

Identifizierung und Bestimmung von Humaninsulin, synthetischen  
Insulinanalogen,  
deren Abbauprodukten und C-Peptid in Humanurin und  
Humanplasma zu Dopingkontrollzwecken  
mittels Flüssigkeitschromatographie / Massenspektrometrie

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andreas Thomas

aus Bonn

Bonn 2008

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Galensa

2. Gutachter: Prof. Dr. Gabriele M. König

Tag der Promotion: 18.04.2008

Erscheinungsjahr: 2008

„Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert“

meinen Eltern

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Veröffentlichungen:**

Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosseloir A, Schänzer W: Qualitative determination of synthetic analogues of insulin in human plasma by immunoaffinity purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for doping control purposes. *Anal Chem* (2005);77:3579-85.

Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosseloir A, Schänzer W: Doping control analysis of intact rapid-acting insulin analogues in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* (2006);78:1897-903

Thomas A, Thevis M, Delahaut P, Bosseloir A, Schänzer W: Mass spectrometric identification of degradation products of insulin and its long-acting analogues in human urine for doping control purposes. *Anal Chem* (2007);79:2518-2524.

Thevis M, Thomas A, Schänzer W: Mass spectrometric determination of insulins and their degradation products in sports drug testing. *Mass Spectrom Rev* (2008); 27: 35-50

### **Tagungsbeiträge und Vorträge:**

Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosseloir A, Schänzer W: Qualitative Determination of Synthetic Insulin Analogues in Human Plasma by Means of LC-MS/MS (Vortrag) In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U (eds.) Recent advances in doping analysis (13). Sport und Buch Strauß, Köln (2005) 245-254

Thomas A, Thevis M, Schänzer W: The Progress of Analytical Methods for the Detection of Prohibited Drugs in Doping Controls (Vortrag), Europrevent: European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation (2006), Athens, Greece

Thomas A, Thevis M, Delahaut P, Bosseloir A, Schänzer W: Qualitative determination of rapid acting synthetic insulin analogues in urine by means of LC-MS/MS (Vortrag)

In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U (eds.) Recent advances in doping analysis (14). Sport und Buch Strauß, Köln (2006) 367-376

Thomas A, Thevis M, Delahaut P, Bosseloir A, Schänzer W: Identification and determination of degradation products of human insulin and its long acting synthetic analogues in urine by means of ESI-LC-MS/MS (Vortrag) In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U (eds.) Recent advances in doping analysis (15). Sport und Buch Strauß, Köln (2007)

Thomas A, Thevis M, Delahaut P, Bosseloir A, Schänzer W: Identifizierung und Nachweis von Humaninsulin, synthetischen Insulinanalogen und deren Abbauprodukten in Plasma und Urin zu Dopingkontrollzwecken mittels LC-ESI-MS/MS (Vortrag), 40. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (2007), Bremen

Danksagung:

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von Mai 2004 bis Juni 2007 unter 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 und die konstruktiven Gespräche während dieser Zeit danken und bei Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schänzer bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die Unterstützung während der experimentellen Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Mario Thevis vom Zentrum für präventive Dopingforschung der Deutschen Sporthochschule Köln für die hervorragende Einarbeitung und Unterstützung während der gesamten Zeit. Seine Bereitschaft zur Diskussion und zur Klärung offener Fragen hat jederzeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. P. Delahaut und Dr. A. Bosseloir vom Laboratory of Hormonology (CER) bzw. ZenTech (Parc Scientifique du Sart-Tilman) in Belgien für die Bereitstellung des Anti-Insulin-Immunoaffinitäts-Gels und Herrn Dr. T. Hoeg-Jensen von NovoNordisk (Dänemark) für die freundliche Überlassung der DesB30 Humaninsulin Referenzsubstanz .

Auch bei allen meinen Kollegen im Institut für Biochemie möchte ich mich für die stets konstruktive Zusammenarbeit bedanken, dabei möchte ich besonders Herrn Dr. Sven Guddat, Herrn Dr. Hans Geyer und Herrn Dr. Gregor Fußhüller für Ihre maßgebliche Unterstützung herzlichst danken.

Schließlich danke ich Frau Sandra Titze, die mit wertvollen Ratschlägen nach kritischer Durchsicht einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Literaturbesprechung .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Historisches zu Insulin .....</b>	<b>9</b>
2.2 Biochemie von Insulin und C-Peptid .....	11
2.3 Biologische Wirkungen.....	15
2.4 Pharmakologische Wirkungen von Humaninsulin und synthetischen Insulinanaloga ..	16
2.5 Mißbrauch von Insulin als Dopingsubstanz .....	21
2.6 Immunoaffinitäts-Chromatographie.....	22
2.7 Bestimmung von Insulin und C-Peptid .....	25
2.8 Massenspektrometrische Charakterisierung von Peptiden.....	26
2.9 Lineare Ionenfallen (LIT).....	29
2.10 Metabolischer Abbau von Insulin .....	31
<b>3. Experimenteller Teil .....</b>	<b>33</b>
3.1 Methodenentwicklung Insulin.....	33
3.1.1 Massenspektrometrische Charakterisierung von Insulin mittels ESI-MS/MS.....	33
3.1.2 Standardlösungen .....	34
3.1.3 Reduktive Spaltung von Insulin .....	34
3.1.4 Massenspektrometrische Charakterisierung der Insulin B-Ketten.....	35
3.1.5 Flüssigkeitschromatographische Trennung.....	35
3.1.6 Immunoaffinitäts-Chromatographie (IAC) .....	35
3.1.7 Festphasenextraktion (SPE) .....	36
3.1.8 Interner Standard (IS).....	36
3.2 Qualitative Bestimmung von Humaninsulin, Lispro, Aspart und Lantus in Plasma mittels LC-MS/MS .....	38
3.2.1 Probenvorbereitung .....	38
3.2.2 LC-MS/MS.....	38
3.3 Validierung.....	40
3.3.1 Spezifität.....	40
3.3.2 Nachweisgrenze .....	40
3.3.3 Präzision .....	40
3.3.4 Wiederfindung.....	41

3.3.5 Linearität .....	41
3.4 Qualitative Bestimmung von Humaninsulin, Lispro, Aspart und Apidra in Urin mittels LC-MS/MS.....	41
3.4.1 Probenvorbereitung .....	41
3.4.2 LC-MS/MS.....	42
3.5 Validierung.....	43
3.5.1 Spezifität.....	43
3.5.2 Nachweisgrenze .....	44
3.5.3 Präzision .....	44
3.5.4 Wiederfindung.....	44
3.5.5 Linearität .....	44
3.5.6 Stabilität .....	44
3.6 Insulin-Bestimmung in regulären Dopingkontrollproben und Patientenerinen.....	45
3.7 Qualitative Bestimmung der metabolischen Abbauprodukte von Humaninsulin, Lantus und Detemir in Urin mittels LC-MS/MS .....	45
3.7.1 Referenzstandards .....	45
3.7.2 Enzymatische Hydrolyse von Lantus.....	46
3.7.3 Probenvorbereitung .....	48
3.7.4 LC-MS/MS.....	48
3.8 Validierung.....	50
3.8.1 Spezifität.....	50
3.8.2 Nachweisgrenze .....	50
3.8.3 Präzision .....	50
3.8.4 Wiederfindung.....	51
3.8.6 Stabilität .....	51
3.9 Methodenentwicklung C-Peptid.....	51
3.9.1 Festphasenextraktion (SPE) .....	52
3.9.2 Flüssigkeitschromatographie (LC).....	52
3.9.3 Massenspektrometrische Charakterisierung.....	52
3.9.4 Interner Standard C-Peptid (ISC).....	53
3.9.5 Standardlösungen .....	54
3.10 Quantitative Bestimmung von C-Peptid in Urin .....	54
3.10.1 Probenvorbereitung .....	54
3.10.2 Kalibriergerade.....	54



3.10.3 LC-MS/MS.....	55
3.11 Validierung.....	56
3.11.1 Spezifität.....	56
3.11.2 Bestimmungsgrenze .....	57
3.11.3 Präzision und Vergleichspräzision.....	57
3.11.4 Wiederfindung.....	57
3.11.5 Richtigkeit.....	57
3.11.6 Linearität und Arbeitsbereich.....	58
3.11.7 Stabilität .....	58
<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>59</b>
4.1 Insulin.....	59
4.1.1 Ladungszustände der mehrfach geladenen Quasimolekülonen .....	59
4.1.2 Identifizierung und Charakterisierung diagnostischer Produktionen.....	59
4.1.3 Flüssigkeitschromatographie.....	90
4.1.4 Bestimmung von Humaninsulin in Plasma .....	90
4.2 Methodvalidierung: Humalog, Novolog und Lantus im Plasma.....	93
4.2.1 Spezifität.....	93
4.2.2 Nachweisgrenze (LOD).....	94
4.2.3 Präzision an der Nachweisgrenze.....	95
4.2.4 Wiederfindung.....	95
4.2.5 Linearität .....	96
4.3 Bestimmung von Humaninsulin in Urin .....	97
4.4 Methodvalidierung der schnell wirkenden Insulinanalogen Humalog, Novolog und Apidra in Urin .....	100
4.4.1 Spezifität.....	100
4.4.2 Nachweisgrenze (LOD).....	100
4.4.3 Präzision am LOD.....	101
4.4.4 Wiederfindung.....	102
4.4.5 Linearität .....	102
4.4.6 Stabilität .....	102
4.5 Untersuchung von Patientenurinen und Dopingkontrollproben.....	103
4.6 Untersuchungen zur Analytik der langwirkenden Insulinanalogen Lantus und Levemir in Urin .....	108

4.7 Identifizierung der Abbauprodukte von HI und Levemir: DesB30 HI, DesB25-30 HI und DesB24-30 HI .....	109
4.8 Identifizierung der Abbauprodukte von Lantus (LAN): DesB30-32 LAN, DesB31-32 LAN und DesB24-32 LAN .....	112
4.9 Methodvalidierung zum qualitativen Nachweis der Abbauprodukte DesB30 HI und DesB30-32 LAN in Urin .....	114
4.9.1 Spezifität.....	114
4.9.2 Nachweisgrenze (LOD).....	115
4.9.3 Präzision am LOD .....	115
4.9.4 Wiederfindung.....	115
4.9.5 Linearität .....	116
4.9.6 Stabilität .....	116
4.10 Untersuchung von Dopingkontrollproben.....	116
4.11 C-Peptid.....	120
4.11.1 Massenspektrometrische Charakterisierung.....	120
4.11.2 Flüssigkeitschromatographie.....	122
4.12 Bestimmung von C-Peptid im Urin.....	123
4.12.1 Methodvalidierung zur quantitativen Bestimmung von C-Peptid im Urin .....	123
4.12.2 Untersuchung von Urinproben zu Dopingkontrollzwecken.....	130
4.13 Validierungsergebnisse.....	131
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>132</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>134</b>
6.1 Statistische Kenngrößen.....	134
6.2 Chemikalien und Referenzsubstanzen .....	136
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>138</b>



## Abkürzungsverzeichnis

CE	<i>Collision Energy</i>
CID	<i>Collision-Induced-Dissoziation</i>
Da	Dalton
DP	<i>Declustering Potential</i>
EAI	<i>Endosomal Acidic Insulinase</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAB	<i>Fast Atom Bombardement</i>
HI	Humaninsulin
IAC	Immunoaffinitäts-Chromatographie
IDE	<i>Insulin Degrading Enzyme</i>
IOC	Internationales Olympisches Komitee
IS	Interner Standard
ISC	Interner Standard (C-Peptid)
IU	Internationale Einheit
LAN	Lantus
LIT	Lineare Ionenfalle
LOD	Nachweisgrenze
LOQ	Bestimmungsgrenze
MAB	Monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
MRM	<i>Multiple-Reaction Monitoring</i>
MW	Molekulargewicht
NPH	Neutral-Protemin Hagedorn
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
RIA	<i>Radio-Immuno-Assay</i>
SPE	Festphasenextraktion
TCEP-HCl	<i>Tris(carboxyethyl)phosphine-Hydrochloride</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>Time-of-Flight</i>
WADA	Welt-Anti-Doping-Agentur

## 1. Einleitung

Bereits kurz nach der Entdeckung von Insulin zu Beginn des 20. Jahrhundert wurde das stoffwechselaktive Peptidhormon zur Behandlung von Patienten mit *Diabetes mellitus* erfolgreich eingesetzt [1]. In den Focus der Dopinganalytik rückte es jedoch erst nach 1998, als es zusammen mit den chemisch modifizierten Insulinanalogen, in die Liste der im Sport verbotenen Substanzen aufgenommen worden ist [2]. Nur Athleten, die nachweislich an *Diabetes mellitus* leiden, erhalten eine therapeutische Ausnahmegenehmigung. Der Mißbrauch der potentiell leistungssteigernden Substanz ist hingegen schon seit Beginn der 90er Jahre bekannt und wird seit dem nicht nur in der wissenschaftlichen, sondern auch in der Untergrundliteratur regelmäßig diskutiert [2-8]. Die dabei erzielten Effekte sind, obwohl physiologisch noch nicht vollständig aufgeklärt, sehr vielfältig und machen den Einsatz in vielen Sportarten denkbar. Vorrangig scheinen jedoch einerseits die Einflüsse auf den Glukosehaushalt durch die Bereitstellung von Energiereserven als Glykogen und andererseits die antikatabole Wirkung durch Hemmung der Proteo- und Lipolyse im Organismus zu sein [2].

Die Bestimmung von Insulin und C-Peptid, welche in äquimolaren Mengen durch Spaltung von Proinsulin in der Bauchspeicheldrüse gebildet werden, stellen in der Therapie und Diagnostik von *Diabetes mellitus* wichtige Parameter dar [9]. Leider sind die in der klinischen Routine eingesetzten immunochemischen Bestimmungsverfahren (RIA, ELISA usw.) für die Dopinganalytik ungeeignet, weil Kreuzreaktionen mit Abbauprodukten oder Insulinanalogen, der auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen basierenden Methoden, eine eindeutige Identifizierung erschweren [9, 10]. Die Unterscheidung von endogen in der Bauchspeicheldrüse produziertem Humaninsulin gegenüber den subkutan applizierten, chemisch modifizierten Insulinanalogen soll demnach mit Hilfe der Massenspektrometrie erfolgen. Als analytische Herausforderungen zeigen sich hierbei die zu erwartenden Mengen ( $< 1 \text{ ng/mL}$  Insulin in Plasma bzw.  $< 0,1 \text{ ng/mL}$  in Urin) und die große Ähnlichkeit der Insulinanalogen untereinander. Auch der höchst effektive Metabolismus und die daraus resultierende kurze Halbwertszeit im Blut, erschweren den Nachweis noch zusätzlich [11]. Für Humaninsulin, dessen synthetische Analoga und C-Peptid werden im Rahmen dieser Arbeit Methoden mit flüssigkeitschromatographischer Trennung und anschließender massenspektrometrischer Detektion nach effizienter Probenaufarbeitung vorgestellt. Diese können dann nicht nur in der Dopinganalytik, sondern auch für forensische oder allgemein pharmakologische Zwecke genutzt werden.



## 2. Literaturbesprechung

### 2.1 Historisches zu Insulin

Die Entdeckung von Insulin gehört sicherlich zu den spannendsten und bedeutendsten Ereignissen in der Geschichte zur Behandlung von Krankheiten und fand 1923 mit der Verleihung des Nobelpreises an F.G. Banting, C. Best, J.J.R. Macleod und J.B. Collip ihren Höhepunkt [1]. Das stoffwechselaktive Peptid-Hormon wurde nach vielen, weniger erfolgreichen Versuchen anderer Wissenschaftler von C. Best und F.G. Banting aus dem Pankreas von Schweinen isoliert und ermöglichte so die Überlebensfähigkeit von Diabetikern dramatisch zu verlängern [12-15]. Dabei wurde der Name „Insulin“ (von Insel) schon 1909 von de Meyer eingeführt und in den folgenden Jahren sind die verschiedenen physiologischen Wirkungen für die bis dahin lediglich hypothetisch existierende Substanz schon bemerkenswert gut beschrieben worden, wobei diese Prinzipien in ihrer grundsätzlichen Form noch bis heute gültig und richtig sind [16, 17]. Bereits 1869 entdeckte Paul Langerhans die Inselzellen im Gewebe der Bauchspeicheldrüse, in denen das Hormon gebildet wird. Auch die Wirkung auf den Glukose-Stoffwechsel im Körper und die Verbindung zum Krankheitsbild des Typ I Diabetes war zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt, konnte jedoch nicht wirkungsvoll behandelt werden, und so führte die Krankheit unweigerlich zum Tode [1, 2]. Die Isolierung und Reinigung des bioaktiven Hormons aus dem Rinderpankreas durch die Versuche von Best und Banting war schließlich der Schlüssel zum Erfolg, stellte sich aber als schwierig heraus, weil es nach Homogenisierung der intakten Drüse durch körpereigene Proteasen selbst verdaut wurde oder durch Hitze beim wässrigen Extrahieren seine physiologische Wirkung verlor. Erst die Kaltextraktion aus einem abgeschnürten Hundepankreas und anschließender Injektion des Extraktes in einen künstlich diabetisierten Hund brachte erste Erfolge, die sich durch einen signifikanten Abfall des Blutzuckerspiegels bemerkbar machten [1]. Eine Methode zur analytischen Bestimmung des Blutzuckers aus kleinen Blut- und Urinvolumina, die hier erstmals ihre Anwendung fand, war dabei ein weiterer maßgeblicher Fortschritt zur Bewertung der Ergebnisse [18]. Weitere Experimente unter Mithilfe des kanadischen Biochemiker James B. Collip etablierten eine Kaltextraktion und anschließende Aufreinigung durch Fraktionierung aus Rinder- oder Schweinepankreas mit einem angesäuerten ethanolschen Lösungsmittel. Diese Technik erlaubte erstmals die Produktion von Insulin in einem Maßstab, der zur umfassenden Behandlung von Diabetikern

eingesetzt werden konnte, und in den folgenden Jahren wurde die pharmazeutische Produktion des Medikaments von der amerikanischen Firma Eli Lilly übernommen und weiter verbessert [1]. Bis heute wurden durch intensive chemische, physiologische und pharmakologische Forschungen viele bedeutende Erkenntnisse für die Peptid- bzw. Proteinchemie mit Insulin als Vorreiter etabliert:

- erstmalige wirkungsvolle Anreicherung durch F. Banting und C. Best (1923) [1]
- erste chemische Formel eines Proteins (1955) [19-21]
- erster Radioimmunoassay für ein Protein-Hormon (1966) [22]
- erste Röntgenstruktur, räumliche Struktur (1966) [23]
- erste chemische Synthese durch H. Zahn (1966) [24]
- erste industrielle Darstellung eines menschlichen Proteins durch Umwandlung eines tierischen Hormons (1979) [25]
- erstes gentechnisch hergestelltes Medikament (1982) [26, 27]

Diese nicht erschöpfende Auflistung macht deutlich, welche Bedeutung Insulin für die pharmazeutische Entwicklung auch weiterer Medikamente auf Proteinbasis hat. Dabei ist retrospektiv zu beachten, dass sich vor allem die chemische Synthese aufgrund der zweikettigen Struktur im Vergleich zu anderen Proteinen als sehr komplex darstellt. Diese konnte erstmals Mitte der sechziger Jahre umgesetzt werden und setzt sich aus über 200 einzelnen Schritten zusammen [24]. Weil eine großtechnische Herstellung des Medikamentes so nicht möglich war, gehört die erstmalige rekombinante Produktion von Insulin 1982 mittels gentechnisch veränderten *Escherichia coli*-Bakterien zu einer weiteren Entwicklung mit wegweisendem Charakter für proteinogene Pharmazeutika [28]. Schließlich wurde 1996 das erste Insulinanaloge mit dem Handelsnamen Insulin Lispro® (Humalog) zugelassen, das in seiner Aminosäuresequenz verändert worden ist und dadurch ein kürzeres Injektion- zu Wirkung-Profil aufweist [29]. Dies führte auch nach Zulassung von weiteren kurz- oder auch langwirkenden Insulinanalogen (Insulin Aspart®, Insulin Glulisine® oder Insulin Glargine®, Insulin Detemir®) zu individuell verbesserten Therapiemöglichkeiten von Diabetikern [30].



