieden wurden, so ergibt sich die in Abb. 34 dargestellte Verteilung. Innerhalb der ersten 8 Stunden schieden die Probanden zwischen 3,1 und 5,0 g des verabreichten Mannitols mit dem Urin aus, was einer mittleren urinären Wiederfindung von 41,4 % entspricht.

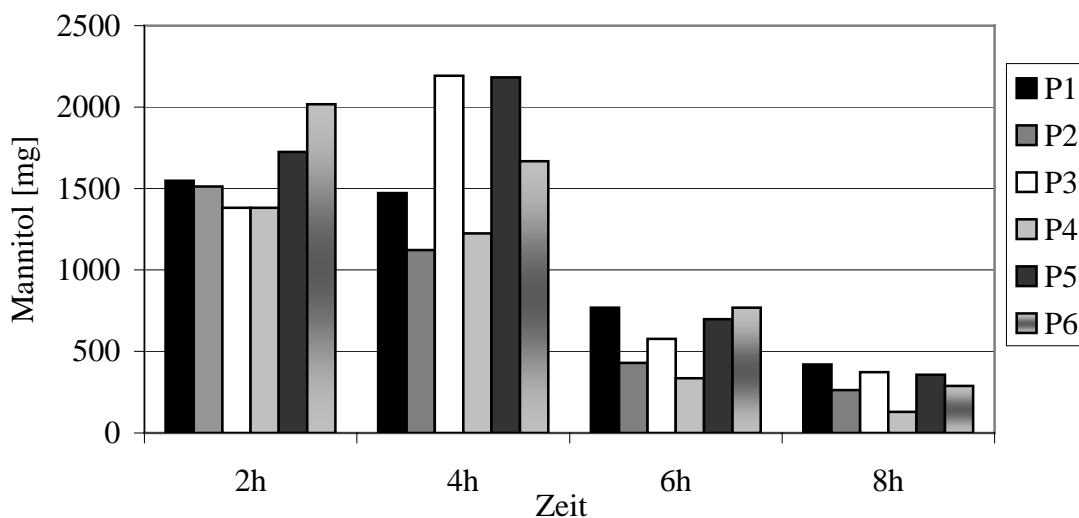


Abb. 34: Mengen an urinär ausgeschiedenem Mannitol [mg] nach 2, 4, 6 und 8 h; Probanden P1-P6.

Studie 2: Sorbitol

Die Probanden nahmen am 2. Versuchstag 10 g D-Sorbitol zu sich. Wiederum wurde in 2h Abständen bis 8 Stunden nach der Applikation der gesamte Urin gesammelt. Im Gegensatz zur urinären Mannitolkonzentration war die urinäre Sorbitolkonzentration nach der Applikation des entsprechenden Zuckeralkohols nur geringfügig beeinflusst. Wie Abb. 35 verdeutlicht, kam es innerhalb der ersten beiden Stunden zu einem leichten Anstieg der Sorbitolkonzentrationen von anfänglich 8 bis 17 $\mu\text{g/ml}$ ($t = 0$ h) auf Werte zwischen 53 und 128 $\mu\text{g/ml}$. Bei einem Probanden (P4) wurde eine Konzentration von 307 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Die Probanden schieden innerhalb von 8 Stunden insgesamt nur 17,5 bis 61,0 mg des zugeführten Sorbitols mit dem Urin aus, woraus sich eine durchschnittliche urinäre Wiederfindung von 0,3 % ergibt. Eine Beeinflussung der

Mannitolausscheidung durch eine erhöhte orale Sorbitolzufuhr konnte ausgeschlossen werden, da keine signifikante Änderung der Basalwerte für Mannitol nach Gabe von 10 g Sorbitol festgestellt werden konnte.

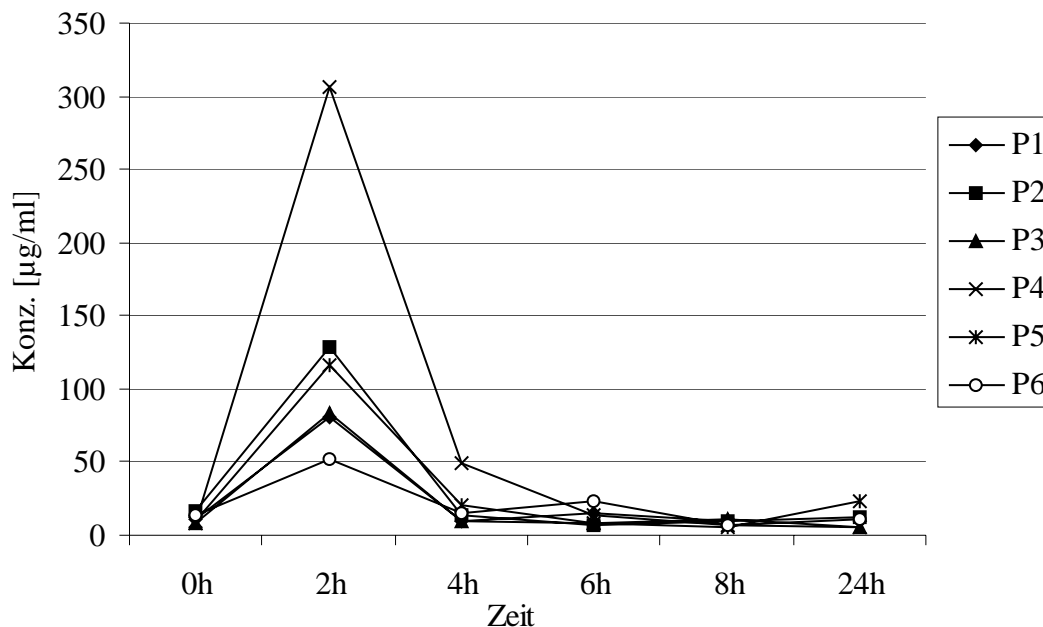


Abb. 35: Urinäre Sorbitolkonzentrationen nach oraler Applikation von 10 g D-Sorbitol; Probanden P1-P6