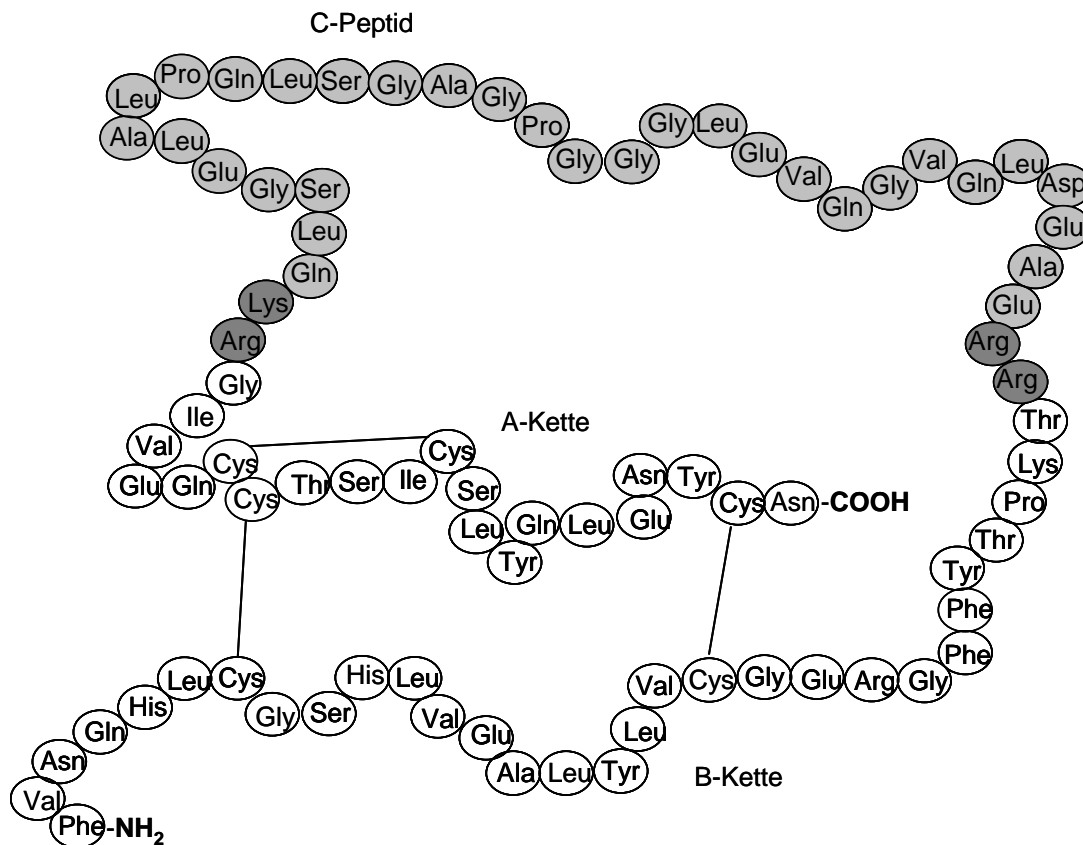
## 2.2 Biochemie von Insulin und C-Peptid

Insulin ist ein Peptid mit einem mittleren Molekulargewicht von 5807 Dalton (Da). Es besteht aus 51 Aminosäuren und zwei Ketten, die über zwei Disulfid-Brücken verbunden sind [31]. Die A-Kette setzt sich aus 21 Aminosäuren, die B-Kette aus 30 Aminosäuren zusammen. Eine dritte Disulfid-Brücke ist innerhalb der A-Kette für die tertiäre Struktur des Moleküls verantwortlich. Der isoelektrische Punkt liegt bei etwa 5,3, und in wässriger Lösung ist es bei pH-Werten zwischen 6 bis 8 praktisch unlöslich. In der Anwesenheit von Zink-Ionen bildet es hexamere Komplexe, wobei für die Tendenz der Oligomerenbildung hauptsächlich der C-Terminus der B-Kette verantwortlich ist [32]. Durch Röntgenstrukturanalyse von Insulinkristallen wurde belegt, dass die A-Kette in der räumlichen Struktur nach außen exponiert ist und somit viele der für die biologische Aktivität entscheidenden Aminosäuresequenzen des Moleküls trägt [33].

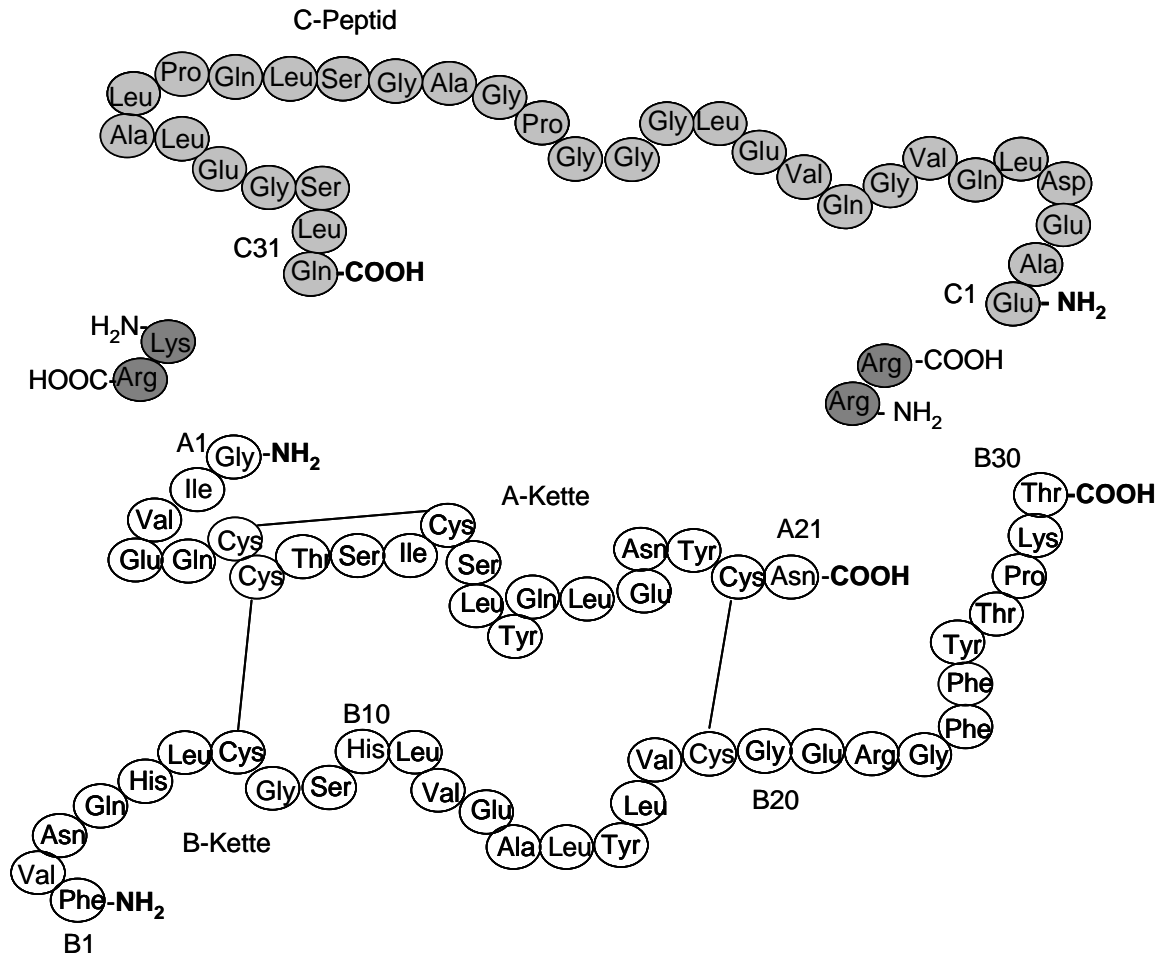
Die Biosynthese von Insulin erfolgt durch Spaltung von Proinsulin, einem einkettigen Vorläufer-Molekül. Es wird in den  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln im endokrinen Teil des Pankreas gebildet. Diese Langerhans'schen Inseln sind kleine homogen im Bauchspeicheldrüsengewebe verteilte Zellaggregate aus verschiedenen differenzierten Zelltypen:  $\alpha$ -Zellen zur Produktion von Glucagon,  $\beta$ -Zellen zur Insulinbiosynthese und  $\gamma$ -Zellen, in denen Somatostatin produziert wird. Die Synthese von Insulin erfolgt am rauhen endoplasmatischen Reticulum der  $\beta$ -Zellen über eine einkettige Vorstufe dem Proinsulin, das sich aus der Insulin B-Kette, dem C-Peptid und der Insulin A-Kette zusammensetzt (siehe Abb. 1). Nach enzymatisch-proteolytischer Abspaltung des C-Peptids am Golgi-Apparat, erfolgt die äquimolare Sekretion von Insulin und C-Peptid in den Blutkreislauf. Das dabei abgespaltene C-Peptid (von „Connecting Peptide“) ist ein Peptidhormon, bestehend aus einer Aminosäurekette mit einem mittleren Molekulargewicht von 3020 Da und einem isoelektrischen Punkt von 2,8. Wie in Abb. 2 zu erkennen, erfolgt die Spaltung unter Verlust von jeweils zwei basischen Aminosäureresten Arginin am N-Terminus und je eines Dipeptids (Lys-Arg) am C-Terminus des C-Peptids. Im  $\beta$ -Zellengranulum erfährt das Molekül dann keine weiteren proteolytischen Prozesse und gelangt zusammen mit Insulin in die Zirkulation [33].

Synthese und Sekretion von Insulin sind streng glukoseinduziert, d.h. abhängig von der Konzentration extrazellulärer Glukose steigt das ATP/ADP-Verhältnis in der Zelle durch metabolische Prozesse und führt somit zur Schließung des ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanals. Hieraus resultiert eine Depolarisation der Zelle und Öffnung des spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanals. Die Erhöhung der Calciumkonzentration in der  $\beta$ -Zelle ist schließlich der Auslöser

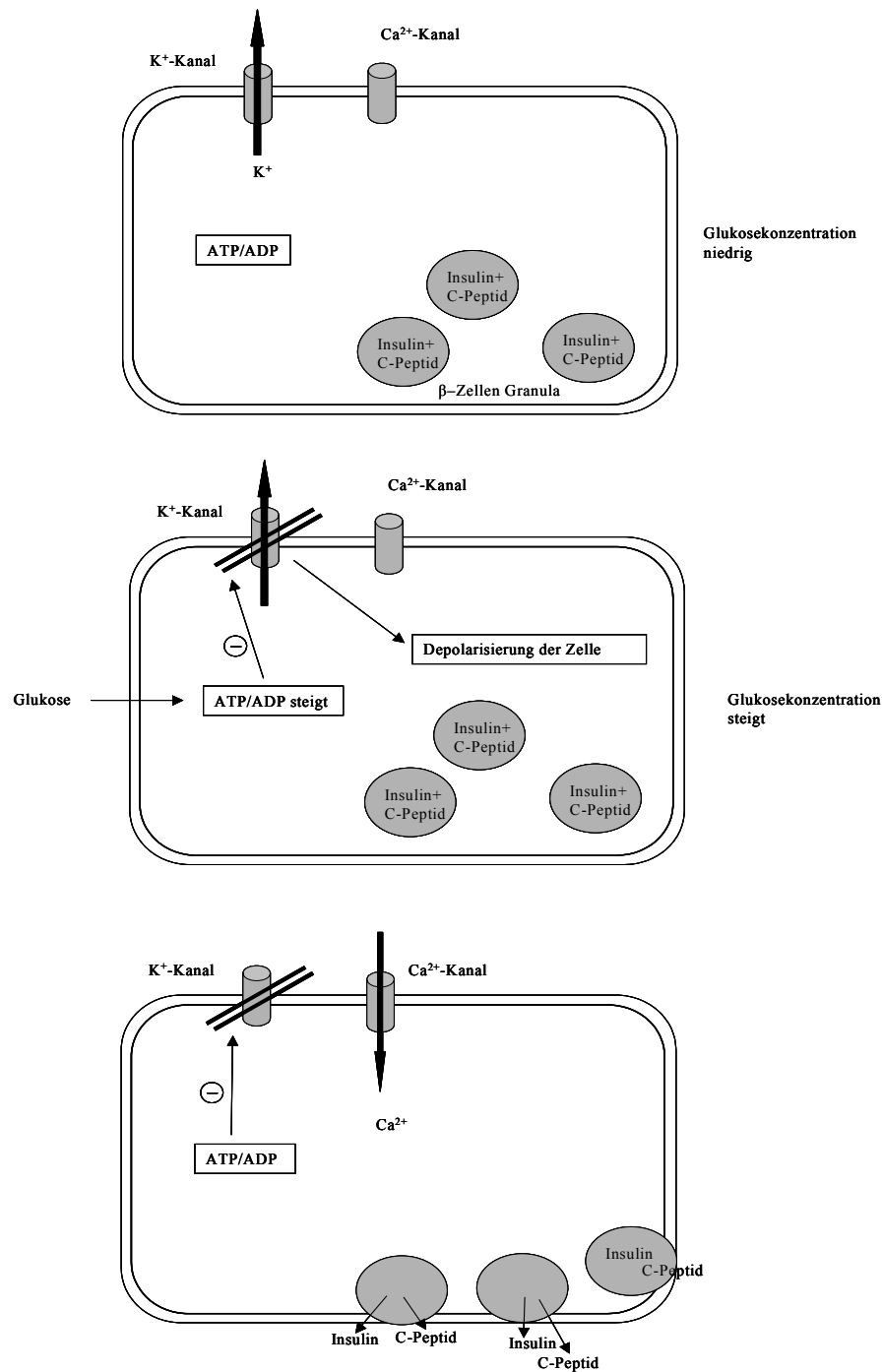
der gesteigerten Insulinsekretion. Der schematische Ablauf dieser Vorgänge ist in Abb. 3 illustriert. Im Gegensatz dazu können Adrenalin, Noradrenalin, Glucagon und auch Insulin selbst eine hemmende oder zumindest regulierende Wirkung auf die Insulinfreisetzung ausüben [33].



**Abb. 1:** Aminosäuresequenz des einkettigen Insulinvorläufers Proinsulin (MW= 9389 Da), bestehend aus C-Peptid (hellgrau), basische Dipeptide (grau) und der A+B-Kette von Insulin (weiß).



**Abb. 2:** Aminosäuresequenzen von C-Peptid (hellgrau), der abgespaltenen Dipeptide (grau) und der A+B-Kette von Insulin (weiß) nach enzymatisch-proteolytischer Spaltung in den Vesikeln der Langerhans- $\beta$ -zellen in der Bauchspeicheldrüse.



**Abb. 3:** Schema zur Sekretion von Insulin und C-Peptid aus den Vesikeln der Langerhans-β-Zellen in der Bauchspeicheldrüse nach Stimulation mit oral aufgenommener Glukose vgl.[33].

### 2.3 Biologische Wirkungen

Das freigesetzte Insulin wirkt in seiner monomeren, bioaktiven Form auf diverse insulinempfindliche Gewebe im Körper. Weil es im Blutkreislauf nur eine sehr kurze Halbwertszeit von wenigen Minuten hat, zeichnen sich die im folgenden beschriebenen Effekte durch eine schnelle Reaktionskinetik aus [34]. Physiologische Insulin-Plasmakonzentrationen für gesunde, nicht adipöse Menschen im nüchternen Zustand schwanken zwischen 0,2 und 0,5 ng/mL als Basalwerte und bis zu 3 ng/mL nach Stimulation mit Glukose [9]. Insulin ist im Körper an einer Vielzahl von enzymatischen Prozessen und metabolischen Vorgängen beteiligt, aber aufgrund der Bedeutung für den Stoffwechsel im Körper sind die Wirkungen in Muskulatur, im Fettgewebe und in der Leber als besonders wichtig anzusehen [35].

Im Bereich des Muskel- und Fettgewebes stimuliert Insulin die in der Zellmembran liegenden Glukosetransporter Glut-4, die insulinabhängig für Aufnahme von Glukose in die Zelle sorgen. Dort erfolgt die Speicherung als Glykogen über Aktivierung des Enzyms Glykogensynthase. Gleichzeitig hemmt Insulin die Freisetzung von Glukose in der Leber durch Inaktivierung des glycogenspaltenden Enzymsystems und der Glukoneogenese. Leberzellen besitzen im Gegensatz zu Muskel- oder Fettzellen Glukosetransporter Glut-2, die insulinunabhängig sind und somit den Glukosetransport in die Zelle auch in Abwesenheit von Insulin sicherstellen. Generell sind die einerseits stimulierenden und andererseits hemmenden Wirkungen dieses Hormons physiologisch gleichermaßen wichtig und nur in Synergie effektiv [2].

Ein ähnliches Schema zeigt sich auch bei den Wirkungen im Protein- und Fettstoffwechsel, wobei einerseits die Aminosäuren- bzw. Fettsäureaufnahme und deren Speicherung im Gewebe stimuliert wird und gleichzeitig die Proteolyse bzw. Lipolyse gehemmt wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Insulin mit den geschilderten Wirkungen auf alle stoffwechselaktiven Gewebe allgemein dafür verantwortlich ist, Nahrungssubstrate (Glukose, Fette und Proteine) aus dem Blutkreislauf zu entfernen und als Reservestoffe zur Verfügung zu stellen. Es wird somit auch als das wichtigste anabole Hormon des Organismus beschrieben [33].

Die folgende Auflistung stellt eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten biologischen Wirkungen im menschlichen Organismus dar:

#### Kohlenhydratstoffwechsel:

- Aufnahme von Glukose in Muskel- und Fettgewebe wird stimuliert

- Glykogenspeicherung durch Aktivierung der Glykogensynthase
- Hemmung des Glykogenabbaus und der Glukoneogenese in der Leber

#### Proteinstoffwechsel:

- Aminosäureaufnahme und Proteinspeicherung im Muskel wird gesteigert
- Proteolyse wird gehemmt (antikatabole Wirkung)

#### Fettstoffwechsel:

- Steigerung der Fettsäureaufnahme und der Triglyceridspeicherung im Fettgewebe
- Hemmung der Lipolyse

Ganz im Gegensatz dazu ist die biologische Wirkung des C-Peptids im menschlichen Organismus nach Spaltung und Sekretion bisher nicht so umfangreich untersucht und wird kontrovers diskutiert [36]. Es existieren Hinweise über eine anabole Wirkung, die aber bisher nur bei Tieren gezeigt werden konnte [37]. Weiterhin sind spezifische Rezeptoren an Zelloberflächen entdeckt worden, die nach Stimulation eine Vielzahl von enzymatischen Prozessen in der Zelle aktivieren [38]. Demgegenüber stehen auch Untersuchungen, die eine komplette biologische Inaktivität des Peptids formulieren [39].

### 2.4 Pharmakologische Wirkungen von Humaninsulin und synthetischen Insulinanaloga

Ziel einer optimalen Insulintherapie bei *Diabetes mellitus* ist es, die Kontrolle des Glukosestoffwechsels im Plasma bei endogener Hormonsekretion möglichst ideal zu simulieren. Normal wirkendes rekombinantes Humaninsulin liegt in der pharmazeutischen Formulierung insbesondere in Anwesenheit von  $Zn^{2+}$ -Ionen als hexamer-koordinierter Komplex assoziiert vor. Nach Injektion ins subkutane Fettgewebe dissoziiert dieser Komplex zunächst über eine dimere zur monomeren Form, die so in die Blutzirkulation gelangt und zu den einzelnen Organen und Geweben transportiert werden kann [29, 40]. Der Zeitraum zwischen Injektion, Dissoziation und Wirkung wird als sogenannte „lag-phase“ bezeichnet. Zur besseren Kontrolle dieses Injektion-Wirkungs-Profiles sind synthetische Insulinanaloga entwickelt worden, die insbesondere am C-terminalen Ende der B-Kette chemisch modifiziert wurden.

Streng genommen begannen bereits in den 20er Jahren die ersten Therapien mit Insulinanalogen mit der Verwendung von Rinder- oder Schweineinsulin. Heutzutage haben

diese tierischen Insuline kaum noch kommerzielle Bedeutung und wurden weitgehend von rekombinant hergestellten Produkten abgelöst [41].

Das erste zugelassene synthetische Analoge auf dem Markt war 1997 das schnellwirkende Insulin Lispro (Humalog, Elli Lilly), das sich in seiner Aminosäuresequenz von Humaninsulin lediglich durch einen Stellungstausch der Aminosäuren Prolin und Lysin an Position B28/29 unterscheidet und somit dieselbe molekulare Masse (5807 Da, Abb. 4) besitzt [42, 43]. Diese Veränderung am C-Terminus der B-Kette vermindert die Tendenz der Hexamerenbildung nach subkutaner Injektion, so dass die bioaktive monomere Form des Insulinanalogens schnell ins Blut gelangen kann [43]. Dies ermöglicht es dem Patienten unmittelbar vor oder sogar während der Mahlzeit die erforderlichen Insulineinheiten zu injizieren, denn die maximale Plasmakonzentration ist bereits nach 30 Minuten erreicht, und nach 2-3 h ist Lispro im Plasma nicht mehr nachweisbar [44].

Ein weiteres schnell wirkendes Analoges ist Insulin Aspart (Novolog, Novo Nordisk), das durch den Austausch des Aminosäurerestes Prolin durch Asparaginsäure an Position B28 ebenfalls am C-Terminus der B-Kette modifiziert ist. Hieraus ergibt sich eine molekulare Masse von 5826 Da, die sich um 18 Da von Humaninsulin unterscheidet (Abb. 4). Das Wirkungsprofil ist wie bei Humalog, bei verminderter Tendenz zur Hexamerenbildung, deutlich verkürzt und in der klinischen Anwendung unterscheiden sich beide Analoga daher nicht [40].

Beim zur Zeit jüngsten zugelassenen schnellwirkenden Insulin Glulisine (Apidra, Aventis Pharma) ist die B-Kette des Moleküls neben einem Austausch an Position B29 von Lysin durch Glutaminsäure, auch N-terminal an Position B3 verändert worden, indem die Aminosäure Asparagin durch Lysin ersetzt worden ist (Abb. 4). Das sich hieraus ergebende Molekulargewicht beträgt 5823 Da und ist gegenüber Humaninsulin somit um 16 Da erhöht [45, 46].

Für eine effiziente Therapie mit Insulin ist es nun aber sinnvoll auch für eine stetige und gleichbleibende Zufuhr von Insulin über den Tag und auch während der Nacht zu sorgen. Dies kann über Tag durch mehrmalige Injektion eines intermediär wirkenden rekombinanten Humaninsulinpräparates erzielt werden, wobei nachts keine optimale Therapie gewährleistet ist. Die Entwicklung von langwirkenden Verzögerungsinsulinen (sog. Basisinsuline) konnte diese Lücke schließen, indem sie für eine basale Supplementierung über bis zu 24 h sorgen. Prinzipiell kann man zwischen zwei Ansätzen bei der Entwicklung von Basis-Insulinen unterscheiden. Einerseits werden rekombinante Humaninsulin-Präparate mit Additiven

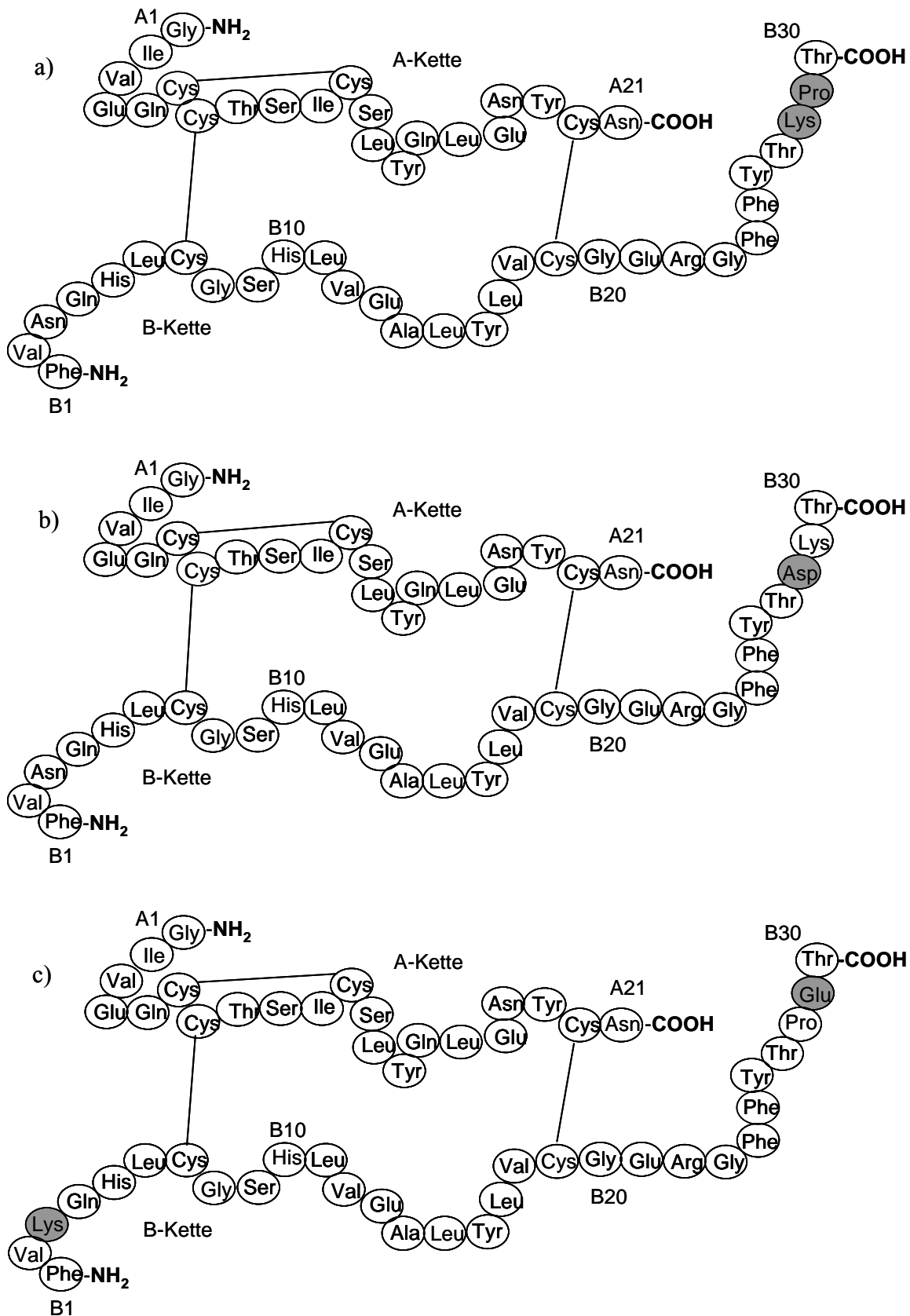
versetzt, die die Freisetzung des aktiven Hormons verzögern, die andere Variante ist wiederum die chemische Modifikation der Aminosäuresequenz.

Als Beispiel für die erste Variante ist das weit verbreitete intermediär- bis lang wirkende Neutral-Protamin-Hagedorn (NPH) Insulin zu nennen, welches als Suspension injiziert wird und bei dem die Freisetzung des Humaninsulins im subkutanen Fettgewebe durch Bindung an Protamin verzögert wird. Es bildet nach etwa 4-6 h ein Konzentrationsmaximum im Blut und verliert dann sehr schnell seine Wirksamkeit [47, 48]. Weiterhin beeinflusst auch die Konzentration der  $Zn^{2+}$ -Ionen die Stabilität der Hexamere und damit die Bioverfügbarkeit, wodurch bei Ultralente-Präparaten (rekombinantes Humaninsulin, Novo Nordisk) ein stark verzögertes Wirkungsprofil erreicht wird [49].

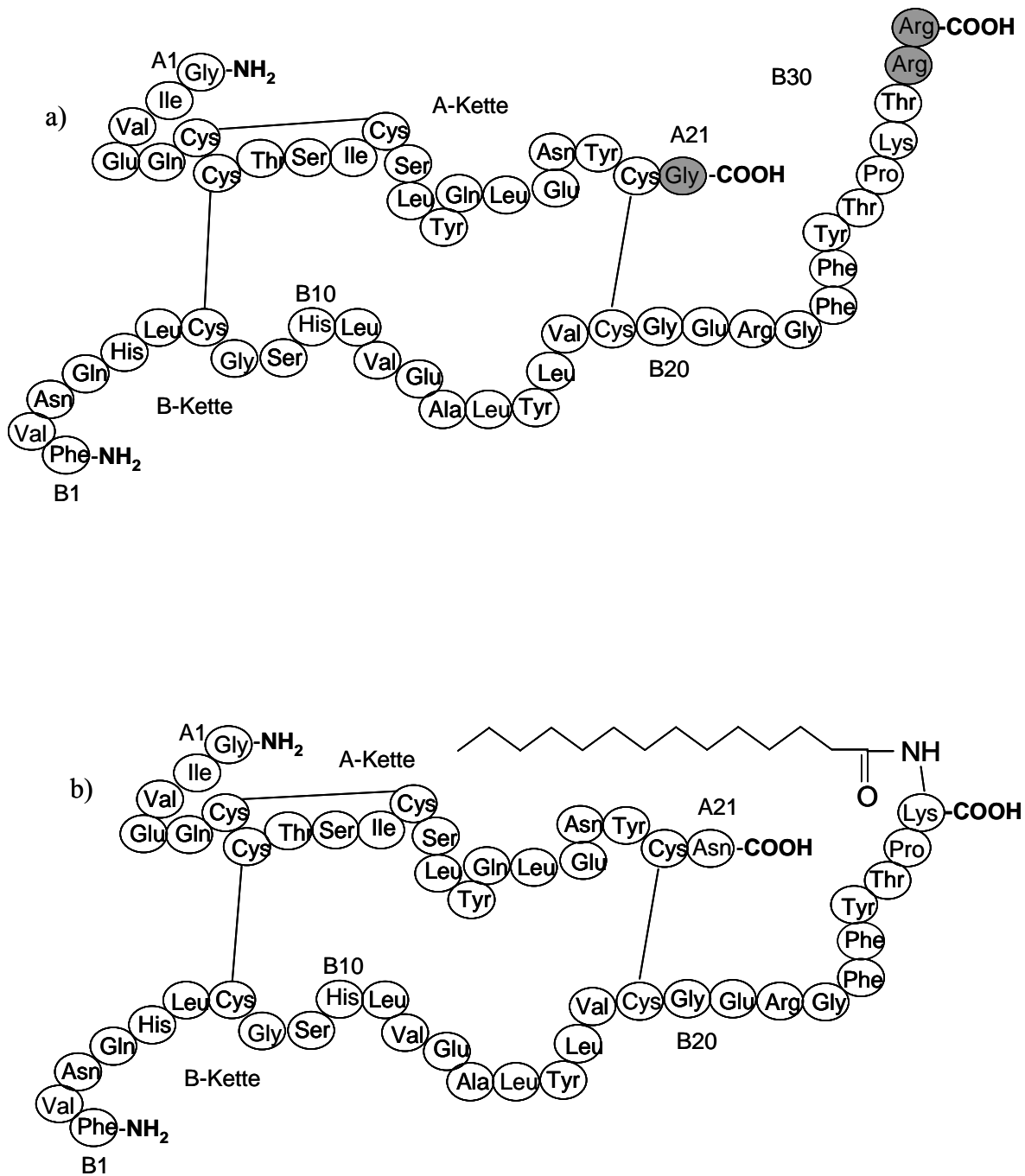
Eine Wirkdauer von über 12 h besitzt das langwirkende Analoge Insulin Glargine (Lantus, Novo Nordisk). Es unterscheidet sich vom Humaninsulin durch zwei zusätzliche Aminosäuren Arginin am C-terminalen Ende der B-Kette B31+32 und am C-Terminus der A-Kette ist an Position A21 Asparagin durch Glycin ersetzt worden (Abb. 5). Die molekulare Masse erhöht sich somit auf 6063 Da und durch die Einführung der zwei basischen Aminosäuren Arginin lässt sich eine Strukturähnlichkeit zum Spaltprodukt von Proinsulin erkennen (siehe Abb. 2). Weiterhin verschiebt sich der isoelektrische Punkt des Peptids von 5,3 für Humaninsulin auf 6,7 für Insulin Glargine. Als Folge dessen kommt es zu einer lokalen Präzipitation an der Injektionsstelle durch die verminderte Löslichkeit bei neutralen physiologischen pH-Werten. Somit löst sich das Insulinanaloge nur verzögert und gelangt in das umliegende Gewebe [48, 50, 51]

Ein weiteres langwirkendes Insulinanaloges ist Insulin Detemir (Levemir, Aventis, Abb. 5). Chemisch handelt es sich um ein Tetradecanoyl-( $^{\epsilon}$ N)-DesB30 Humaninsulin-Derivat, d.h. an Position B29 ist die  $\epsilon$ -Aminofunktion des Lysins über eine Acylierungsreaktion mit einer  $C_{14}$ -Fettsäure (Myristinsäure) kovalent gebunden und die Aminosäure Threonin an Position B30 fehlt [52]. Aufgrund dieser Modifikation besitzt Insulin Detemir eine deutlich verlängerte „lag-phase“, die durch Kombination aus verlangsamter Dissoziation der Hexamere im subkutanen Gewebe und einer hohen Affinität zu Albumin im Blut hervorgerufen wird [53]. Die Albuminaffinität führt zu einem Anteil von nicht mehr als 1 % an freiem und damit aktiven Insulin Detemir im Blut, die an den zellständigen Rezeptoren binden können. Die blutzuckersenkende Wirkung ist über 20 h nachweisbar, die molare Potenz ist jedoch im Vergleich zu Humaninsulin um das 4-5 fache geringer, wobei es für dieses Phänomen bisher keine wissenschaftlich abgesicherte Begründung gibt [48, 52, 54-57]. Die molekulare Masse beträgt 5917 Da.





**Abb. 4:** Aminosäuresequenzen von a) Insulin Lispro (Humalog), b) Insulin Aspart (Novolog) und c) Insulin Glulisine (Apidra). Modifikationen sind grau gekennzeichnet (vgl. Abb 2).



**Abb. 5:** Aminosäuresequenzen von a) Insulin Glargine (Lantus) und b) Insulin Detemir (Levemir). Modifikationen sind grau gekennzeichnet.

## 2.5 Mißbrauch von Insulin als Dopingsubstanz

Wie bereits beschrieben hat Insulin eine lange medizinische und pharmazeutische Geschichte und nimmt in diesem Bereich eine wichtige Vorreiterrolle ein. Im Gegensatz dazu scheint der Missbrauch von Insulin als Dopingsubstanz eine vergleichsweise kurze Vergangenheit zu haben. Das Internationale Olympische Komitee (IOC) wurde erstmals 1998 bei den Olympischen Winterspielen in Nagano auf die potentiell leistungssteigernde Substanzklasse aufmerksam, als ein russischer Sportmediziner anfragte, ob die Anwendung von Insulin für Sportler limitiert ist, die an *Diabetes mellitus* leiden. Als Folge dessen wurde es 1999 vom IOC auf die Liste der im Sport verbotenen Substanzen gesetzt, mit therapeutischen Ausnahmen für Athleten, die nachweislich an insulinpflichtigem Diabetes erkrankt sind [2]. Die daraufhin initiierten Untersuchungen in England bestätigten die Relevanz des Mißbrauchs insbesondere im Kraft- oder Ausdauersport und auch die wissenschaftliche Literatur schildert den Gebrauch seither regelmäßig anhand von Fallbeispielen [3-8, 58]. Dabei ist die leistungssteigernde Wirkung durchaus wissenschaftlich nicht eindeutig geklärt und wird weiterhin kontrovers diskutiert [59, 60]. Auch die möglichen Gefahren einer lebensbedrohlichen Hypoglykämie nach subkutaner Anwendung am gesunden Menschen, scheinen die Sportler nicht abzuschrecken. Die erhofften Wirkungen sind zum einen ein antikataboler Effekt (Hemmung der Proteolyse, s. Kap. 2.3) bei gleichzeitiger Applikation eines steroidalen Anabolikums (z.B. Testosteron) und zum anderen die schnellere Rehabilitation nach dem Wettkampf durch Wiederherstellung der Energiereserven durch gesteigerte Glykogeneinlagerung im Muskel [2, 61-64].

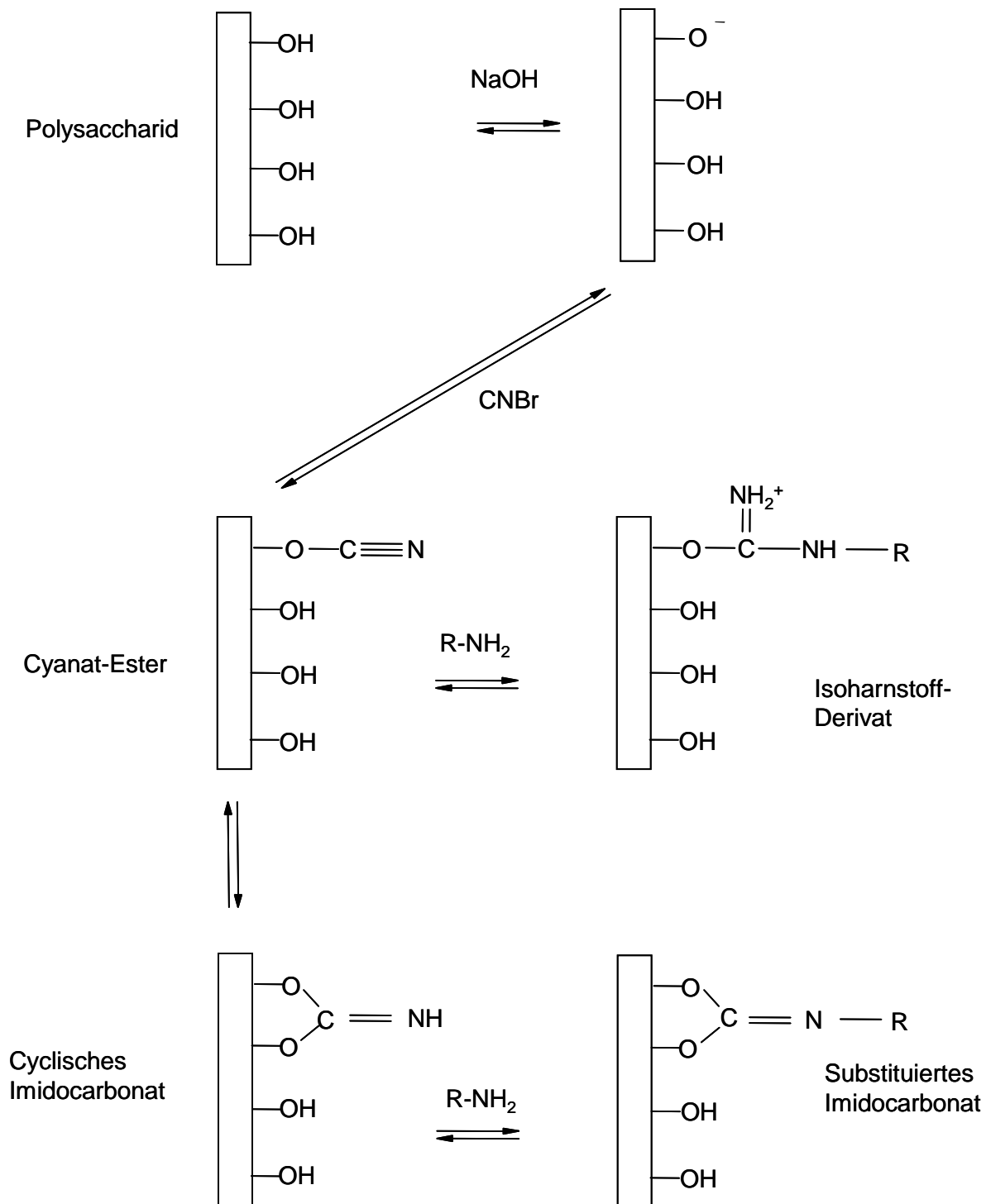
Ein weiterer Aspekt, der eine mögliche Anwendung von Insulin als Dopingmittel unterstützt, ist die Tatsache, dass die gleiche Menge an oral zugeführter Glukose immer zu höheren Plasma-Insulinspiegeln führt, als intravenös verabreichte Glukose [65]. Begründet werden kann dieses Phänomen damit, dass die Insulinsekretion zusätzlich zur Glukosekonzentration auch durch Enterohormone (Inkretine), wie z.B. das gastrische inhibitorische Peptid, stimuliert wird [33]. Der Effekt einer ebenfalls verbotenen, intravenösen Gabe von Glukose, wie sie nach schweren Belastungen im Sport bekannt sind, kann also durch eine zusätzliche Applikation von Insulin gesteigert werden [66, 67].