Studie 3: Mannitol und Sorbitol

Am 3. Versuchstag der Studie wurden gleichzeitig je 5 g D-Mannitol und D-Sorbitol appliziert, um die Unabhängigkeit des Mannitol- und Sorbitolmetabolismus und der renalen Ausscheidung der beiden Hexitole zu überprüfen.

Wie in Abb. 36 dargestellt, stiegen die Mannitolkonzentrationen in Analogie zu Versuchstag 1 rasch an und erreichten bei Proband P2, P3 und P6 nach 2 Stunden mit Werten von 2563 bis 4189 $\mu\text{g/ml}$ ihr Maximum. Proband 1, 4 und 5 erreichten das Maximum erst nach 4 Stunden mit urinären Konzentrationen von 2298, 7205 und 6741 $\mu\text{g/ml}$. Auch hier fielen die Konzentrationen innerhalb von 24 h wieder auf die Ausgangswerte ($t = 0$) zurück. In Abb. 37 sind die Mengen an Mannitol dargestellt, die nach 2, 4, 6 und 8 h ausgeschieden wurden. Die Gesamtmengen an Mannitol, die innerhalb von 8 h ausgeschieden wurden, lagen bei den Probanden zwischen 1053 mg und 3849 mg, was einer durchschnittlichen Ausscheidung von 37,2 % entspricht.

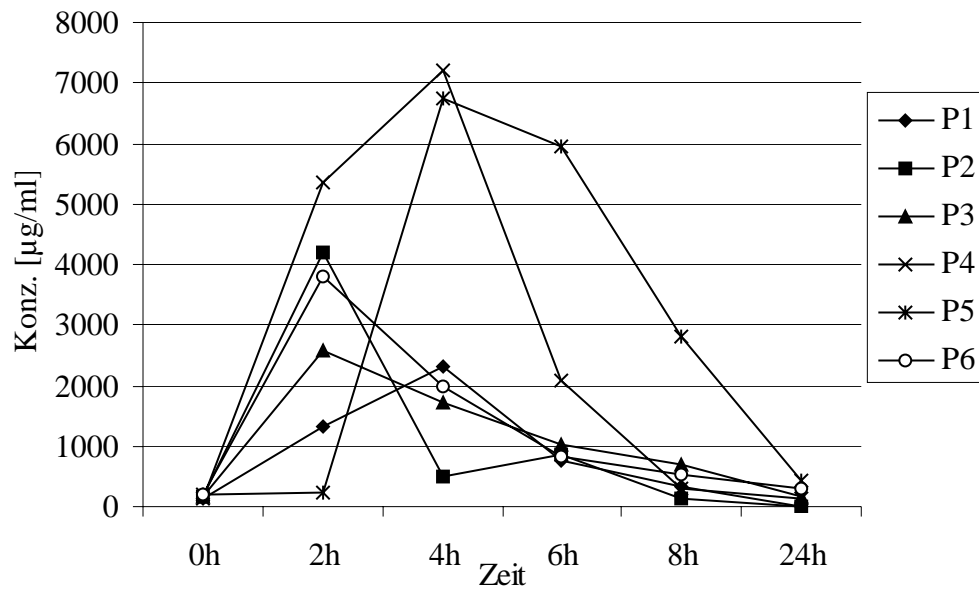


Abb. 36: Urinäre Mannitolkonzentrationen nach Applikation von je 5 g D-Mannitol und D-Sorbitol; Probanden P1-P6

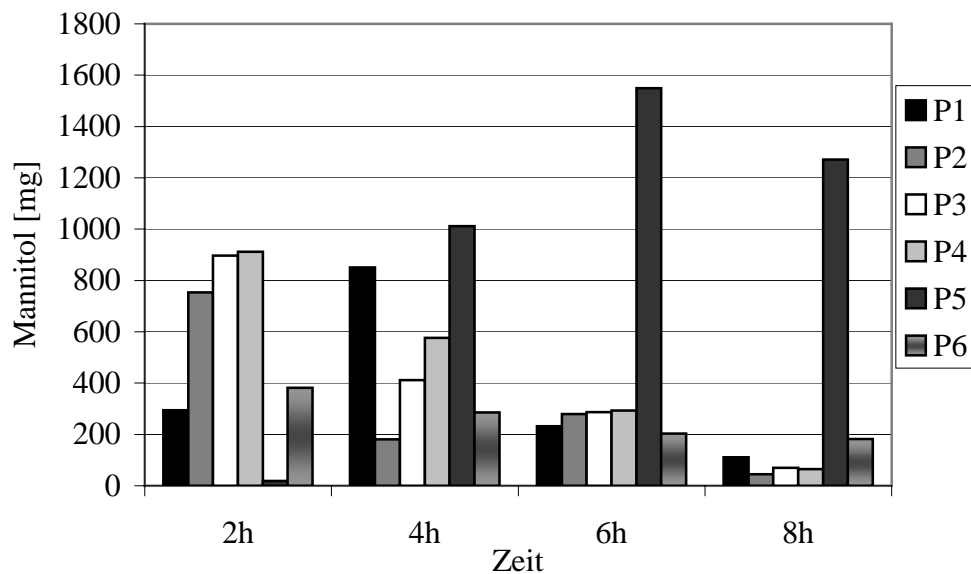


Abb. 37: Mengen an urinär ausgeschiedenem Mannitol [mg] nach 2, 4, 6 und 8 h; Probanden P1-P6.