Ungeachtet dessen gab es keine analytische Methode die verbotenen Verwendung von Insulin im Hochleistungssport eindeutig nachzuweisen, denn die bestehenden Verfahren besitzen keine ausreichende Empfindlichkeit oder Spezifität (siehe Kap.: 2.7).

## 2.6 Immunoaffinitäts-Chromatographie

Die Immunoaffinitäts-Chromatographie (IAC) ist eine spezielle Form der Flüssigkeits-Chromatographie, die sich eine Antigen-Antikörper-Reaktion zur Isolierung von Substanzen aus komplexer Matrix zu Nutze macht. Diese hochspezifische Art der Probenvorbereitung wird meist dann angewendet, wenn die Konzentration der Analyten im Probenmaterial sehr niedrig ist und die Reinheit nach Aufarbeitung möglichst hoch sein soll [68]. Die IAC stellt von allen Arten der Affinitäts-Chromatographie (Boronat-, Lectin-AC u.v.m.) die größte und vielfältigste Gruppe dar und kann mit der hohen Effektivität der Antikörper sowie deren gezielter Produktion für eine große Vielfalt von Analyten begründet werden [69].

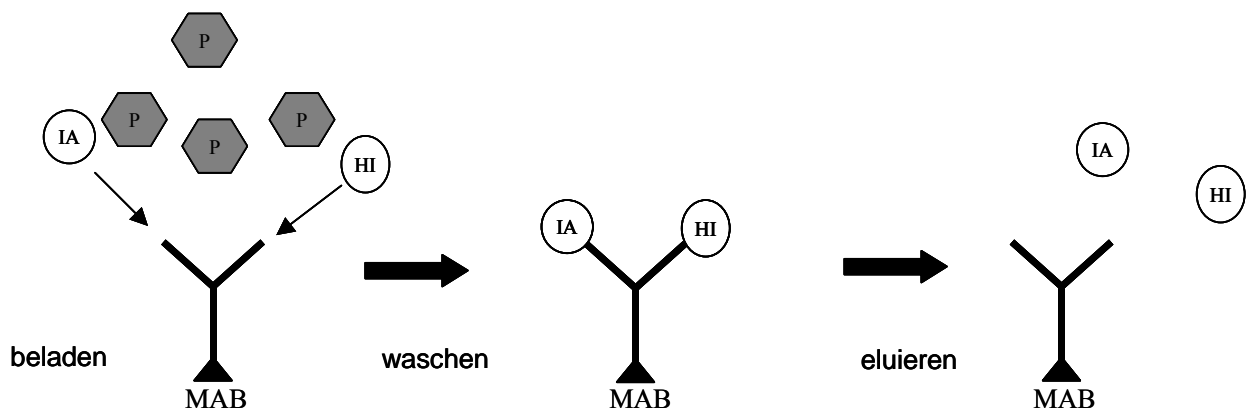
Üblicherweise enthält die stationäre Phase bei der IAC den Antikörper immobilisiert an einer Matrix. Als Trägermaterialien werden natürliche Polysaccharide (Agarose, Cellulose, o.ä.) oder synthetische Matrices (Acrylamide, Polystyrene, o.ä.) genutzt, die vor der Immobilisierung durch chemische Aktivierung (z.B. mit Cyanobromid CNBr) befähigt werden, eine kovalente Bindung zum Antikörper zu bilden und diesen irreversibel an das Trägermaterial zu koppeln. Diese Koppelung kann prinzipiell über mehrere Wege erfolgen, wobei meist freie Amino-Gruppen des Antikörpers mit der aktivierten Trägermaterialoberfläche reagieren. Das so hergestellte IAC-Material kann nun zur Chromatographie genutzt werden. In Abb. 6 ist der Mechanismus der chemischen CNBr-Aktivierung schematisch dargestellt.



**Abb. 6:** Chemischer Mechanismus der Oberflächen-Aktivierung von Matrices auf Polysaccharid-Basis durch Cyanobromid (CNBr) mit anschließender Kopplung von Aminoliganden (R-NH<sub>2</sub>) bei der Herstellung von Trägermaterial mit immobilisierten Antikörpern vgl. [68].

Die Spezifität der IAC wird maßgeblich vom Epitop der verwendeten Antikörper beeinflusst, d. h. es werden alle Substanzen isoliert, die einen stabilen Antigen-Antikörper-Komplex (AA-Komplex) ausbilden können (sogenannte Haptene). Ungewollte Kreuzreaktionen mit strukturähnlichen Analyten (z.B. Abbauprodukte, Strukturanaloga, etc.) sind dabei nicht auszuschließen und bei der weiteren Aufarbeitung zu beachten [70]. Die individuellen Bedingungen (Puffersysteme, pH-Wert, Temperatur, Zeit), bei denen es zur Bildung des AA-Komplexes kommt, sind je nach Analyt sehr unterschiedlich und müssen jeweils substanzspezifisch optimiert werden. Unter optimalen Bindungs-Bedingungen bildet sich ein stabiler, aber reversibler AA-Komplex und unspezifische Interaktionen, z. B. mit dem Trägermaterial, werden verhindert. Ähnliches gilt für eine effiziente Wasch- und Eluierungsprozedur, die sich einerseits durch niedrige Verluste beim Waschen und andererseits durch eine vollständige Auflösung des AA-Komplexes mit wenig Elutionsmittel auszeichnen sollte (Abb.7) [68].

Eine solche Probenvorbereitung stellt eine hoch effiziente Isolierungsmöglichkeit der zu bestimmenden Substanzen dar, doch unter Berücksichtigung von Kreuzreaktionen bietet erst die Kombination mit selektiven Bestimmungsverfahren (z.B. LC-MS/MS) eine ausreichend gute Spezifität [70].



**Abb. 7:** Prinzip der Immunoaffinitäts-Chromatographie mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern (MAB); P= Plasmaproteine, IA = Insulinanaloga, HI = Humaninsulin.

## 2.7 Bestimmung von Insulin und C-Peptid

Vor der Etablierung von Methoden zur direkten Bestimmung von Insulin wurde die Glukosekonzentration im Blut gemessen und als diagnostisches Mittel zur Therapie von *Diabetes mellitus* genutzt. Erst 1959 wurde das erste Verfahren zur immunologischen Bestimmung von Insulin im Plasma vorgestellt [71, 72]. Diese Methoden basierten auf Radioimmunoassays (RIA) und waren schon ausreichend empfindlich (LOD:  $\sim 2$  IU/L = 72 pg/mL), wiesen jedoch durch Verwendung von polyklonalen Antiseren zahlreiche ungewollte Kreuzreaktionen mit Proinsulin und Insulin-Abbauprodukten auf. Dieser Mangel konnte erst Ende der 80er Jahre durch die Einführung von monoklonalen Antikörpern und der zweiseitigen „Sandwich“-Technik behoben werden und führte zu sehr spezifischen und empfindlichen Nachweismethoden (LOD:  $< 1$  IU/L =  $< 36$  pg/mL), die im Prinzip bis heute in der klinischen Routinediagnostik verwendet werden [73, 74]. Speziell für pharmakokinetische Studien oder zu Forschungszwecken wurden Immunoassays entwickelt, mit denen jeweils spezifisch einzelne Insulinanaloga nachgewiesen werden können [75, 76]. Kreuzreaktionen mit Humaninsulin, Abbauprodukten, Vorstufen oder anderen Insulinanalogen sind hierbei jedoch prinzipiell möglich und können die Ergebnissicherheit entscheidend beeinträchtigen [10, 77].

Neben diesen immunologischen Methoden wurden auch flüssigkeitschromatographische und kapillarelektrophoretische Verfahren entwickelt, die einerseits als qualitätssichernde Untersuchungen von pharmazeutischen Insulinprodukten und andererseits zur Kreuz-Validierung von Immuno-Assays für Plasmaproben herangezogen worden sind [78]. Hierbei verwenden einige Methoden flüssigkeitschromatographische Trennungen mit anschließender UV-Detektion [79-83] und jüngere Applikationen die Kopplung an einen hochspezifischen massenselektiven Detektor [80, 84-86]. Die individuellen Probenvorbereitungen und Nachweisgrenzen sind dabei sehr unterschiedlich und stark vom Untersuchungsmaterial abhängig.

Schon bald nach Einführung der ersten Methoden zur Insulinbestimmung wurden auch immunologische Verfahren zum Nachweis von C-Peptid entwickelt [87].

Dabei ist die Bestimmung von Insulin und C-Peptid im Plasma als diagnostisches Mittel aufgrund der äquimolaren Sekretion gleichwertig und gegeneinander austauschbar. Die Insulinbestimmung wird jedoch oft bevorzugt, weil die kommerziell erhältlichen Immuno-Assays für Insulin im Plasma empfindlicher, genauer und preiswerter sind [9]. Bei der Untersuchung von Urinproben zur Beurteilung der  $\beta$ -Zellen-Funktion wird hingegen

ausschließlich die C-Peptidkonzentration bestimmt, da diese im Gegensatz zu Insulin weder in der Leber noch in der Niere von Abbauprozessen beeinflusst wird [88]. Neben immunologischen Verfahren wurden auch flüssigkeitschromatographische Methoden mit massenspektrometrischer Detektion entwickelt, die einerseits in der Routinediagnostik andererseits zur Überprüfung immunologischer Verfahren eingesetzt werden [84, 85, 88-92]. Zusätzlich zu diesen klinischen Diagnosemöglichkeiten wird die Bestimmung des C-Peptid-Insulin-Verhältnisses im Serum auch bei forensischen Untersuchungen genutzt, um im Verdachtsfall eine Injektion von Insulin und somit den Tod durch Hypoglykämie aufzudecken [93-96].

## 2.8 Massenspektrometrische Charakterisierung von Peptiden

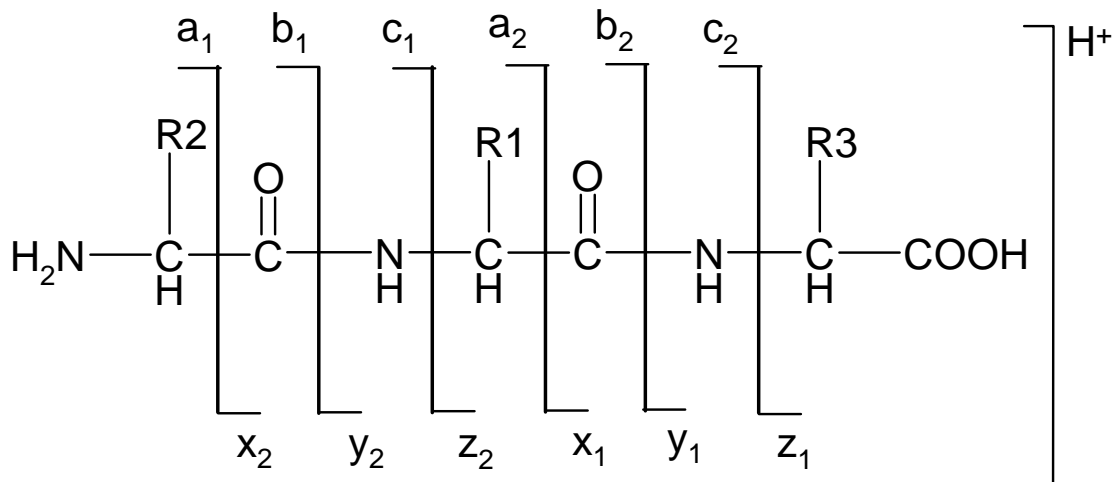
Die Anfänge der massenspektrometrischen Peptidanalytik begannen in den 80 er Jahren mit Einführung der ersten „sanften“ Ionisierungsverfahren, wobei biologisch relevante Moleküle mit Hilfe von Fast Atom Bombardment (FAB) ionisiert werden konnten [97]. Hierbei werden in einer Matrix (Glycerin o. ä.) gelöste Substanzen mit Edelgasatomen bombardiert und als Quasimolekülonen ( $H^+$ - o.  $Na^+$ -Addukte) in die Gasphase gebracht. Diese Ionisierungstechnik fand jedoch keine breite Anwendung und wurde allmählich von Elektrospray-Ionisation (ESI) und Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) abgelöst, die als entscheidende Entwicklungen in der Analytik von Peptiden und Proteinen angesehen werden können [98, 99]. ESI- und MALDI-Ionenquellen gekoppelt an ein Tandem-Massenspektrometer (Triple-Quadrupol-, Ion-Trap- oder QTOF-Instrumente) sind die heute am weitest verbreitetsten Analysetechniken auf diesem Sektor und ermöglichen eine Vielzahl unterschiedlichster Applikationen (Bestimmungen der molekularen Masse, Aminosäuresequenz, post-translationale Modifikationen, Strukturaufklärung u.v.m.) [99-101]. Beim MALDI-Verfahren werden protonierte Ionen durch gepulsten Laser-Beschuß aus einer Matrix (z.B. Nicotinsäure, Dihydroxybenzoesäure oder  $\alpha$ -Cyano-Hydroxyzimtsäure), in der sich die Analyten befinden, erzeugt. Es entstehen dabei meist einfachgeladene Molekülonen, wobei ein Massenbereich von über hunderttausend Da zugänglich wird. Dieses Verfahren ist zumeist attraktiver für Anwendungen ohne störende biologische Matrixeffekte, obwohl auch die Kopplung an ein flüssigkeitschromatographisches System (LC) in einigen Systemen realisiert worden ist. Es handelt sich jedoch nicht um eine wirklich kontinuierliche online



Kopplung, weil die Segmentierung des Zeitprofils ein diskontinuierlicher Prozess bleibt [99, 102].

Die LC-Kopplung war für ESI-MS/MS-Verfahren von Beginn möglich und macht diese Technik der sanften Ionisierung sehr vielseitig einsetzbar. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld durch Anlegen einer Spannung an einer Kapillare (aus Stahl oder beschichtete Fused-Silica) erzeugt, an der sie unter Atmosphärendruck versprüht werden. Kleine geladenen Tröpfchen bilden einen Spray-Konus (Taylor-Cone) am Ende der Kapillare, in dem sich positive oder negative Ionen entsprechend der Feldrichtung ansammeln [103]. Durch Verdampfen des Lösungsmittels werden diese Tröpfchen immer kleiner und nach Erreichen des sogenannten kritischen Radius (Rayleigh-Limit) können die geladenen Ionen in die Gasphase übergehen. Diese Ionen sind im Peptid- und Proteinbereich meist mehrfach geladen und können abhängig von der Größe und der Polarität des Moleküls bis zu 100 Ladungen tragen [98]. Unter Berücksichtigung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses erhält man bei Molekülen mit einer Masse von  $m = 100000$  Da und einer Anzahl an Ladungen von  $z = 100$  ein Quasi-Molekülgewicht von  $m/z = 1000$ .

Nach der Ionisierung werden die erzeugten Ionen entsprechend ihrer Feldrichtung über ein Spannungsgefälle von der Ionenquelle (Atmosphärendruck) über ein Interface (Vakuum) in das Massenspektrometer (Hochvakuum) geleitet. Dort erfolgt die Massenselektion meist mit Hilfe eines Quadrupols, einer Ionenfalle oder eines Flugrohres (Time-Of-Flight, TOF), bevor die Ionen schließlich auf einem Photomultiplier detektiert werden. Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) bieten vor der Detektion die Möglichkeit von zusätzlichen Fragmentierungsexperimenten durch kontrollierte Stöße der Molekülionen mit einem Kollisionsgas im Massenspektrometer (Collision Induced Dissoziation, CID) [99]. Die hieraus resultierenden Produkt-Ionen ermöglichen eine detaillierte Charakterisierung der zu analysierenden Peptide oder Proteine [104]. Die dabei entstehenden Fragmente lassen sich anhand ihrer Fragmentierungsstelle im Peptidgerüst klassifizieren und über eine vereinfachende Nomenklatur beschreiben (Abb. 8) [97, 105]. Dabei ist hauptsächlich die Ionisierungsmethode (MALDI, ESI, FAB usw.) verantwortlich für die Art (x/a-, y/b- oder z/c-Ionen) der im Spektrum auftretenden Fragmentationen. Desweiteren kann es auch zu Derivaten dieser Ionen durch Abspaltung von Wasser, Ammoniak oder Kohlenmonoxid (z.B. y-H<sub>2</sub>O, b-NH<sub>3</sub> etc.) kommen, welches in der Regel durch die jeweiligen Aminosäurereste (R) beeinflusst wird.



**Abb. 8:** Schematischer Aufbau der Peptidbindung und Definition der Spaltungsstellen zur vereinfachten Nomenklatur von Peptid-Fragmentionen (positiv) nach kollisionsinduzierten MS/MS-Experimenten [105].

Die oben genannten Entwicklungen fanden auch zeitnah Anwendung in der massenspektrometrischen Untersuchung von Insulin. So wurden erste Strukturaufklärungen von Insulinabbauprodukten nach enzymatischer Spaltung mit Hilfe von FAB-MS und offline Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) bereits Ende der 80er Jahre erfolgreich durchgeführt [106, 107]. Es folgten Studien verschiedener ESI-MS-Strategien mit positiven und negativen Ionisierungsbedingungen unter Einbezug mehrerer Ladungszustände von Insulin-Referenzmaterial, wodurch die Möglichkeit der Peptid-Identifizierung mit Hilfe von Tandem-Massenspektrometrie und charakteristischen Produktionen demonstriert wurde [99]. Parallel dazu wurden erste Anwendungen für die Bestimmung von Insulin in Plasmaproben mittels ESI-MS nach HPLC-Trennung entwickelt, wobei sich Art und Aufwand der Probenvorbereitung zum Teil erheblich unterscheiden [84, 85]. Weiterhin gab es Ansätze die flüssigkeitschromatographische Trennung durch kapillarelektrophoretische Verfahren zu ersetzen und mit ESI-MS zu koppeln, welches zumindest bei Verwendung von Referenzmaterial ohne Matrix gelungen ist [78].

Der Einsatz von HPLC-ESI-MS für die Bestimmung von C-Peptid ist besonders für die routinemäßige Untersuchung von Urinproben durch die zu erwartende Konzentration von

etwa 40 ng/mL vergleichsweise einfach, aber auch Methoden zur Bestimmung im Plasma (Konzentration < 1 ng/mL) sind entwickelt worden [36, 84, 88, 90, 108].

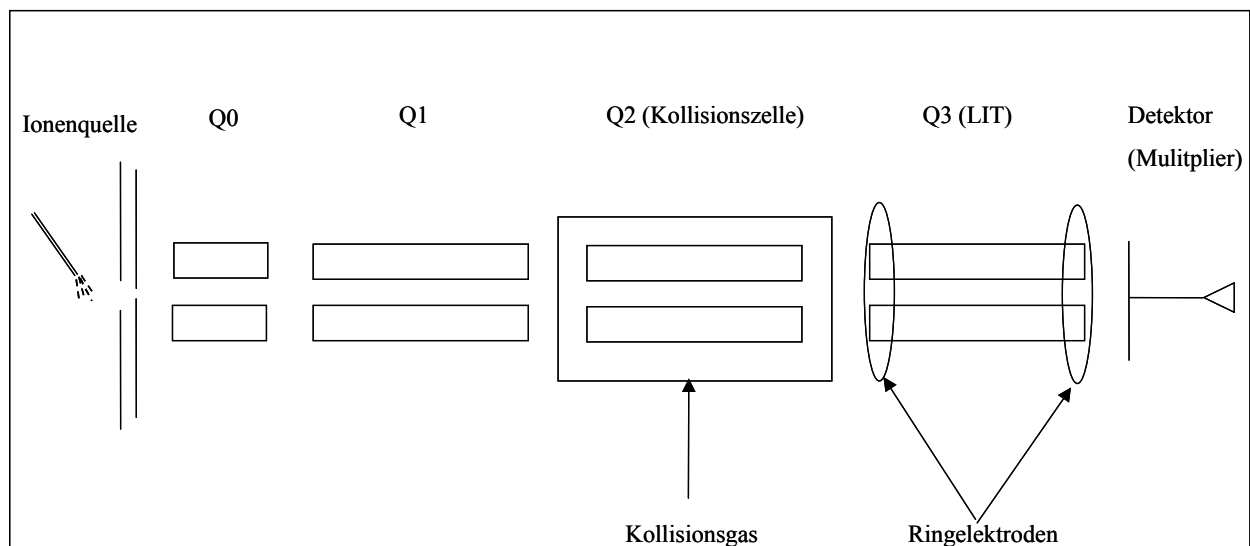
## 2.9 Lineare Ionenfallen (LIT)

Die Möglichkeit der Tandem-Massenspektrometrie zur Generierung von Produktionen wird heute in vielen Massenspektrometern mit Hilfe von drei hintereinandergeschalteten Quadrupolen (Triple-Quad) oder einer 3-dimensionalen Ionenfalle (3D-IT, Paul-Fallen) verwirklicht [109]. Triple-Quad-Geräte erreichen die Massenselektion über eine Kombination von überlagerter Radiofrequenz (RF) und Gleichstromspannung in einem zweidimensionalen Quadrupol-Spannungsfeld. Ionen in einem wählbar begrenzten Masse/Ladungs-Fenster werden in diesem Spannungsfeld über die Länge des jeweiligen Quadrupols stabilisiert und können diesen passieren. Diese Art der Massenselektion führt allerdings auch dazu, dass bei der Kombination mehrerer „Single-Ion-Experimente“ hintereinander die meisten Ionen, die in der Ionenquelle erzeugt werden, verlorengehen, weil sie bei den gewählten Selektionskriterien die Quadrupolpassage nicht überstehen können [110]. Im Gegensatz dazu generieren konventionelle 3D-IT ein dreidimensionales Potentialfeld, welches es ermöglicht, Ionen im Inneren gewisse Zeit (einige msec) zu stabilisieren und anschließend je nach Messmodus ein komplettes Massenspektrum zu erhalten. Limitiert wird diese Funktion jedoch durch das relativ kleine Volumen der Falle, was ab einer bestimmten Füllmenge zu unerwünschten Raum-zu-Ladungs-Interferenzen führt und die Effektivität der Stabilisierung auf ca. 1-10 % der erzeugten Ionen in der Falle begrenzt [98, 110].

Lineare Ionenfallen (LIT) stellen eine Kombination dieser Technologien dar und sollen die Vorzüge beider vereinen (Abb. 9). Die ersten LIT wurden schon Ende der 70er Jahre aus Quadrupolen mit Potentialstoppere (Ringelektroden) an den Enden entwickelt, mit denen es gelang  $^3\text{He}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Ionen für mehrere Minuten zu stabilisieren [111]. Die Vorteile einer LIT gegenüber der 3D-IT beruhen hauptsächlich auf der nur zweidimensionalen Ausbreitung des Quadrupol-Spannungsfeldes, so dass die axiale Energie (in z-Ebene) der Ionen in der Falle reduziert wird und sie sich zweidimensional (x,y-Ebene, wie Perlenschnur) in der Mitte des Quadrupols aufreihen. Zusätzlich können durch das größere Volumen einer LIT gleichzeitig mehr Ionen stabilisiert werden als in 3D-Geräten, in denen die Fokussierung punkt- statt

linienförmig stattfindet [110, 111]. Der Austritt der Ionen aus der Falle zur Generierung des Massenspektrums im Detektor kann im Prinzip auf zwei Arten erfolgen: axial (z) oder radial (x bzw. y). Zum radialen Austritt müssen die Quadrupolstäbe an der Austrittsstelle unterbrochen sein, was zu einer Inhomogenität des Spannungsfeldes und zu Verlusten von Ionen führt. Der axiale Austritt ist somit die effizientere Möglichkeit und hat sich dementsprechend auch durchgesetzt [110].

Seit einigen Jahren werden nun Massenspektrometer gebaut, die aus drei hintereinandergeschalteten Quadrupolen bestehen und sowohl als klassische Triple-Quad-Geräte, als auch als Quadrupole mit LIT genutzt werden können (Abb. 9). Im kombinierten Modus kann der erste Quadrupol (Q1) zur Selektion eines Vorläuferions, der zweite Quadrupol (Q2) als Kollisionszelle zur Generierung der Produktionen und der Dritte (Q3) als LIT genutzt werden. Während der Massenanalyse (Scan) in der LIT können die Ionen aus der Ionenquelle vor dem Q1 (am Q0) zusätzlich akkumuliert werden (Q0 trapping), so dass Ionenverluste minimiert und die Empfindlichkeit gesteigert wird. Die weiteren Vorteile dieser Kombination sind ein größerer dynamischer Bereich durch die selektive Füllung der Falle und die Aufnahme von kompletten Massenspektren ohne Diskriminierung von kleinen Massen („low mass cut-off“), weil Selektion, Fragmentierung und Massenanalyse räumlich voneinander getrennt sind [100, 112].



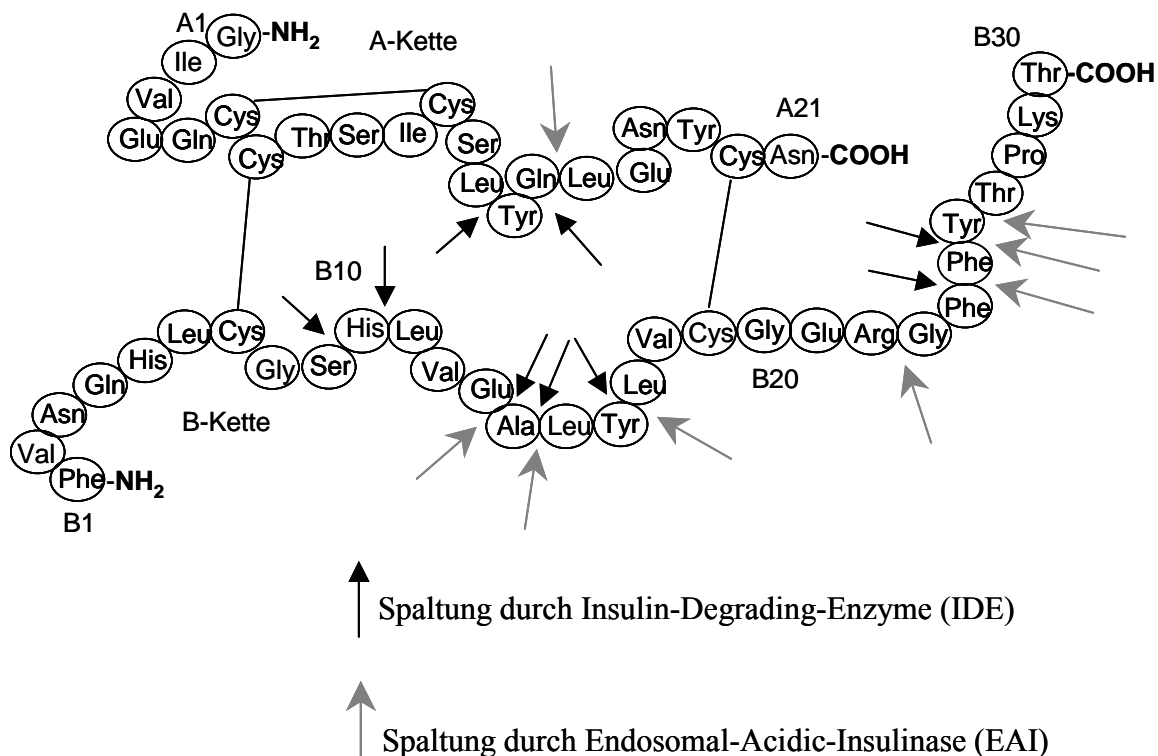
**Abb. 9:** Vereinfachter schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupole-Massenspektrometers mit linearer Ionenfalle (Q3, LIT), zwei Quadrupol-Massenfiltern Q1 bzw. Q2 und einem dritten Quadrupol Q0 zum Fokussieren der Ionen.

## 2.10 Metabolischer Abbau von Insulin

Schon die kurze Halbwertszeit im Plasma und die vielfältigen zellulären Effekte deuten auf einen wirkungsvollen Metabolismus von Insulin im Organismus hin und führten bereits Anfang der 70er Jahre zu ersten Metabolismusstudien. Hierbei wurden bereits wichtige Unterschiede im Abbau von Insulin, C-Peptid und Proinsulin durch Leber und Niere festgestellt, indem die jeweiligen metabolischen Abbau-Raten der drei Peptide im Plasma von Ratten mittels RIA gemessen wurden [113]. Das im Blut zirkulierende Insulin wird bei der ersten Pfortaderpassage („first pass“) zu etwa 50 % durch die Leber als primäres Abbaorgan an Rezeptoren gebunden und in den Zellen teilweise abgebaut [11]. Als Hauptabbaorgan im Organismus wird jedoch die Niere angesehen, die nach Filtration in den Glomeruli und anschließender proximal tubulärer Reabsorption das gefilterte Peptidhormon zu etwa 99 % abbaut und somit nur geringste Mengen intakt ausgeschieden werden [11, 114]. Der Metabolismus kann jedoch generell in allen Zellen von insulinempfindlichen Geweben durch Bindung an den Rezeptor, Internisierung in die Zelle und endosomalem Abbau erfolgen. Dabei spielt das Muskelgewebe nach Leber und Niere die wohl wichtigste Rolle [11].

Die Identifizierung der ersten Abbauprodukte (*in vitro*) erfolgte mit FAB-MS nach Inkubation von nativem bzw.  $^{18}\text{O}$ - und  $^2\text{H}_2$ -markierten Insulinderivaten mit insulinspaltenden Proteasen und anschließender HPLC-Aufreinigung [106, 107]. Unter Verwendung von radioaktiv markiertem  $^{125}\text{I}$ -iodo(A14)- und  $^{125}\text{I}$ -iodo(B26)-Insulin und Perfusion in Rattennieren oder nach Injektion beim Menschen (*in vivo*) konnten weitere Abbauprodukte mittels HPLC und Radioaktivitätsmessung identifiziert werden [114, 115]. Die Aminosäuresequenzen dieser spezifisch durch Enzyme gespaltenen Peptid-Bruchstücke bestätigten sich in folgenden Studien durch Inkubation von Insulin mit Nierenzellen, Leber-Endosomen (Ratten) und Leber-Parenchymzellen mit guter Übereinstimmung. Dabei wurden die Enzyme „Insulin-Degrading-Enzyme (IDE)“ und „Endosomal-Acidic-Insulinase“ (EAI) als maßgeblich am Abbauprozess beteiligt identifiziert [116-118]. IDE spaltet das Insulinmolekül bei teilweise intakten Disulfidbrücken an den Positionen A13/14, A14/15, B9/10, B10/11, B13/14, B14/15, B16/17, B24/25 und B25/26 [11]. Nach Inkubation mit EAI in Leberzellen konnten zusätzlich Peptidspaltungen an den Positionen A15/16, B22/23, B23/24 und die gespaltenen B-Ketten-Bruchstücke B27-30, B26-30 und B25-30 nachgewiesen werden (Abb. 10) [116].

Weiterhin wurden für das langwirkende Insulinanaloge Lantus die zwei Metaboliten A21-Gly-desB30-Thr-Human Insulin und A21-Gly-B31-Arg-Human Insulin mittels MALDI-TOF-MS identifiziert und sowohl an der Injektionsstelle, als auch im Plasma nachgewiesen [51].



**Abb. 10:** Bekannte enzymatische Spaltungsstellen in der Aminosäuresequenz von HI durch IDE (schwarze Pfeile) und EAI (graue Pfeile).

Neben diesen für Insulin spezifischen Abbauprozessen sind auch enzymatische Spaltungen möglich, die prinzipiell bei allen Peptiden und Proteinen vorkommen können. Durch sogenannte Endopeptidasen werden Peptide an einer spezifischen Aminosäure innerhalb der Sequenz gespalten. Demgegenüber spalten Exopeptidasen am N-Terminus (Aminopeptidasen) oder am C-Terminus (Carboxypeptidasen) sequentiell jeweils den endständigen Aminosäurerest unspezifisch ab [33]. So ist beispielsweise die Carboxypeptidase H in den  $\beta$ -Zellgranula der Bauchspeicheldrüse identifiziert worden, die bei der Biosynthese von Insulin für die Abspaltung der basischen Aminosäuren (Arg-Arg) von Proinsulin verantwortlich ist (siehe Abb. 2) [119, 120]. Für diese spezielle Exopeptidase ist jedoch auch bekannt, dass sich der proteolytische Prozess für das bioaktive Hormon nicht fortsetzt und die biologische Wirkung somit nicht weiter beeinflusst wird [120].

### 3. Experimenteller Teil

#### 3.1 Methodenentwicklung Insulin

##### 3.1.1 Massenspektrometrische Charakterisierung von Insulin mittels ESI-MS/MS

Die Massenspektrometrie ist in der Dopinganalytik aufgrund der hohen Spezifität, ihrer Empfindlichkeit und der nötigen Robustheit eine Standardmethode zur Detektion von verbotenen Substanzen. Die Substanzklassen der im Sport verbotenen Mittel sind, wie in der pharmazeutischen Entwicklung allgemein, immer komplexer und mannigfaltiger geworden. Zusätzlich zu den klassischen anabol-wirksamen Stoffen mit Steroidstruktur oder den stimulierend wirkenden Drogen, sind auch sehr viel größere peptidische oder proteinogene Substanzen zur Liste der verbotenen Stoffe hinzugekommen, die eine nachweislich leistungsfördernde Wirkung für den Sportler haben. Im Zuge dessen muss sich auch die Doping-Analytik den Herausforderungen anpassen und stetig neue Detektionsstrategien für diese Substanzen implementieren.

Als erster Schritt zum Nachweis und Charakterisierung einer neuen Substanz mittels Massenspektrometrie wird die prinzipielle Möglichkeit der Detektion anhand von Referenzsubstanzen geprüft. Unter Verwendung von ESI-MS kann dies durch die direkte Injektion (Direkteinlass) der jeweiligen Standardlösung mit einer Spritzenpumpe in das Massenspektrometer erfolgen. Diese Vorgehensweise wurde auch bei der Methodenentwicklung zum Insulinnachweis angewendet, wobei eine Insulin-Standardlösung (10 pmol/ $\mu$ L in Essigsäure (2%) / Acetonitril (50/50; v:v)) über den Direkteinlaß bei 10  $\mu$ L/min im positiven ESI-Modus analysiert wurde. Dabei wurde der dominierende Ladungszustand der mehrfach protonierten Molekülonen von Insulin anhand eines Massenspektrums über den gesamten Massenbereich (100 – 1700 u, ohne Fragmentierung) ermittelt. Das intensivste Quasimolekülion wurde dann in nachfolgenden MS/MS-Experimenten als Vorläuferion in Q1 isoliert, in Q2 durch kontrollierte Stöße mit N<sub>2</sub> fragmentiert und die Produktionen in Q3 (LIT) gesammelt. Die verschiedenen Geräteparameter (Kollisionsenergie CE, *Declustering Potential* DP u.a.) wurden für dieses MS/MS-Experiment optimiert, um die maximale Empfindlichkeit und höchstmögliche Spezifität zu erreichen, und das so generierte Produktionenspektrum kann schließlich zur Identifizierung von Insulin über charakteristische Produktionen genutzt werden. Dem Prinzip

nach wurde dieses Vorgehen für alle Insulinanalogen (Humalog, Novolog, Apidra, Lantus und Levemir) und für Rinderinsulin als potentiellen Internen Standard (IS) wiederholt und sollte die massenspektrometrische Charakterisierung und Unterscheidung der einzelnen Insuline ermöglichen.

### **3.1.2 Standardlösungen**

Die Lagerung und Verdünnungen aller Standardlösungen wurden unter Verwendung von Polypropylen (PP)-Gefäßen (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt, da sich herausgestellt hat, dass die Verluste von Peptiden in Glasgefäßen besonders in niedrigen Konzentrationsbereichen sehr hoch sind. Um auch in PP-Gefäßen die Verluste noch zu minimieren, wurden bei jeder Verdünnung ein Überschuß an IS (siehe auch Kap. 3.1.8) zugegeben, der die aktiven Stellen an der Oberfläche absättigt und die Analyten schützt (Carrier-Effekt). Dieser Effekt des internen Standards spielt bei der Analytik von realen Proben keine entscheidende Rolle, weil die aktiven Stellen der Gefäße durch den großen Überschuß an Matrixbestandteilen inaktiviert werden.

Die Stammlösungen enthalten jeweils 100 pmol/µL der jeweiligen Referenzsubstanz in Essigsäure (2 %) und sind bei 4° C bis zu 8 Wochen stabil. Sie werden am Tag der Probenvorbereitung auf eine Konzentration von 0,01 pmol/µL (Arbeitslösung) mit Essigsäure (2 %) verdünnt. Diese Arbeitslösungen enthalten aus oben genannten Gründen zusätzlich 0,1 pmol/µL IS.

### **3.1.3 Reduktive Spaltung von Insulin**

Die reduktive Spaltung der inter- und intramolekularen Disulfidbrücken wurde mit Hilfe des Reduktionsmittels Tris(carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP-HCl) durchgeführt. Dazu wurden 90 µL der jeweiligen Standardlösung (10 pmol/µL) in Essigsäure (2%) mit 10 µL einer wäßrigen 100 mM TCEP-HCL-Lösung versetzt und 10 min bei 60°C erhitzt. Die Spaltung verläuft vollständig, d. h. es ist kein intaktes Polypeptid mehr nachweisbar und es liegen jeweils nur noch die reduzierten A- und B-Ketten in Lösung vor.



### 3.1.4 Massenspektrometrische Charakterisierung der Insulin B-Ketten

Analog zur Charakterisierung der intakten Insuline werden auch die B-Ketten zunächst über den Direkteinlaß analysiert (5 pmol/ $\mu$ L in Essigsäure (2%) / Acetonitril (50/50, v:v)) und der dominierende Ladungszustand ermittelt. Dieser wird dann ebenfalls als Vorläuferion für weitere MS/MS-Experimente verwendet und zur Generierung von Produktionenspektren herangezogen.

### 3.1.5 Flüssigkeitschromatographische Trennung

Der Einsatz der auf HPLC-basierenden, chromatographischen Trennung der Insuline und die effektive Abtrennung der zu erwartenden Matrixeffekte stellt einen weiteren wichtigen Schritt in der Methodenentwicklung dar. Hierzu wurde auf einem Agilent 1100 Flüssigkeitschromatographen ein Gradientenprogramm mit Laufmittel A (0,1 % Essigsäure und 0,01% Trifluoressigsäure (TFA)) und Laufmittel B (Acetonitril / 0,1 % Essigsäure, 0,01% TFA (80/20, v:v)) auf einer analytischen HPLC-Säule (1 x 50 mm, 3  $\mu$ m Agilent ZORBAX 300SB-C18) entwickelt. Die verwendete HPLC-Säule ist mit einer Porengröße von 300 Å speziell für die Trennung von Peptiden und Proteinen in biologischer Matrix geeignet und der geringe Durchmesser (1,0 mm) soll eine hohe Trennleistung bei sehr niedrigen Flussraten gewährleisten. Eine Vorsäule aus dem gleichem Material soll die analytische Säule vor Matrixbestandteilen schützen.

### 3.1.6 Immunoaffinitäts-Chromatographie (IAC)

Das für die IAC verwendete Anti-Insulin-Gel wurde in den CER-Laboratorien (Marloie, Belgien) hergestellt. Der Antikörper wurde nach CNBr-Aktivierung von Sepharose 4B an deren Oberfläche gekoppelt. Es handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper (MAB) S1, der durch Hybridom-Technologie aus der Milz von immunisierten Mäusen gewonnen wurde und dessen Spezifität gegenüber Humaninsulin, intaktem Proinsulin, Des31,32 Proinsulin und Des64, 65 Proinsulin mittels Radio-Immuno-Titration (RIT) getestet worden ist [121]. Der Isotyp des Immunglobulin G (IgG) von S1 ist IgG1,  $\kappa$  und die Affinität der MABs beträgt  $7,9 \times 10^{10}$  L/mol. Die zur Analytik verwendeten IAC-Säulen enthalten 0,5 mL Gel pro Säule bei 10 mg IgG/mL [122]. Das Gel mit den immobilisierten Antikörpern kann

über eine Fritte am Auslaßventil der Säule zurückgehalten und von der überstehenden Flüssigkeit getrennt werden. Es ist somit nach ausreichender Spülung regenerativ wiederverwendbar.