Genau wie an Versuchstag 2 wurde im Vergleich zur urinären Mannitolkonzentration die urinäre Sorbitolkonzentration nach oraler Gabe von je 5 g D-Mannitol und D-

Sorbitol kaum beeinflusst. In den Ausscheidungsurinen lagen die gefundenen Gehalte nach 2 h zwischen 19 und 139 $\mu\text{g/ml}$. Bereits nach 6 h war bei allen Probanden das Ausgangsniveau von 5 bis 14 $\mu\text{g/ml}$ wieder erreicht (Abb. 38). Im Mittel schieden die Probanden lediglich 0,6 % des zugeführten Sorbitols mit dem Urin aus. Die mit Studie 3 erhaltenen Ergebnisse stimmen gut mit denen aus Studie 1 und 2 bezüglich der urinären Wiederfindung der Analyten überein. Eine Beeinflussung des Stoffwechsels und der renalen Ausscheidung von Mannitol durch die gleichzeitige Applikation von Sorbitol ist daher als unwahrscheinlich anzusehen.

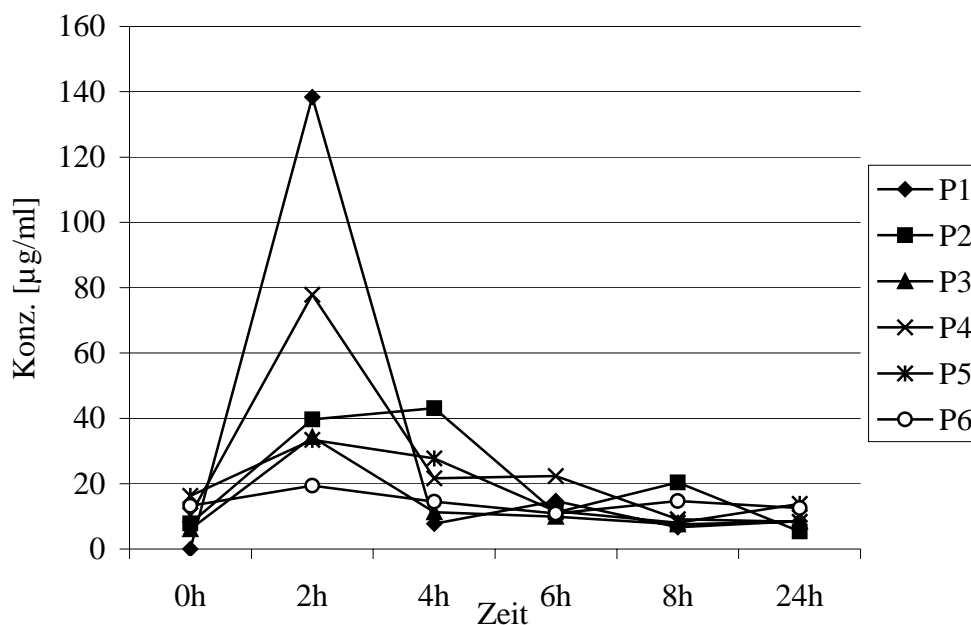


Abb. 38: Urinäre Sorbitolkonzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] nach oraler Applikation von je 5 g Mannitol und Sorbitol; Probanden P1-P6

Die mit den durchgeführten Studien erhaltenen Ergebnisse belegen den generellen Unterschied im Metabolismus der oral zugeführten Zuckeralkohole. Während große Mengen Mannitol unverändert mit dem Urin ausgeschieden werden, lassen sich nach oraler Applikation von Sorbitol nur geringe Veränderungen der urinären Sorbitolkonzentration feststellen. Daten zur Resorption von Mannitol im Gastrointestinaltrakt des Menschen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Im Allgemeinen wird von einer geringen Absorption des oral zugeführten Mannitols berichtet (MARTINDALE 1996). Nach LÜLLMANN (1999) sollen weniger als 2 %

des verabreichten Mannitols innerhalb einer Stunde im Dünndarm aufgenommen werden. MARSILIO et al. (1998) diskutieren einen passiven Transport von Mannitol über die Poren der Dünndarm-Mucosa. Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen konnten sie eine urinäre Wiederfindung im Bereich von 4 % bis 29 % des oral zugeführten Mannitols feststellen. Einigkeit herrscht über die fehlende Metabolisierung von Mannitol im Körper, so dass es unverändert mit dem Urin ausgeschieden wird.

Bei der vorliegenden Studie konnten im Mittel 39 % des oral verabreichten Mannitols im Urin wiedergefunden werden. Dies spricht für eine nicht unbeträchtliche intestinale Absorption des Zuckeralkohols, welche auch MARSILIO et al. (1998) feststellen konnten.