Die IAC stellt bei der entwickelten Methode den effektivsten Probenvorbereitungsschritt dar, so dass einerseits Verluste von Analyten an dieser Stelle so gering wie möglich, andererseits unspezifische Wechselwirkungen von störenden Substanzen mit dem Trägermaterial weitgehend verhindert werden sollten. Dies wurde durch die Verwendung einer Phosphatpuffer-Saline (PBS, 120 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 8) als Bindungsmedium erreicht, bei dessen Verwendung sich ein stabiler AA-Komplex ausbilden kann und störende Substanzen nicht retardiert werden. Dieser PBS-Puffer wurde auch zum Waschen und nach Zugabe von 0.1 % NaN<sub>3</sub> zur Stabilisierung bei Lagerung der IAC-Säule verwendet.

Die Elution der Analyten als scharfer Peak (d. h. in wenig Volumen) unter materialschonenden Bedingungen konnte mit Essigsäure (2%) erreicht werden. Zur Regeneration und vollständigen Reinigung der IAC-Säule wurde 2 M NaCl-Lösung benutzt, wobei nach Exposition mit hohem Matrixanteil (z.B. Plasma) auch mit bis zu 50 % Methanol in Essigsäure (2%) gewaschen werden kann.

### **3.1.7 Festphasenextraktion (SPE)**

Die SPE gehört mit zu den am weitest verbreiteten Probenvorbereitungsarten in der modernen Analytik. Es sind eine Vielzahl von unterschiedlichen C-18-Phasenmaterialien erhältlich, von denen einige, speziell für die Peptidanalytik entwickelte SPE-Kartuschen unterschiedlicher Hersteller getestet worden sind. Die besten Ergebnisse (mit nahezu 100%-iger Wiederfindung) lieferte die OASIS HLB-Kartusche von Waters (60 mg, 3 mL). Diese Kartuschen können sowohl für die Aufreinigung kleiner Volumina (nach IAC), als auch für die Isolierung aus großen Volumen (Urin bis 25 mL, vor IAC) genutzt werden.

### **3.1.8 Interner Standard (IS)**

Bei der Wahl des IS wurde das Verhalten bei der IAC-Probenvorbereitung, der SPE, der flüssigkeitschromatographischen Trennung und der massenspektrometrischen Detektion berücksichtigt. Weiterhin ist eine gesicherte Verfügbarkeit zu akzeptablem Preis wichtig für eine nachhaltige analytische Methode. Rinderinsulin zeigte für alle genannten Parameter zufriedenstellende Ergebnisse und wurde als IS etabliert (siehe Abb. 11). Es wurde überprüft,

ob es aus dotierten Proben (Urin und Plasma) mittels IAC isoliert werden kann, eine Retentionszeit und Peakform vergleichbar zum Humaninsulin hat und aufgrund seiner mittleren molaren Masse von 5733 Da massenspektrometrisch eindeutig von allen Zielanalyten (Humaninsulin und Analogen) unterschieden werden kann. Es ist als analytisch charakterisierte Referenzsubstanz kommerziell erhältlich, hat als Medikament in der Diabetestherapie heute jedoch kaum noch Bedeutung .

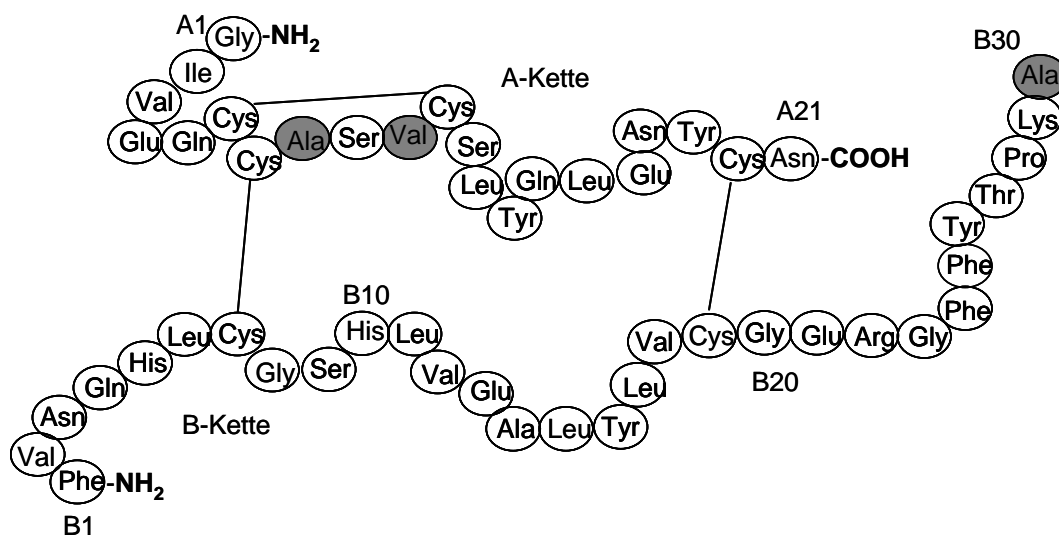


Abb. 11: Aminosäuresequenz von Rinderinsulin. Die zur Sequenz von HI unterschiedlichen Aminosäuren sind grau gekennzeichnet und das Molekulargewicht beträgt 5733 Da.

## 3.2 Qualitative Bestimmung von Humaninsulin, Lispro, Aspart und Lantus in Plasma mittels LC-MS/MS

### 3.2.1 Probenvorbereitung

2 ml Plasma werden mit 2 pmol (= 12 ng) Rinderinsulin (IS) in einem 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß versetzt, gut durchmischt und anschließend 5 min bei 6000 g zentrifugiert. Der Überstand wird zusammen mit 4 mL PBS-Puffer auf eine IAC-Säule gegeben, durchmischt und 30 min bei RT inkubiert, wobei die Lösung nach jeweils 10 min geschüttelt wird. Das PBS/Plasma-Gemisch wird über das Auslaßventil entfernt, die IAC-Säule noch dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und danach mit 2x2 ml Essigsäure (2%) auf eine OASIS HLB (3 mL, 60 mg) Festphasen (SPE)-Kartusche eluiert, die zuvor mit 2 mL Acetonitril und anschließend mit 2 mL Essigsäure (2%) konditioniert worden ist. Die SPE-Kartusche wird mit 2 mL Essigsäure (2%) gewaschen und danach mit 1,2 mL eines Gemisches aus Essigsäure (2%) / Acetonitril (60/40, v:v) in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert. Das Lösungsmittel wird in einer Vakuumzentrifuge bei etwa 40°C zur Trockne eingengt und der Rückstand mit 40 µL eines Gemisches aus 72 % Laufmittel A und 28 % Laufmittel B (entspr. HPLC-Anfangsbedingungen) rekonstituiert.

Zur Analyse der jeweiligen B-Ketten werden die Disulfid-Brücken reduktiv gespalten, indem zu der rekonstituierten Lösung 5 µL einer 100 mM TCEP-HCl -Lösung zugegeben und 10 min bei 60 °C inkubiert werden.

### 3.2.2 LC-MS/MS

#### 3.2.2.1 Chromatographische Parameter:

HPLC-System:	1100 Series (Agilent, Waldbronn)
Analytische Säule:	Zorbax 300SB-C18, 1 x 50 mm, Partikel: 3,5 µm (Agilent, Waldbronn)
Vorsäule:	Zorbax 300SB-C18, 2,1 x 12,5 mm, Partikel: 3,5 µm (Agilent, Waldbronn)
Laufmittel:	A: 0,5% Eisessig + 0,01 % TFA B: Acetonitril / 0,5% Eisessig + 0,01 % TFA (80:20, v/v)
Gradient:	0 min            72 % A

	15 min	45 % A
	15,1 min	72 % A
	38 min	72 % A
Flußrate:	70 µL/min	
Säulen-Temperatur:	40 °C	
Injektionsvolumen:	20 µL	
Laufzeit:	38 min	

### 3.2.2.2 Massenspektrometrische Parameter:

Massenspektrometer: API Q-TRAP 2000, Triple Quadrupol Massenspektrometer mit LIT  
(Applied Biosystems, Darmstadt)

Software: Analyst, Ver. 1.3.2 (Applied Biosystems, Darmstadt)

Ionisierung: ESI, positiv

Messmodus: Enhanced Product Ion

Temperatur (ESI): 150 °C

ESI-Spannung: 5500 V

Kollisionsgas: Stickstoff, Druck:  $5.3 \times 10^{-3}$  Pa

### 3.2.2.3 Analytspezifische MS-Parameter:

**Tab. 1:** Ausgewählte massenspektrometrische Parameter zur Bestimmung von Humaninsulin, Lispro (Humalog), Aspart (Novolog) und Lantus (Glargine) in Plasma

<b>Analyt intakt</b>	Molekulare Masse [Da]	Vorläuferion <i>m/z</i>	Kollisionsenergie [eV]	Declustering Potential [eV]
Humaninsulin	5807	1162.2	80	75
Lispro	5807	1162.2	80	75
Aspart	5826	1166.2	80	75
Lantus	6063	1213.8	75	75
IS (Rinderinsulin)	5733	1147.5	75	75

<b>Analyt nur B-Kette</b>	Molekulare Masse [Da]	Vorläuferion <i>m/z</i>	Kollisionsenergie [eV]	Declustering Potential [eV]
Humaninsulin	3430	858.5	45	75
Lispro	3430	858.5	45	75
Aspart	3447	862.9	45	75
Lantus	3742	936.5	45	75
IS (Rinderinsulin)	3400	851.1	45	75

### 3.3 Validierung

Die analytische Methode wurde unter Berücksichtigung von qualitativen Nachweiskriterien für die Analyten Humaninsulin, Lispro, Aspart und Glargine aus EDTA-stabilisiertem Plasma validiert. Dabei wurde für jeden Analyten auf die Parameter Spezifität, Nachweisgrenze, Präzision, Wiederfindung und Linearität geprüft. Da im Falle von Humaninsulin keine Analyt-freie Matrix (Blankplasma) zu Verfügung stand, konnten die jeweiligen Validierungsparameter für Lispro und Humaninsulin aufgrund der Auswertung über das Produktionenexperiment des identischen Vorläuferions nur in Summe ausgewertet werden (siehe auch Kap. 4.2.1).

#### 3.3.1 Spezifität

Es wurden 10 verschiedene Plasmaproben von 10 gesunden Probanden wie beschrieben aufgearbeitet und gemessen. Je eine weitere Plasmaprobe wurde einzeln mit Lispro, Aspart oder Glargine (1,2 ng/mL) dotiert, aufgearbeitet und gemessen. Zusätzlich wurde eine Probe ohne Dotierung von internem Standard analysiert.

#### 3.3.2 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im entsprechenden Produktionen-Chromatogramm der 10 Plasmaproben der Spezifitätsbestimmung (Kap. 3.3.1) zur erwarteten Retentionszeit für jedes Insulinanaloge einzeln bestimmt. Zusätzlich wurden 15 mL Plasma (Pool aus verschiedenen Plasmen) im Bereich der ermittelten Nachweisgrenze (0,5 ng/mL) mit Analyt dotiert und in sechsfacher Wiederholung analysiert (siehe Kap. 3.3.3).

#### 3.3.3 Präzision

15 mL Plasma (Pool von gesunden Probanden ohne Insulinbehandlung) wurden jeweils mit 0,5 ng/mL der drei Insulinanaloge dotiert, in 6 x 2 mL aliquotiert und analysiert ( $n=6$ ).

### 3.3.4 Wiederfindung

Die absolute Wiederfindung der Analyten nach Probenaufarbeitung wurde bestimmt, indem eine Plasmaprobe in sechsfacher Wiederholung nach Dotierung mit 1 ng/mL jedes Insulinanalogon aufgearbeitet wurde (W 1-6). Die Ergebnisse wurden mit einer sechsfach Bestimmung des gleichen Plasmas verglichen, wobei die Dotierung (1 ng/mL) erst vor der Entfernung des Lösungsmittels in der Vakuumzentrifuge erfolgte (W 7-12).

### 3.3.5 Linearität

Die Linearität der Methode wurde mittels aufsteigend dotierten Plasmaproben für die am endogenen Level orientierten Humaninsulinkonzentrationen 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 und 2,0 ng/mL geprüft.

## 3.4 Qualitative Bestimmung von Humaninsulin, Lispro, Aspart und Apidra in Urin mittels LC-MS/MS

### 3.4.1 Probenvorbereitung

25 mL Urin werden mit 2 pmol (= 12 ng) Rinderinsulin (IS) versetzt, mit 200 µL Eisessig angesäuert und gut durchmischt. Diese Lösung wird in Aliquoten von ca. 3 mL über eine OASIS HLB-SPE-Kartusche (3 mL, 60 mg) gegeben, die mit 2 mL Acetonitril und mit 2 mL Essigsäure (2%) konditioniert worden ist. Die SPE-Kartusche wird anschließend mit 2 mL Essigsäure (2%) gewaschen und mit 1,6 mL eines Gemisches aus Acetonitril / Essigsäure (2%) (50/50, v:v) auf eine IAC-Säule eluiert, die mit 3 mL PBS-Puffer gefüllt ist. Die IAC-Säule wird mit weiteren 3 mL PBS-Puffer befüllt, gut durchmischt und 30 min bei RT inkubiert, wobei die Lösung nach jeweils 10 min kurz geschüttelt wird. Das mit PBS-Puffer verdünnte Probengemisch wird über das Auslassventil entfernt und dreimal mit 3 mL PBS-Puffer gewaschen. Die Elution von der IAC-Säule erfolgt mit 2 x 2 mL Essigsäure (2%) auf eine weitere SPE-Kartusche, die wiederum mit 2 mL Acetonitril und 2 mL Essigsäure (2%) konditioniert worden ist. Nach waschen mit 2 mL Essigsäure (2%) wird die Probe mit 1,2 mL eines Gemisches aus Acetonitril / Essigsäure (2%) (50/50, v:v) in ein 1,5 mL Eppendorf

Reaktionsgefäß eluiert und das Lösungsmittel in einer Vakuumzentrifuge bei ca. 40°C zur Trockne eingengt. Der trockene Rückstand wird mit 50 µL eines Gemisches aus 72 % Laufmittel A und 28 % Laufmittel B (= HPLC-Anfangsbedingungen) rekonstituiert.

Zur Analyse der jeweiligen B-Ketten werden die Disulfid-Brücken reduktiv gespalten, indem zu der rekonstituierten Lösung 5 µL einer 100 mM TCEP-HCl-Lösung zugegeben und 10 min bei 60 °C inkubiert werden.

### 3.4.2 LC-MS/MS

#### 3.4.2.1 Chromatographische Parameter:

HPLC-System:	1100 Series (Agilent, Waldbronn)
Analytische Säule:	Zorbax 300SB-C18, 1 x 50 mm, Partikel: 3,5 µm (Agilent, Waldbronn)
Vorsäule:	Zorbax 300SB-C18, 1 x 17 mm, Partikel: 3,5 µm (Agilent, Waldbronn)
Laufmittel:	A: 0,1% Eisessig + 0,01 % TFA B: Acetonitril / 0,1% Eisessig + 0,01 % TFA (80:20, v/v)
Gradient:	0 min            72 % A 18 min           35 % A 18,1 min        72 % A 38 min           72 % A
Flussrate:	70 µL/min
Säulen-Temperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	20 µL (10 µL bei API 4000)
Laufzeit:	38 min

#### 3.4.2.2 Massenspektrometrische Parameter:

Massenspektrometer:	API Q-TRAP 2000 bzw. 4000, Triple Quadrupol Massenspektrometer mit LIT (Applied Biosystems, Darmstadt)
Software:	Analyst, Ver. 1.3.2 bzw. 1.4 (Applied Biosystems, Darmstadt)
Ionisierung:	ESI, positiv
Messmodus:	Enhanced Product Ion
Temperatur (ESI):	150 °C
ESI-Spannung:	5500 V
Kollisionsgas:	Stickstoff, Druck: $5,3 \times 10^{-3}$ Pa



### 3.4.2.3 Analytspezifische MS-Parameter:

**Tab. 2:** Ausgewählte massenspektrometrische Parameter zur Bestimmung von HI, Lispro (Humalog), Aspart (Novolog) und Apidra (Glulisine) in Urin

<b>Analyt intakt</b>	Molekulare Masse [Da]	Vorläuferion $m/z$	Kollisionsenergie [eV]	Declustering Potential [eV]
Humaninsulin	5807	1162.2	80	75
Lispro	5807	1162.2	80	75
Aspart	5826	1166.2	80	75
Apidra	5823	1165.5	80	75
IS (Rinderinsulin)	5733	1147.5	75	75

<b>Analyt nur B-Kette</b>	Molekulare Masse [Da]	Vorläuferion $m/z$	Kollisionsenergie [eV]	Declustering Potential [eV]
Humaninsulin	3430	858.5	45	75
Lispro	3430	858.5	45	75
Aspart	3447	862.9	45	75
Apidra	3443	861.7	45	75
IS (Rinderinsulin)	3400	851.1	45	75

## 3.5 Validierung

Die zur qualitativen Bestimmung entwickelten analytische Methode wurde für die Analyten Humaninsulin, Lispro, Aspart und Apidra in Urin validiert. Für jeden Analyten wurden die Parameter Spezifität, Nachweisgrenze, Präzision, Wiederfindung, Linearität und Stabilität geprüft. Da, wie bereits für Plasmaproben, auch für Humaninsulin keine Analyt-freie Matrix (Blankurin) zu Verfügung stand, konnten die jeweiligen Validierungsparameter für Lispro und Humaninsulin aufgrund der Auswertung über das Produktionsexperiment des identischen Vorläuferions nur in Summe ausgewertet werden (siehe Kap. 4.2.1).

### 3.5.1 Spezifität

Es wurden 10 verschiedene Urinproben von 10 gesunden Probanden wie beschrieben aufgearbeitet und gemessen. Je eine weitere Urinprobe wurde einzeln mit Lispro, Aspart oder Apidra (0,1 ng/mL) dotiert, aufgearbeitet und gemessen. Zusätzlich wurde eine Probe ohne Dotierung von internem Standard analysiert.

### 3.5.2 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im entsprechenden Produktions-Chromatogramm der 10 Urinproben zur Spezifitätsbestimmung zur erwarteten Retentionszeit für jedes Insulin einzeln bestimmt. Zusätzlich wurden 180 mL Urin im Bereich der ermittelten Nachweisgrenze mit den 3 Analyten dotiert und in sechsfacher Wiederholung analysiert (siehe Kap. 3.5.3).

### 3.5.3 Präzision

180 mL Urin (von gesunden Probanden ohne Insulinbehandlung) wurden jeweils mit 0,05 ng/mL der drei Insulinanalogen dotiert, in 6 x 25 mL aliquotiert und analysiert ( $n=6$ ).

### 3.5.4 Wiederfindung

Die absolute Wiederfindung der Analyten nach Probenaufarbeitung wurde bestimmt, indem ein Urin in sechsfacher Wiederholung nach Dotierung mit 0,1 ng/mL jedes Insulinanalogen aufgearbeitet wurde (W 1-6). Die Ergebnisse wurden mit einer sechsfach Bestimmung des gleichen Urins verglichen, wobei die Dotierung (0,1 ng/mL) erst vor der Entfernung des Lösungsmittels in der Vakuumzentrifuge erfolgte (W 7-12).

### 3.5.5 Linearität

Die Linearität der Methode wurde mittels aufsteigend dotierten Urinproben für die am endogenen Level von Humaninsulin orientierten Konzentrationen 0,05, 0,075, 0,1, 0,125, 0,15 und 0,2 ng/mL geprüft.

### 3.5.6 Stabilität

Die Stabilität der Insulinanalogen in urinärer Matrix wird anhand von dotierten Urin-Aliquoten (0,2 ng/mL) gezeigt, die bei 4 und  $-20$  °C gelagert werden. Die Stabilität wird jeweils durch Analyse nach 1, 2, 4, 8, 12 und 16 Wochen geprüft. Weiterhin wurde die Stabilität der Analyten bei Raumtemperatur geprüft, indem Aliquote eines dotierten

Probenpools (0,1 ng/mL) nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Lagerung bei 22 °C aufgearbeitet und analysiert wurden.

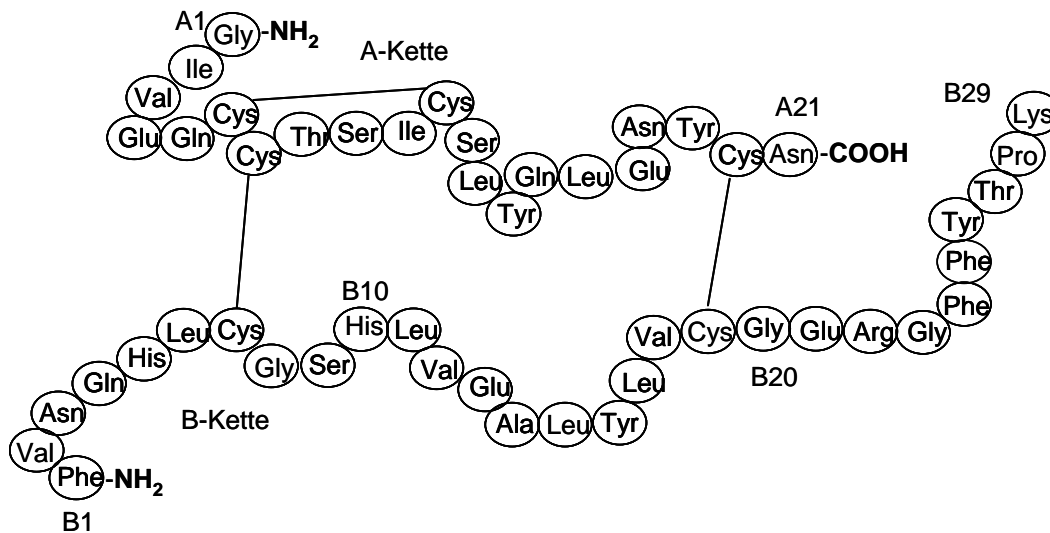
### 3.6 Insulin-Bestimmung in regulären Dopingkontrollproben und Patientenurinen

Es wurden insgesamt 19 reguläre Dopingkontrollurine und 6 Urine von Patienten untersucht, die zur Behandlung von *Diabetes mellitus* mit verschiedenen schnellwirkenden Insulinen behandelt worden sind (siehe auch Tab. 5 in Kap.: 4.5).

### 3.7 Qualitative Bestimmung der metabolischen Abbauprodukte von Humaninsulin, Lantus und Detemir in Urin mittels LC-MS/MS

#### 3.7.1 Referenzstandards

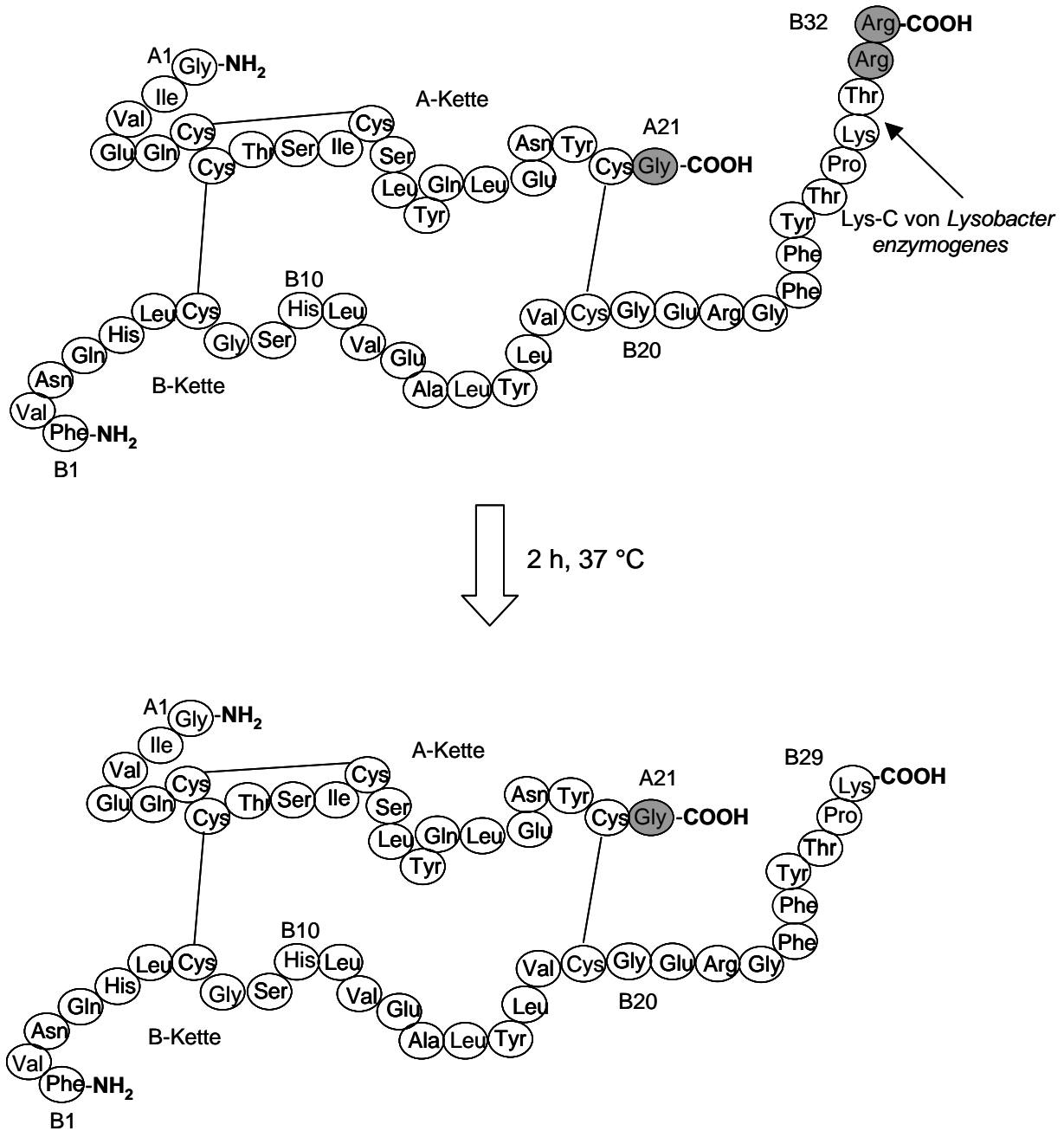
Zu den in den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Abbauprodukten von Humaninsulin, Lantus und Detemir sind kommerziell keine Referenzsubstanzen erhältlich. Daher war eine eigene Synthese durch enzymatische Hydrolyse aus den jeweiligen Ausgangsverbindungen notwendig. Standards mit akzeptabler Reinheit (d.h. > 90 %) konnten jedoch nur für das langwirkende Insulinanaloge Lantus hergestellt werden (s.u.). Die enzymatische Hydrolyse von Humaninsulin-Referenzsubstanz zu DesB30-Humaninsulin (HI) führte lediglich zu einer 50 %-Umsetzung von Edukt zu Produkt. Die Referenzsubstanz (DesB30-HI), die als Abbauprodukt von Humaninsulin und Detemir im Urin identifiziert ist, wurde dann freundlicherweise von Herrn Dr. T. Hoeg-Jensen (NovoNordisk, Dänemark) zur Verfügung gestellt (Abb. 12).



**Abb. 12:** Aminosäuresequenz von DesB30 HI. Im Vergleich zu HI fehlt die Aminosäure Threonin an Position B30. Das mittlere Molekulargewicht beträgt 5707 Da.

### 3.7.2 Enzymatische Hydrolyse von Lantus

DesB30-32 Lantus-Referenzlösung wurde durch enzymatische Hydrolyse (am C-terminalen Ende von Lantus B29<sub>Lys</sub>) der intakten Referenzsubstanz von Lantus mit Hilfe des Enzyms Endoproteinase Lys-C aus *Lysobacter enzymogenes* hergestellt (Abb. 13). Dazu wurde zu 1 mL einer 10 pmol/ $\mu$ L Lantus-Lösung in 100 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer (pH 7,5) 20  $\mu$ L der rekonstituierten Enzymlösung (4,8 units/mL) zugefügt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Hydrolyse ist durch Zugabe von 20  $\mu$ L Eisessig gestoppt worden und die so erhaltenen Referenzlösung kann bei 4 °C zur Analyse gelagert werden.



**Abb. 13:** Enzymatische Spaltung von Lantus (Glargine) mit Hilfe der Endoproteinase Lys-C aus *Lysobacter enzymogenes* zur Synthese von DesB30-32 Lantus-Referenzsubstanz mit einem mittleren Molekulargewicht von 5650 Da. Die Modifikation zu DesB30 HI (Abb. 12) ist grau dargestellt.

### 3.7.3 Probenvorbereitung

25 mL Urin werden mit 1 pmol (= 6 ng) Rinderinsulin (IS) versetzt, mit 200 µL Eisessig angesäuert und gut durchmischt. Diese Lösung wird in Aliquoten von ca. 3 mL über eine OASIS HLB-SPE-Kartusche (3 mL, 60 mg) gegeben, die mit 2 mL Acetonitril und anschließend mit 2 mL Essigsäure (2%) konditioniert worden ist. Die SPE wird mit 2 mL Essigsäure (2%) gewaschen und mit 1,6 mL eines Gemisches aus Acetonitril / Essigsäure (2%) (50/50, v:v) auf eine IAC-Säule eluiert, die mit 3 mL PBS-Puffer gefüllt ist. Die IAC-Säule wird mit weiteren 3 mL PBS-Puffer befüllt, gut durchmischt und 30 min bei RT inkubiert, wobei die Lösung nach jeweils 10 min kurz geschüttelt wird. Das mit PBS-Puffer verdünnte Probengemisch wird über das Auslaßventil entfernt und 3 x mit 3 mL PBS-Puffer gewaschen. Die Elution aus der IAC-Säule erfolgt mit 2 x 2 mL Essigsäure (2%) auf eine weitere SPE-Kartusche, die wiederum mit 2 mL Acetonitril und 2 mL Essigsäure (2%) konditioniert worden ist. Nach Waschen mit 2 mL Essigsäure (2%) wird die Probe mit 1,2 mL eines Gemisches aus Acetonitril / Essigsäure (2%) (50/50, v:v) in ein 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß eluiert und das Lösungsmittel in einer Vakuumzentrifuge bei ca. 40°C zur Trockne eingengt. Der trockene Rückstand wird mit 50 µL eines Gemisches aus 72 % Laufmittel A und 28 % Laufmittel B (= HPLC-Anfangsbedingungen) rekonstituiert. Zur Analyse der jeweiligen B-Ketten werden die Disulfid-Brücken reaktiv gespalten, indem zu der rekonstituierten Lösung 5 µL einer 100 mM TCEP-HCl-Lösung zugegeben und 10 min bei 60 °C inkubiert werden.

### 3.7.4 LC-MS/MS

#### 3.7.4.1 Chromatographische Parameter:

HPLC-System:	1100 Series (Agilent, Waldbronn)
Analytische Säule:	Zorbax 300SB-C18, 1 x 50 mm, Partikel: 3,5 µm (Agilent, Waldbronn)
Vorsäule:	Zorbax 300SB-C18, 1 x 17 mm, Partikel: 3,5 µm (Agilent, Waldbronn)
Laufmittel:	A: 0,1% Eisessig + 0,01 % TFA B: Acetonitril / 0,1% Eisessig + 0,01 % TFA (80:20, v/v)

Gradient:	0 min	72 % A
	18 min	35 % A
	18,1 min	72 % A
	38 min	72 % A
Flussrate:	70 $\mu\text{L}/\text{min}$	
Säulen-Temperatur:	40 °C	
Injektionsvolumen:	10 $\mu\text{L}$	
Laufzeit:	38 min	

### 3.7.4.2 Massenspektrometrische Parameter:

Massenspektrometer:	API Q-TRAP 4000, Triple Quadrupol Massenspektrometer mit LIT (Applied Biosystems, Darmstadt)		
Software:	1.4 (Applied Biosystems, Darmstadt)		
Ionisierung:	ESI, positiv		
Messmodus:	Enhanced Product Ion		
Temperatur (ESI):	150 °C		
ESI-Spannung:	5500 V		
Kollisionsgas:	Stickstoff, Druck: $5,3 \times 10^{-3}$ Pa		

### 3.7.4.3 Analytspezifische MS-Parameter:

**Tab. 3:** Ausgewählte massenspektrometrische Parameter zur Bestimmung von DesB30 HI, DesB30-32 LAN und DesB31-32 LAN.

Analyt intakt	Molekulare Masse [Da]	Vorläuferion <i>m/z</i>	Kollisionsenergie [eV]	Declustering Potential [eV]
DesB30-HI	5707	1142.5	75	75
DesB30-32 Lantus	5650	1130.9	75	75
DesB31-32 Lantus	5751	1151.1	75	75
IS (Rinderinsulin)	5733	1147.5	75	75

Analyt nur B-Kette	Molekulare Masse [Da]	Vorläuferion <i>m/z</i>	Kollisionsenergie [eV]	Declustering Potential [eV]
DesB30-HI	3329	833.2	45	75
DesB30-32 Lantus	3329	833.2	45	75
DesB31-32 Lantus	3430	858.5	45	75
IS (Rinderinsulin)	3400	851.1	45	75

### 3.8 Validierung

Die beschriebene Methode wurde zur Bestimmung von qualitativen Nachweiskriterien für die Analyten DesB30-Humaninsulin (DesB30-HI), DesB30-32 Lantus und DesB31-32 Lantus in Urin validiert. Für die drei Analyten wurden die Parameter Spezifität und Nachweisgrenze geprüft. Die Validierungsparameter Präzision, Wiederfindung, Linearität und Stabilität wurden jeweils nur für DesB30-HI und DesB30-32 Lantus getestet, da hierfür Referenzsubstanz zur Verfügung stand. Weiterhin konnte auch für DesB30-HI keine Analyt-freie Matrix (Blankurin) zur Validierung herangezogen werden, weil der Urin von gesunden Probanden einen endogenen Anteil dieses Metaboliten enthält. Daher konnten die jeweiligen Validierungsparameter nur in Summe aus endogenem und dotiertem DesB30 HI ausgewertet werden (siehe auch Kap. 4.9.1).

#### 3.8.1 Spezifität

Es wurden 10 verschiedene Urinproben von 10 gesunden Probanden wie beschrieben aufgearbeitet und gemessen. Je eine weitere Urinprobe wurde einzeln mit DesB30-HI und DesB30-32 Lantus (0,1 ng/mL) dotiert, aufgearbeitet und gemessen. Zusätzlich wurde eine Urinprobe ohne Dotierung von internem Standard analysiert.

#### 3.8.2 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im entsprechenden Produktionen-Chromatogramm der 10 Urinproben zur Spezifitätsbestimmung zur erwarteten Retentionszeit für jedes Abbauprodukt einzeln bestimmt. Zusätzlich wurden 180 mL Urin im Bereich der ermittelten Nachweisgrenze mit den 2 Analyten dotiert und in sechsfacher Wiederholung analysiert (siehe Kap. 3.8.3).

#### 3.8.3 Präzision

180 mL Urin (von gesunden Probanden ohne Insulintherapie) wurden jeweils mit 0,05 ng/mL der Abbauprodukte dotiert, in 6 x 25 mL aliquotiert und analysiert ( $n=6$ ).



### 3.8.4 Wiederfindung

Die absolute Wiederfindung der Analyten nach Probenaufarbeitung wurde bestimmt, indem ein Urin in sechsfacher Wiederholung nach Dotierung mit 0,2 ng/mL jedes Metaboliten aufgearbeitet wurde (W 1-6). Die Ergebnisse wurden mit einer sechsfach Bestimmung des gleichen Urins verglichen, wobei die Dotierung (0,2 ng/mL) erst vor der Entfernung des Lösungsmittels in der Vakuumzentrifuge erfolgte (W 7-12).

### 3.8.5 Linearität

Die Linearität der Methode wurde mittels aufsteigend dotierten Urinproben für die am endogenen Level orientierten Konzentrationen 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125, 0,015 und 0,2 ng/mL geprüft.

### 3.8.6 Stabilität

Die Stabilität der Insulinanalogen in urinärer Matrix wird anhand von dotierten Urin-Aliquoten (0,1 ng/mL) gezeigt, die bei 4 und  $-20$  °C gelagert werden. Die Stabilität wird jeweils durch Analyse nach 1, 2, 4, 8, 12 und 16 Wochen geprüft. Weiterhin wurde die Stabilität der Analyten bei Raumtemperatur geprüft, indem Aliquote eines dotierten Probenpools (0,1 ng/mL) nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Lagerung bei 22 °C aufgearbeitet und analysiert wurde.

## 3.9 Methodenentwicklung C-Peptid

Ziel der Bestimmung war es eine Korrelation zwischen den Urinkonzentrationen von Insulin und C-Peptid darzustellen, die in äquimolaren Mengen im Pankreas durch Spaltung gebildet werden. Deshalb wurde für diese Methode von Beginn an ein quantitativer Ansatz verfolgt. Die Literaturrecherche von bestehenden Methoden deutete bereits darauf hin, dass die Anforderung an die Analytik in der Hauptsache nicht durch die zu erwartenden Konzentrationen, als vielmehr durch die Matrix beeinflusst werden [89]. Es ist demnach nicht

die Empfindlichkeit des Massenspektrometers, sondern die Qualität der Probenaufarbeitung entscheidend für die Methodenentwicklung.

### **3.9.1 Festphasenextraktion (SPE)**

Die für die SPE verwendeten Kartuschen mit gemischter Festphase bestehen aus einem C-18 Material und einem milden Kationentauscher (CW). Dies soll durch Ausnutzung der klassischen hydrophoben Wechselwirkungen (C-18) und des amphoteren Charakters des Peptids zu einer effektiven Probenaufarbeitungprozedur führen. Bei einem pH-Wert von 2-2.5 wird das C-Peptid wegen seines niedrigen isoelektrischen Punktes (pI) durch den Kationentauscher auch beim Waschen mit einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel (60% ACN) noch retardiert, wobei störende Matrixbestandteile entfernt werden können.

### **3.9.2 Flüssigkeitschromatographie (LC)**

Die Bedingungen der LC-Trennung wurden in Anlehnung, d.h. mit identischen Laufmitteln und LC-Säulenmaterialien, an die entwickelte Insulinmethode gewählt. Dies sollte eine mögliche sequentielle Kombination der Methoden zukünftig unter geringem Aufwand erlauben. Dabei wurde ein besonders flacher Gradient gewählt, um die Matrixeinflüsse von eventuell koelutierenden Substanzen, die bei der vergleichsweise unspezifischen Probenaufarbeitung erwartet wurden, zu minimieren.

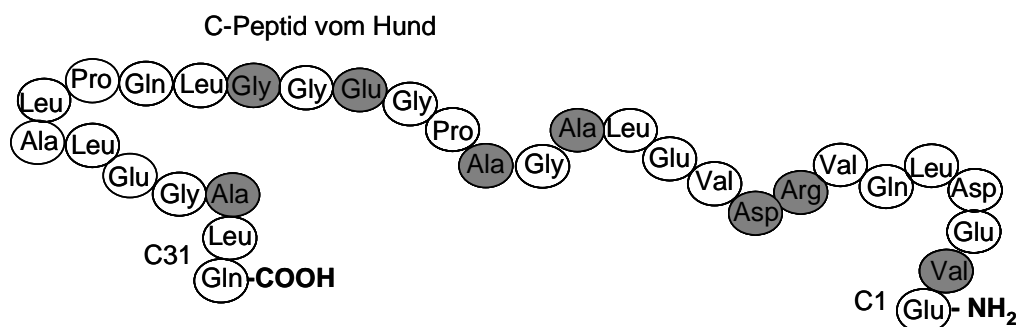
### **3.9.3 Massenspektrometrische Charakterisierung**

Wie bei der Insulinbestimmung wird auch für das C-Peptid zunächst der dominierende Ladungszustand durch Direktinjektion der Referenzverbindung (1 µg/mL in Essigsäure (2%) / Acetonitril (50/50, v:v)) im positiven ESI-Modus über eine Spritzenpumpe ermittelt. Dieser wird dann zur Generierung der charakteristischen MS/MS-Spektren genutzt. Weiterhin wurde dieses mehrfach geladene Quasimolekülion als Vorläuferion einer computergestützten Optimierung aller MS-relevanten Parameter (CE, DP etc.) zur Entwicklung einer Methode mit verschiedenen Multiple-Reaction-Monitoring (MRM)-Experimenten verwendet. Dabei

wird das Massenspektrometer im einfachen Triple-Quadrupol-Modus (ohne LIT) eingesetzt, indem das Quasimolekülion in Q1 isoliert, in Q2 fragmentiert wird und Q3 nur Produktionen bestimmter Masse-zu-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) passieren lässt. Die in der Literatur beschriebene Ionisierung im negativen Modus lieferte schon für die Direktinjektion der Referenzverbindung keine ausreichende Empfindlichkeit und wurde deshalb nicht weiter berücksichtigt [91].