Im Vergleich dazu ist die hier ermittelte Wiederfindung von oral verabreichtem Sorbitol in Urin mit ca. 0,5 % sehr gering. Im Gegensatz zu Mannitol wird Sorbitol durch Diffusion im Gastrointestinaltrakt zu ca. 90 % resorbiert und anschließend durch das Enzym Ketosereductase zu Fruktose oxidiert und schließlich verstoffwechselt (LÖFFLER und PETRIDES 1997). Daher wird die urinäre Sorbitolkonzentration durch die orale Zufuhr von Sorbitol kaum beeinflusst, was die Ergebnisse der durchgeführten Studie unterstützen (Abb. 35).

Die mit der Ausscheidungsstudie erzielten Ergebnisse machen deutlich, dass eine Unterscheidung zwischen oral und intravenös zugeführtem Mannitol anhand der urinären Konzentration schwierig ist, da oral aufgenommenes Mannitol in großen Mengen mit dem Urin ausgeschieden wird. Sicherlich ist die Menge an Mannitol, die der Athlet durchschnittlich mit der Nahrung zu sich nimmt, deutlich geringer als die hier verabreichten Dosen, jedoch können erhöhte urinäre Mannitolkonzentrationen nach dem Verzehr größerer Mengen mannitolhaltiger Lebensmittel wie Äpfeln und Apfelsaft oder anderen Lebensmitteln, denen Mannitol als Zusatzstoff zugegeben wurde, nicht ausgeschlossen werden.

Um die entwickelte Methode für Dopingkontrollzwecke einzusetzen, könnte die Einführung eines Grenzwertes in Betracht gezogen werden. Dieses setzt weitere Studien zur Bestimmung der urinären Mannitolkonzentration nach intravenöser Applikation voraus. Die Untersuchung eines einzelnen zur Verfügung stehenden Ausscheidungs-urins eines Patienten, der Mannitol zu therapeutischen Zwecken intravenös appliziert bekam, macht jedoch die Problematik eines solchen Grenzwertes deutlich. Die ermittelte Mannitolkonzentration in dieser Urinprobe lag mit 2700 µg/ml im unteren

Bereich der urinären Konzentrationen, die bei der vorliegenden Studie nach oraler Gabe von 5 g Mannitol festgestellt wurden (Abb. 36).

Im Fall von Sorbitol zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass ein Nachweis einer intravenösen Applikation anhand der resultierenden urinären Sorbitolkonzentrationen aufgrund der geringen Wiederfindung in Urin nach oraler Gabe von Sorbitol möglich sein könnte. Dies setzt jedoch ebenfalls weitere Untersuchungen zur urinären Sorbitolkonzentration nach intravenöser Applikation voraus, die im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen waren.

5 Zusammenfassung

Der Plasmavolumenexpander Dextran kann im Sport missbraucht werden, um hämatologische Parameter wie z. B. den Hämatokritwert zu kontrollieren und kann so einen EPO Missbrauch maskieren. Daher ist die intravenöse Applikation von Dextran im Sport verboten (WADA 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zu Dopingkontrollzwecken eine Methode zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung des Plasmavolumenexpanders Dextran in Humanurin entwickelt. Dextran wird dabei mit Hilfe des Enzyms Dextranase zu Isomaltose hydrolysiert, die durch anschließende Derivatisierung peracetyliert wird. Die Bestimmung der peracetylierten Isomaltose erfolgt mittels LC-(APCI)-MS/MS.

Die Identifizierung und quantitative Bestimmung von Dextran gelingt aufgrund des angewendeten Messprinzips einer Doppelbestimmung, bei der jede Probe einmal mit und einmal ohne enzymatische Hydrolyse aufgearbeitet wird. Aus der Differenz der berechneten Isomaltose-, bzw. Maltose-Konzentration der nichthydrolysierten Probe und der Isomaltose-, bzw. Maltose-Konzentration der hydrolysierten Probe ergibt sich der Dextrangehalt in der Probe.

Die Methode zeichnet sich durch eine sehr gute *intra*- und *inter-day* Präzision mit V_k von 5,3-7,3 % aus. Die durch Soll-/Istwert Vergleich erhaltene mittlere Wiederfindung als Maß für die Richtigkeit beträgt 105,8-108,0 % mit einem V_k von 2,5-3,6 %. Die entwickelte Methode besitzt mit einer Verfahrensnachweisgrenze von 3,9 $\mu\text{g/ml}$ und einer Verfahrensbestimmungsgrenze von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ eine gute Empfindlichkeit.

Mit der Bestimmung der physiologisch in Urin vorkommenden Gehalte an polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen anhand von 238 Urinproben konnte gezeigt werden, dass sich diese mit Gehalten von max. 68,3 $\mu\text{g/ml}$ signifikant von Gehalten, die nach einer intravenösen Applikation von Dextran auftreten, unterscheiden. Bei einer üblichen therapeutischen Dosis von 30 g Dextran lagen die urinären Konzentrationen ($n=7$) nach intravenöser Applikation im Bereich zwischen 5,6 und 18,7 mg/ml . Im Fall eines Dopingvergehens werden applizierte Mengen und urinäre Dextranskonzentrationen in der gleichen Größenordnung erwartet, da eine ausreichend große Expansion des Plasmavolumens und somit eine effektive Absenkung des Hämatokritwertes unmittelbar vor dem Wettkampf erreicht werden soll.

Auf Grundlage der durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung der Basalwerte von polymer 1,6-verknüpften Glukosestrukturen in Humanurin wurde der WADA ein

Grenzwert von 500 µg Dextran pro ml Urin vorgeschlagen, der den eindeutigen Nachweis eines Dopingvergehens ermöglicht. Im Fall von „positiven“ Urinproben sollte ein zusätzlicher qualitativer Beweis für die Anwesenheit von Dextran mit Hilfe der Methode der PMAAs erbracht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methodik zum *Screening* und zur Bestätigung von Dextran ist von der WADA weltweit in allen akkreditierten Laboratorien für Dopinganalytik als Referenzmethode vorgeschlagen worden. Dabei ist der vorgeschlagene Grenzwert von der WADA akzeptiert worden und wird seit Januar 2005 als Kriterium für einen Dopingverstoß empfohlen.

Für das erste Halbjahr 2005 wurde das Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln als weltweites Referenzlabor für die Analytik von Dextran bestimmt. In dieser Zeit wurden ca. 35 verdächtige Proben, die im *Screening* Glukosegehalte von mehr als 500 µg/ml aufwiesen, auf die Anwesenheit von Dextran hin untersucht. Die erhöhten Glukosegehalte waren jedoch ausschließlich auf erhöhte Saccharose- oder Laktosegehalte in den Proben zurückzuführen.

Die Anwendung des Osmodiuretikums Mannitol ist im Sport verboten (WADA 2005), da die erzielte Diurese den Nachweis dopingrelevanter Substanzen erschweren oder ein positives Untersuchungsergebnis bei Substanzen, die ab einem bestimmten Grenzwert verboten sind, verhindern kann. Zudem kann die Möglichkeit zur raschen Körpergewichtsreduktion in Sportarten mit Gewichtsklassen zur Vorteilsbeschaffung missbraucht werden.

Es konnte eine empfindliche Methode entwickelt werden, mit der Mannitol nach Derivatisierung (Acetylierung) neben den anderen möglichen Hexitolen Allitol, Dulcitol, Altritol, Iditol und Sorbitol in Humanurin mittels GC/MS identifiziert und quantitativ bestimmt werden kann.

Diese Methode wurde verwendet, um im Rahmen einer Ausscheidungsstudie mit 6 Probanden die resultierenden Mannitolkonzentrationen in Urin nach oraler Zufuhr des Zuckeralkohols zu bestimmen. Im Mittel wurden dabei 39 % des verabreichten Mannitols im Urin wiedergefunden, was für eine deutliche intestinale Resorption von Mannitol spricht. Es ist daher nicht auszuschließen, dass der Verzehr mannitolhaltiger Lebensmittel zu erhöhten Mannitolkonzentrationen in Urin führt. Eine Differenzierung zwischen einer erlaubten oralen und einer verbotenen intravenösen Zufuhr von Mannitol

als Voraussetzung für den Nachweis eines Dopingvergehens ist daher aufgrund der festgestellten, hohen urinären Konzentrationen nach oraler Aufnahme schwierig.

Eine Möglichkeit die entwickelte Methode zu Dopingkontrollzwecken einzusetzen, könnte die Einführung eines Grenzwertes darstellen. Dieses würde jedoch zusätzliche Ausscheidungsstudien nach intravenöser Applikation von Mannitol erfordern, die nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren. Mit der Untersuchung eines einzelnen, nach intravenöser Applikation von Mannitol gesammelten Urins wurde die Problematik eines solchen Grenzwertes verdeutlicht. Die festgestellte Mannitolkonzentration lag im unteren Bereich der urinären Konzentrationen, die im Rahmen der durchgeführten Ausscheidungsstudie nach oraler Aufnahme von Mannitol festgestellt wurden.

Die mit dieser Arbeit entwickelten Methoden zeichnen sich durch ein hohes Maß an Empfindlichkeit, Spezifität und eine gute Reproduzierbarkeit für die quantitative Bestimmung der Analyten in Humanurin aus und eignen sich als solche, neben der Verwendung zu Dopingkontrollzwecken, sicherlich auch für eine Anwendung in anderen Bereichen der klinischen, pharmazeutischen oder lebensmittelchemischen Analytik.

6 Anhang

6.1 Statistische Kenngrößen

Standardabweichung und Variationskoeffizient

Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurden die Standardabweichung und der Variationskoeffizient (V_k) nach Gleichung (2) und (3) berechnet.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

s : Standardabweichung
 V_k : Variationskoeffizient
 x_i : Einzelwert
 \bar{x} : Mittelwert
 n : Anzahl der Messungen

$$V_k = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (3)$$

Grubbs-Test

Zur objektiven Beurteilung von Datenreihen werden eventuelle Ausreißer mit Hilfe des Grubbs-Test ermittelt. Dazu werden zunächst die Prüfgrößen des Tests für den kleinsten (PG_1) und den größten Wert (PG_2) der Messreihe berechnet.

$$PG_1 = \frac{|\bar{x} - x_1|}{s} \quad (4)$$

x_1 : kleinster Wert
 x_N : größter Wert
 s : Standardabweichung
 \bar{x} : Mittelwert der Messreihe

$$PG_2 = \frac{|x_N - \bar{x}|}{s} \quad (5)$$

Die erhaltenen Prüfgrößen PG_1 und PG_2 werden mit dem entsprechenden Tabellenwert für den Grubbs-Test unter Berücksichtigung der Anzahl der Messungen N mit $P=99\%$ verglichen.

Es gilt: PG_1 und $PG_2 <$ Tabellenwert ($P=99\%$, N) \Rightarrow Es liegt kein Ausreißer vor

Anpassungstest nach Mandel

Die Überprüfung der Linearität erfolgt durch Vergleich der Reststandardabweichung einer linearen und einer quadratischen Funktion. Dazu werden zunächst die Reststandardabweichung der linearen (s_{y1}) und der quadratischen Kalibrierfunktion (s_{y2}) nach Gleichung (6) berechnet.

$$s_{y1,2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \cdot x_i)]^2}{N - 2}} \quad (6)$$

y_i : Signalwert
 x_i : Konzentration
 m : Einzelwert
 b : Ordinatenabschnitt
 N : Anzahl der Messwerte

Aus den Reststandardabweichungen s_{y1} und s_{y2} wird die Varianzdifferenz DS^2 berechnet (Gl. 7).

$$DS^2 = (N-2) \cdot s_{y1}^2 - (N-3) \cdot s_{y2}^2 \quad (7)$$

s_{y1} : Reststandardabweichung der linearen Funktion
 s_{y2} : Reststandardabweichung der quadratischen Funktion
 N : Anzahl der Messwerte

Über einen F-Test erfolgt ein Abgleich der berechneten Varianzdifferenz DS^2 mit der Varianz der quadratischen Anpassung. Dazu wird der Prüfwert PW nach Gl. 8 bestimmt.

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad (8)$$

Der Prüfwert PW wird mit dem Wert aus der F-Tabelle für die beiden Freiheitsgrade $f_1=1$ und $f_2= N-3$ verglichen. Wenn $PW < F$ ($f_1=1$, $f_2= N-3$, $P=99\%$) so ist der Unterschied zwischen DS^2 und der Varianz der quadratischen Anpassung s_{y2}^2 nicht signifikant. Das heißt, dass die Kalibrierfunktion im untersuchten Arbeitsbereich als linear anzusehen ist.

6.2 Chemikalien, Materialien und sonstige Geräte

Für alle Lösungen wurde Reinstwasser verwendet (Milli Q/Elix 3, Millipore)

Referenzsubstanzen

| | |
|--|---|
| Isomaltose | 98%+, Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Dextran | Clinical grade (6% Wasser), Sigma (Steinheim) |
| D-Glukose- ¹³ C ₆ | 99% ¹³ C, Aldrich (Milwaukee, USA) |
| D-Mannitol- ¹³ C ₁ | 99%, Cambridge Isotope Lab. (Cambridge, USA) |
| Stärke- ¹³ C ₆ | 98%, Cambridge Isotope Lab. (Cambridge, USA) |
| D-Allitol | Eigensynthese |
| D-Altritol | Eigensynthese |
| D-Dulcitol | 99%, Sigma (Steinheim) |
| D-Iditol | 99%, Sigma (Steinheim) |
| D-Sorbitol | reinst, Serva (Heidelberg) |
| D-Mannitol | p.a., Serva (Heidelberg) |

Lösungsmittel und Chemikalien

| | |
|-------------------------|---|
| Acetonitril | HPLC Grade, J. T. Baker (Deventer, Niederlande) |
| Eisessig | p.a., Merck (Darmstadt) |
| Ammoniumacetat | p.a., Merck (Darmstadt) |
| Natriumhydroxid | p.a., Merck (Darmstadt) |
| Essigsäureanhydrid | p.a., Merck (Darmstadt) |
| Natriumazid | extra pure., Merck (Darmstadt) |
| Zitronensäuremonohydrat | p.a., Merck (Darmstadt) |
| Phosphorpentoxid | extra pure, Merck (Darmstadt) |

| | |
|----------------------------|---|
| Chloroform | p.a., Merck (Darmstadt) |
| Dextranase Penicillium sp. | (170 units/mg, Enzyme Commission Number: 3.2.1.11), Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Pyridin | 99%+, Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | p.a., Merck (Darmstadt) |
| Natriumhydroxid | p.a., Merck (Darmstadt) |
| Methyljodid | p.a., Merck (Darmstadt) |
| Natriumborhydrid | zur Synthese, Merck (Darmstadt) |
| Methanol | 99%, KMF (Lohmar) |
| Salzsäure | p.a., KMF (Lohmar) |
| Isopropanol | 99%., Merck (Darmstadt) |

Materialien und sonstige Geräte

| | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Polypropylen Reaktionsgefäße (1,5 ml) | 3810-x Eppendorff (Hamburg) |
| Ultraschallbad | Transsonic 420, Elma (Singen) |
| Zentrifuge | Z 513, Hermle (Wehlingen) |
| Mikrozentrifuge | Biofuge A, Heraeus Christ (Osterode) |

7 Literaturverzeichnis

- ABDATA (1998). Pharmazeutische Stoffliste. 11.Aufl., Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker m.b.H, Eschborn.
- ABIAN J (1999). The Coupling of Gas and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 34: 157-168
- ASAM MR, GLISH GL (1997). Tandem mass spectrometry of alkali cationized polysaccharides in a quadrupole ion trap. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* 8: 987-995
- AXELROD J (1954). Studies on symphatomimetic amines. II. The biotransformation and physiological disposition of d-amphetamin, d-p-hydroxyamphetamin and d-methamphetamin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 110: 315-326
- BAO Y, SILVA TM, GUERRANT RL, LIMA AM, FOX JW (1996). Direct analysis of mannitol, lactulose and glucose in urine samples by high-performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection. Clinical evaluation of intestinal permeability in human immunodeficiency virus infection. *Journal of Chromatography B* 685: 105-112
- BECKETT AH, TUCKER GT, MOFFAT AC (1967). Routine detection and identification in urine of stimulants and other drugs, some of which may be used to modify performance in sport. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 19: 273-294
- BELITZ HD, GROSCH W (1992). *Lehrbuch der Lebensmittelanalytik*. 4. Aufl., Springer, Berlin.
- BJÖRNDAL H, LINDBERG B, SVENSSON S (1967). Mass Spectrometry of partially methylated Alditol Acetates. *Carbohydrate Research* 5: 443-440

- BJÖRNDAL H, LINDBERG B, PILOTTI A, SVENSSON S (1970). Mass Spectra of partially methylated Alditol Acetates. *Carbohydrate Research* 15: 339-349
- BOLDT J (1998). Volumenersatz beim schwerkranken Intensivpatienten. *Der Anästhesist* 47: 778-785
- BRECHER ME, OWEN HG, BANDARENKO N (1997). Alternatives to Albumin: Starch Replacement for Plasma Exchange. *Journal of Clinical Apheresis* 12:146-153
- BURKE L, DEAKIN V (1994). *Clinical Sports Nutrition*. McGraw-Hill, 1st ed., Sydney.
- BURSTIN S (1963). La Lucha contra el dopage. *Revista de Derecho Sportiva* 3: 583-636.
- ČMELIK R, ŠTIKAROVSKA M, CHMELIK J (2004). Different behaviour of dextrans in positive-ion and negative-ion mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 39: 1467-1473
- COLE RB (2000). Some tenets pertaining the electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35: 763-772
- COX MA, IQBAL TH, COOPER BT, LEWIS KO (1997). An analytical method for the quantitation of mannitol and disaccharides in serum: a potentially useful technique in measuring small intestinal permeability in vivo. *Clinica Chimica Acta* 263: 197-205
- CIUCANU I, KEREK F (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* 131: 209-217
- CIUCANU I, COSTELLO CE (2003). Elimination of Oxidative Degradation during the per-O-Methylation of Carbohydrates. *Journal of the American Chemical Society* 125: 16213-16219

- DEERY MJ, STIMSON E, CHAPPELL CG (2001), Size exclusion chromatography/mass spectrometry applied to the analysis of polysaccharides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15: 2273-2283
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (1986). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser und Schlammuntersuchung: Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analysenergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen (A 51). DIN 38402, Teil 51
- DOLE M, MACH LL, HUNES RL, MOBLEY RC, FERGUSON LP, ALICE MB (1968). *Journal of Chemistry and Physics* 49: 2240
- DURAND G, SETA N (2000). Protein Glycosylation and Diseases. Blood and Urinary Oligosaccharides as Markers for Diagnosis and Therapeutic Monitoring. *Clinical Chemistry* 46: 795-805
- DÜSING R (1986). Diuretica: Pharmakologie und therapeutischer Einsatz. In: Ammon HPT, Werning C (Hrsg.). *Medizinisch pharmakologisches Kompendium Band 3*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- EADES DM, WILLIAMSON JR, SHERMAN WR (1988). Rapid analysis of sorbitol, galactitol, mannitol and myoinositol mixtures from biological sources. *Journal of chromatography B* 490:1-8
- FORTH W, HENSCHLER D, RUMMEL W, STARKE K (1992). *Pharmakologie und Toxikologie*. 6. Aufl., BI Wissenschaftsverlag, Mannheim.
- GALENSA R (1983). Hochleistungs-flüssigkeitschromatographische Bestimmung von Zuckeralkoholen mit UV-Detektion im ppm-Bereich in Lebensmitteln. I. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 176:417-420
- GASKELL SJ (1997). Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry* 32: 677-688

- GRAEFE H, GUTSCHOW B, GEHRING H, DIBBELT L (2003). Sensitive and specific photometric determination of mannitol in human serum. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41: 1049-1055
- GRANRATH KA, KVIST BE (1967). Molecular weight distribution analysis by gel chromatography on sephadex. *Journal of Chromatography* 28: 69-81
- GRUBER UF (1968). *Blutersatz*. Springer, Berlin: 57-105
- GUTIERREZ-GALLEGO R, SEGURA J (2004). Rapid screening of plasma volume expanders in urine using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18: 1324-1330
- HANISCH FG (1994). Methylation analysis of complex carbohydrates: Overview and critical comments. *Biological Mass Spectrometry* 23: 309-312
- HAKAMORI S (1964). A rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide catalysed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide. *Journal of Biochemistry* 55: 205-208
- HELLERQVIST CG, SWEETMAN BJ (1990). Mass Spectrometry of Carbohydrates. *Methods of Biochemical Analysis* 34: 91-143
- HEMMELDER MH, DE JONG PE, DE ZEEUW D (1998). A comparison of analytical procedures for measurement of fractional dextran clearances. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 132: 390-403
- HESSELS J, SNOEYINK EJ, PLATENKAMP AJ et al. (2003). Assessment of intestinal permeability: enzymatic determination of urinary mannitol, raffinose, sucrose and lactose on Hitachi analyzer. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 41: 33-38

- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (2005). Validation of analytical procedures: Methodology Q2B.
http://www.ich.org/UrlGrpServer.jserv?@_ID=276&@_TEMPLATE=254
(Eingesehen April 2005).
- JANSON J, PORATH J (1966). A Bacterial Dextranase. *Methods in Enzymology* Academic Press, New York 8: 615
- JEANES A, TSUCHIYA HM, BRICKER HM, WILHAM CA (1952). Dextran-Degrading Enzymes from Molds. *Journal of Bacteriology* 64(4): 513-519
- KELLER RE, ELLENBOGEN WC (1954). The determination of d-amphetamine in body fluids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 106: 77-82.
- KIYOSHIMA A, KUDO K, HINO Y, IKEDA N (2001). Sensitive and simple determination of mannitol in human brain tissues by GC/MS. *Journal of Chromatography B* 758: 103-108
- KLEIN A, LEBRETON A, LEMOINE J, PERINI JM, ROUSSEL P, MICHALSKI JC (1998). Identification of urinary oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 44: 2422-2428.
- KROMIDAS S (1999). *Validierung in der Analytik*. 1. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim.
- KUMLIEN J, CHESTER MA, LINDBERG BS, PIZZO P, ZOPF D, LUNDBLAD A (1988). Urinary excretion of a glucose-containing tetrasaccharide. A parameter for increased degradation of glycogen. *Clinica Chimica Acta* 15: 38-48
- LI DT, HER GR (1998). Structural analysis of chromophore-labeled disaccharides and oligosaccharides by electrospray ionisation mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 33: 644-652

- LIM CK, LORD G (2002). Current Development in LC-MS for Pharmaceutical Analysis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25: 547-557
- LÖFFLER G, PETRIDES PE (1997). *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin.
- LOTTSPREICH F, ZORBAS H (1998). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- LÜLLMANN H, MOHR K (1999). *Pharmakologie und Toxikologie*. 14. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- MARSILIO R, D'ANTIGA L, ZANCAN L, DUSSINI N, ZACCHELLO F (1998). Simultaneous HPLC determination with light-scattering detection of lactulose and mannitol in studies of intestinal permeability in pediatrics. *Clinical Chemistry* 44: 1685-1691
- MANO N, GOTO J (2003). *Biomedical and Biological Mass Spectrometry*. *Analytical Sciences* 19: 3-14
- MARTINDALE (1996). *The Extra Pharmacopoeia*. Reynolds JEF (Ed.). Royal Pharmaceutical Society, 31st ed. London: 760-762
- MARUNAKA T, MATSUSHIMA E, UMENO Y, MINAMI Y (1983). GLC-mass fragmentographic determination of mannitol and sorbitol in plasma. *Journal of Pharmaceutical science* 72: 87-89
- MURRAY B (1996). Fluid Replacement: The American College of Sports Medicine Position Stand. *Sports Science Exchange* 9:63
- NITSCH E (1998). Volumenersatz mit künstlichen Kolloiden. *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* 33: 255-260

- OHASHI Y (1997). Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Carbohydrates and Lipids. In: Cole RB. Electrospray Ionization Mass Spectrometry. John Wiley & Sons: 459-494
- PETTIT BR, KING GS, BLAU K (1980). The analysis of hexitols in biological fluids by selected ion monitoring. *Biomedical Mass Spectrometry* 7: 309-313
- PRODOLLIET J, BUGNER E, FEINBERG M (1995). Determination of carbohydrates in soluble coffee by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: interlaboratory studie. *Journal of AOAC International* 78: 768-782
- PROKOP L (1970). The struggle against Doping and its history. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 10: 45-48
- RENNER F, SCHMITZ A, GEHRING H (1998). Rapid and sensitive gas chromatography-mass spectroscopy method for the detection of mannitol and sorbitol in serum samples. *Clinical Chemistry* 44: 886-888
- RICHTER D (1938). A colour reaction for benzedrine. *Lancet* 238: 1275
- SALMON JB, MYTHEN MG (1993). Pharmacology and Physiology of Colloids. *Blood Reviews* 7: 114-120
- SCOTT TA, MELVIN EH (1953). Determination of dextran with anthrone. *Analytical Chemistry* 25: 1656-1661
- SHEN X, PERREAULT H (1998). Characterization of carbohydrates using a combination of derivatisation, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 811: 47-59
- SINGLETON V, HORN J, BUCKE C, ADLARD M (2002). A new polarimetric method for the analysis of dextran and sucrose. *Journal American Society of Sugarcane Technologists* 22: 112-119

- THEVIS M, OPFERMANN G, SCHÄNZER W (2000a). Detection of the plasma volume expander hydroxyethyl starch in human urine. *Journal of chromatography B* 744: 345-350
- THEVIS M, OPFERMANN G, SCHÄNZER W (2000b). Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates derived from hydroxyethyl starch. *Journal of Mass Spectrometry* 35: 77-84
- THEVIS M, OPFERMANN G, SCHÄNZER W (2001). Nachweis des Plasmavolumen-expanders Hydroxyethylstärke in Humanurin. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 52: 316-320
- VERGOUWEN PCJ, COLLEE T, MARX JJM (1999). Haematocrit in elite athletes. *International Journal of Sports and Medicine* 20: 538-541
- VIDIC E (1956). Eine Methode zur Identifizierung papierchromatographisch isolierter Arzneistoffe. *Archives of Toxicology* 16:63-73
- WORLD ANTI-DOPING AGENCY (2004). The 2005 Prohibited List. http://www.wada-ama.org/_docs/_web/_standards_harmonization/_code/_list_standard_2005.pdf (Eingesehen April 2005).
- WORLD ANTI-DOPING AGENCY (2005). Validation of Methods (International Standard for Laboratories 5.4.4.2). http://www.wada-ama.org/_rtecontent/_document/_lab_aug_04.pdf (Eingesehen Juli 2005).
- ZHU J, COLE RB (2001). Ranking of gas-phase acidities and chloride affinities of monosaccharides and linkage specificity in collision-induced decompositions of negative ion electrospray-generated chloride adducts of oligosaccharides. *Journal American Society of Mass Spectrometry* 12: 1193-1204