### 3.9.4 Interner Standard C-Peptid (ISC)

Wie auch bei der Insulinbestimmung wurde mit dem C-Peptid vom Hund ein ISC ausgewählt, der sich bei Probenvorbereitung, LC-Trennung und MS-Detektion dem humanen C-Peptid sehr ähnlich verhält (Abb. 14). Es besitzt auch einen niedrigen isoelektrischen Punkt (pI) von 3,4, eine etwas längere Retentionszeit auf der C18-RP-LC-Säule und mit 3174,5 Da eine mittlere molekulare Masse in der Größenordnung von humanem C-Peptid (3020 Da). Darüber hinaus ist es im Gegensatz zur  $^2\text{H}_5$ -markierten C-Peptid-Referenzsubstanz, bei der 5 Wasserstoffatome durch Deuteriumatome ersetzt wurden und die ebenfalls kommerziell erhältlich ist, deutlich preiswerter.



**Abb. 14:** Aminosäuresequenz von C-Peptid vom Hund. Die Modifikationen zu humanem C-Peptid sind grau gekennzeichnet.

### 3.9.5 Standardlösungen

Stammlösungen des C-Peptids und des ISC werden in einer Konzentration von 100 µg/mL Essigsäure (2%) in PP-Gefäßen (Eppendorf, Hamburg) aufbewahrt und sind bei –20 °C für 8 Wochen haltbar. Die jeweiligen Arbeitslösungen (10 µg/mL in Essigsäure (2%)) werden am Tag der Probenvorbereitung frisch angesetzt.

## 3.10 Quantitative Bestimmung von C-Peptid in Urin

### 3.10.1 Probenvorbereitung

Zu 1 mL Urin werden 100 ng ISC zugegeben, mit 10 µL Eisessig angesäuert und am Vortex-Mixer 5 sek geschüttelt. Die Lösung wird auf eine STRATA-X-CW SPE-Kartusche (1 mL, 30 mg, Phenomenex) gegeben, die zuvor mit 1 mL Methanol und anschließend mit 1 mL Reinstwasser konditioniert worden ist. Die Säule wird mit 500 µL eines Gemisches aus Methanol / Essigsäure (2%) (60/40, v:v) gewaschen und mit 600 µL eines Gemisches aus Eisessig / Methanol (10/90, v:v) eluiert. Das Eluat wird in einer Vakuumzentrifuge bei 40 °C zur Trockne reduziert und der Rückstand mit 60 µL eines Gemisches aus Essigsäure (2 %) / Acetonitril (90/10, v:v) rekonstituiert.

### 3.10.2 Kalibriergerade

Zur Quantifizierung über eine externe Kalibriergerade wird ein Blankurin mit C-Peptid-Referenzverbindung (aus Arbeitslösung) im Konzentrationsbereich von 0, 10, 50, 100, 150 und 200 ng/mL (K0 bis K5) dotiert und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Dabei ist ein C-Peptid-freier Urin (Blankmatrix) kommerziell nicht erhältlich, kann aber wegen der Instabilität des Analyten in Urin selbst hergestellt werden: Nach Lagerung eines gewöhnlichen Urins über 24 h bei Raumtemperatur ist kein C-Peptid mehr nachweisbar und

kann als Blankmatrix genutzt werden, wobei zur Kontrolle jeweils ein nicht dotiertes Aliquot (K0) mit analysiert werden sollte (siehe Kap. 4.12.1.1).

### 3.10.3 LC-MS/MS

#### 3.10.3.1 Chromatographische Parameter:

HPLC-System:	1100 Series (Agilent, Waldbronn)	
Analytische Säule:	Zorbax 300SB-C18, 2.1 x 50 mm, Partikel: 3.5 µm (Agilent, Waldbronn)	
Laufmittel:	A: 0,1% Eisessig + 0,01 % TFA B: Acetonitril / 0,1% Eisessig + 0,01 % TFA (80:20, v/v)	
Gradient:	0 min	85 % A
	18 min	50 % A
	18,1 min	30 % A
	19 min	30 % A
	19,1 min	85 % A
	26,5 min	85 % A
Flussrate:	150 µL/min	
Säulen-Temperatur:	40 °C	
Injektionsvolumen:	10 µL	
Laufzeit:	26,5 min	

#### 3.10.3.2 Massenspektrometrische Parameter:

Massenspektrometer:	API Q-TRAP 2000, Triple Quadrupol Massenspektrometer mit LIT (Applied Biosystems, Darmstadt)	
Software:	Analyst, Ver. 1.3.2 (Applied Biosystems, Darmstadt)	
Ionisierung:	ESI, positiv	
Messmodus:	MRM	
Temperatur (ESI):	300 °C	
ESI-Spannung:	5500 V	
Kollisionsgas:	Stickstoff, Druck: $5,3 \times 10^{-3}$ Pa	

### 3.10.3.3 Analytspezifische MS-Parameter:

**Tab. 4:** Ausgewählte massenspektrometrische Parameter zur quantitativen Bestimmung von C-Peptid in Urin.

Analyt	Molekulare Masse [Da]	MRM-Experiment $m/z$	Kollisionsenergie [eV]	Declustering Potential [eV]
C-Peptid	3020	1007.8 / 86	85	50
		1007.8 / 130	80	50
		1007.8 / 147	70	50
IS (C-Peptid vom Hund)	3174	1059.0 / 86	85	50

## 3.11 Validierung

Die Validierung der quantitativen C-Peptid Bestimmung in Urin wurde mit Hilfe einer externen Kalibrierung mit Matrix und IS durchgeführt. Es wurden die Parameter Spezifität, Bestimmungsgrenze, Präzision, Vergleichspräzision, Wiederfindung, Richtigkeit, Linearität und Stabilität geprüft. Für diese Bestimmung stand wiederum keine Analyt-freie Matrix (Blankmatrix) zur Verfügung. Diese ist jedoch für eine externe Kalibrierung mit Matrix unerlässlich und konnte auch durch thermische Exposition von gewöhnlichen Urinproben auf einfache Weise selber erzeugt werden (siehe auch Kap. 4.2.2).

### 3.11.1 Spezifität

Die Spezifität der Methode wird anhand von 10 unterschiedlichen Urinproben von gesunden Probanden gezeigt. Die Abwesenheit von interferierenden Störsignalen ergibt sich aus der Messung von Blankurinen und dem Vergleich der Signalintensitäten von drei Ionenübergängen verschiedener MRM-Experimente in nativen Urinproben mit endogenem C-Peptidgehalt und dotierten Blankurinen.

### 3.11.2 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wurde über ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) von  $> 9$  zur entsprechenden Retentionszeit der verschiedenen MRM-Experimente in einem Blankurin abgeschätzt. Das S/N kann im Sinne eines Systemtest-Standards (SST) bei jeder Bestimmung anhand des niedrigst dotierten Kalibrierstandards (K1) überprüft werden.

### 3.11.3 Präzision und Vergleichspräzision

20 mL Blankurin wurden mit 60 ng/mL C-Peptid Referenzsubstanz dotiert und in sechsfacher Wiederholung ( $n=6$ ) in 1 mL Aliquoten aufgearbeitet. Die verbleibenden ca. 14 mL wurden bei  $-20\text{ °C}$  eingelagert und am darauffolgenden Tag nochmals in sechsfacher Wiederholung ( $n=6$ ) in Aliquoten von 1 mL aufgearbeitet und analysiert.

### 3.11.4 Wiederfindung

Zur Bestimmung der Verluste an Analyten während der Probenaufarbeitung wurde die absolute Wiederfindung ermittelt. Ein Blankurin wurde dafür mit 30 ng/mL Referenzsubstanz dotiert und in sechsfacher Wiederholung aufgearbeitet (W 1-6). Der gleiche Urin wird nochmals wie beschrieben in sechsfacher Wiederholung (W 7-12) aufgearbeitet, die Referenzsubstanz (30 ng/mL) wird jedoch erst kurz vor Entfernung des Lösungsmittels in der Vakuumzentrifuge zugegeben.

### 3.11.5 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode ist über einen Soll-/Istwert-Vergleich auf drei Konzentrationsniveaus ermittelt worden. Dazu wurde ein Blankurin mit 24, 48 und 96 ng/mL Referenzsubstanz dotiert und in dreifacher Wiederholung analysiert ( $n=3+3+3$ ). Die Istwerte wurden mit Hilfe einer externen Kalibrierung bestimmt und mit den theoretischen (Soll-) Werten verglichen.

### **3.11.6 Linearität und Arbeitsbereich**

Der Arbeitsbereich orientiert sich an den erwarteten endogenen C-Peptid-Konzentrationen gesunder Individuen, die im Bereich von 40 bis 150 ng/mL beschrieben sind [89]. Die Linearität wurde im Bereich von 20 bis 300 ng/mL überprüft. Dazu wurde ein Blankurin mit 12, 24, 36, 48, 60, 90, 12, 180, und 300 ng/mL Referenzsubstanz dotiert und analysiert.

### **3.11.7 Stabilität**

Zur Bestimmung der Stabilität des Analyten in urinärer Matrix wurde ein Blankurin mit 100 ng/mL Referenzsubstanz dotiert und als Aliquote (1 mL) in PP-Gefäßen (Eppendorf, Hamburg) bei 4 bzw.  $-20$  °C eingelagert. Die Aliquote wurden nach 0, 1, 3, 7, 14, 28 und 42 Tagen Lagerung analysiert.



## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Insulin

#### 4.1.1 Ladungszustände der mehrfach geladenen Quasimolekülonen

Um die Zielanalyten der zu entwickelnden Methode zugänglich zu machen, wurden zunächst die vorhandenen Referenzsubstanzen massenspektrometrisch charakterisiert. Dazu werden die dominierenden Ladungszustände aller zur Verfügung stehenden Referenzverbindungen jeweils für die intakten Insuline, sowie für die reduzierten B-Ketten nach Spaltung mit TCEP-HCl (=Reduktion und Spaltung der Disulfid-Brücken), ermittelt. Dieser Ladungszustand ergibt sich aus einem Spektrum, das über den jeweiligen Massenbereich ohne Fragmentierung (Full-Scan-Spektrum, siehe z.B. Abb. 15) aufgenommen wird. In einem weiteren Experiment wird dann durch Isolation (Q1), Fragmentierung (Q2, CID) des intensivsten Vorläuferions (= mehrfach protoniertes Quasimolekülion) und anschließender Optimierung verschiedener massenspektrometrischer Parameter (CE, DP u.ä.) eine möglichst hohe Empfindlichkeit für die Generierung eines Produktionen-Experimentes nach kollisionsinduzierter Fragmentierung erreicht (siehe z.B. Abb. 16).

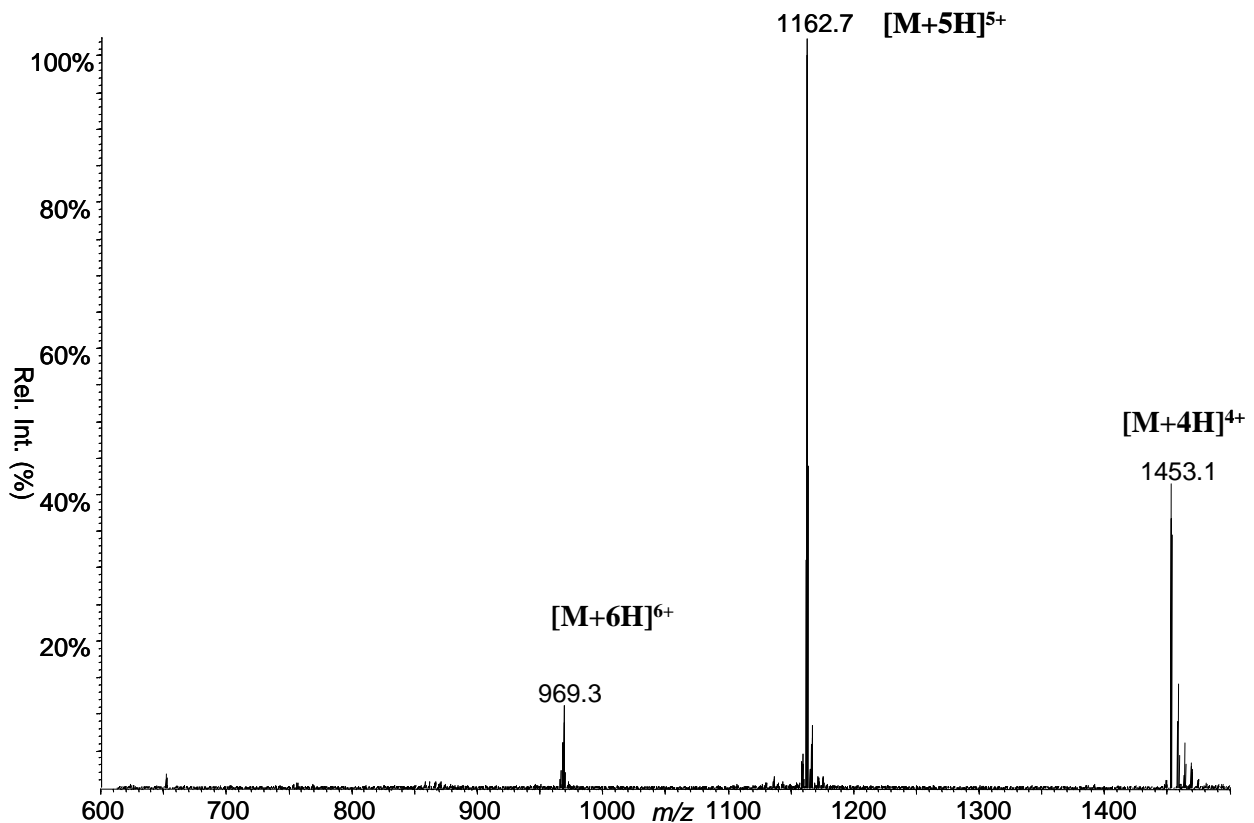
#### 4.1.2 Identifizierung und Charakterisierung diagnostischer Produktionen

##### 4.1.2.1 Humaninsulin (intakt)

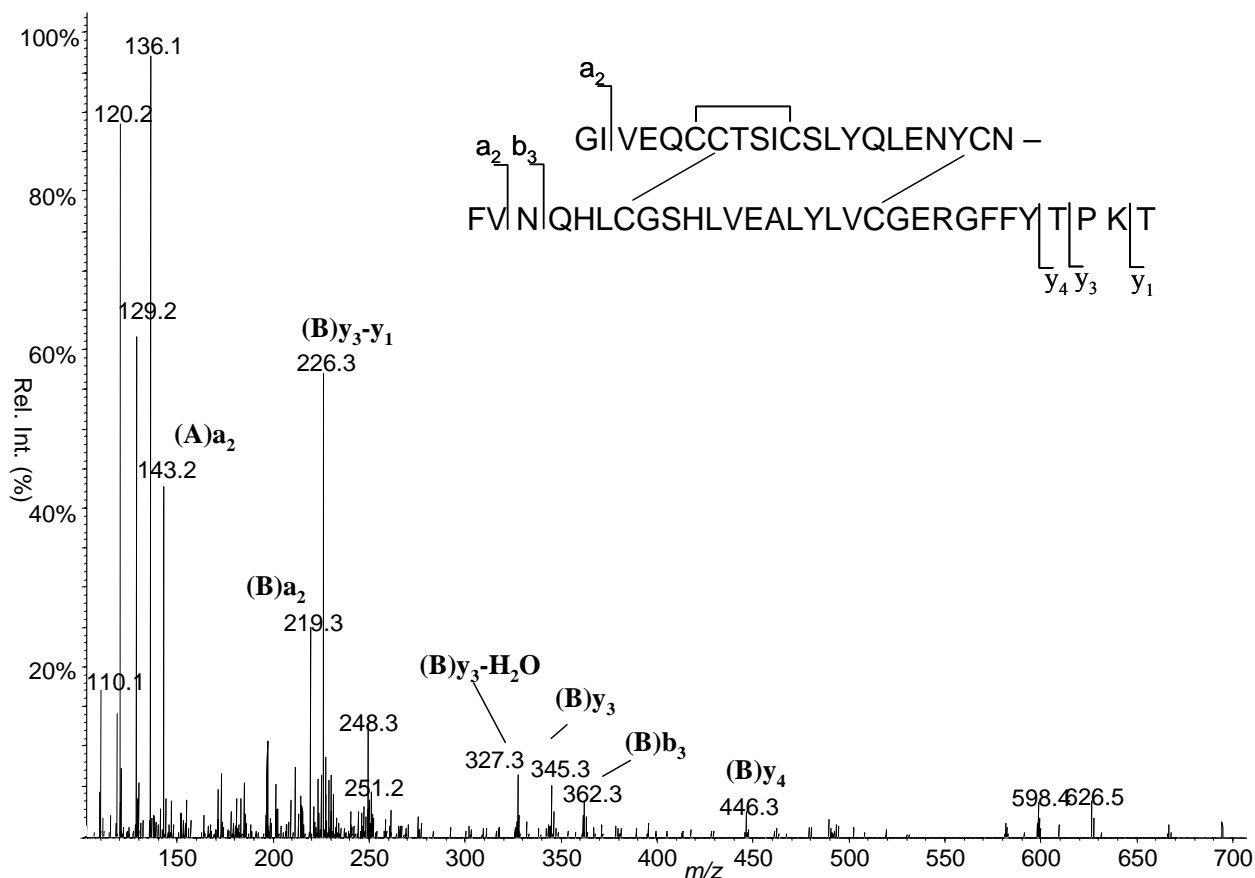
Im Full-Scan-Spektrum im Bereich von  $m/z$  600 - 1500 zeigt sich der fünffach protonierte Ladungszustand  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z = 1162,7$  als intensivstes Signal, neben dem vierfach  $[M+4H]^{4+}$  bzw. sechsfach  $[M+6H]^{6+}$  protonierten Ladungszustand bei  $m/z = 1453,1$  bzw. 969,3 (Abb. 15).

Durch CID des fünffach protonierten Quasimolekülions  $[M+5H]^{5+}$  bei Kollisionsenergien  $> 70$  eV lassen sich im Produktionen-Spektrum mit Hilfe der linearen Ionenfalle kleine (d.h. aus ein- bis drei Aminosäuren bestehende), aber sehr charakteristische Fragmente aus der Aminosäuresequenz von Humaninsulin nachweisen (siehe Abb. 16). Bei diesen Fragmenten handelt es sich hauptsächlich um a- und y-, neben auch wenigen b-Ionen, wie es in der Peptidanalytik mit Elektrospray-Ionisierung und kollisionsinduzierter Fragmentierung in der

Literatur beschrieben ist [97]. So konnten im Produktions-Spektrum der Humaninsulin-Referenzsubstanz die diagnostischen Ionen der B-Kette (B)y<sub>4</sub> bei  $m/z = 446$ , (B)y<sub>3</sub> bei  $m/z = 345$ , (B)y<sub>3</sub> - H<sub>2</sub>O bei  $m/z = 327$ , (B)y<sub>3</sub> - y<sub>1</sub> bei  $m/z = 226$ , (B)b<sub>3</sub> bei  $m/z = 362$  und (B)a<sub>2</sub> bei  $m/z = 219$  identifiziert werden. Als von der A-Kette stammend, konnte das Fragment bei  $m/z = 143$  als (A)a<sub>2</sub> bestimmt werden. Darüber hinaus zeigte das Spektrum intensive Signale bei  $m/z = 136$ , 120 bzw. 129, die den Immoniumionen von Tyr, Phe und Arg zugeordnet werden können und in den noch folgenden Produktions-Spektren aller untersuchten Insuline auftreten (siehe Abb. 16, 18 ff.) Als Immoniumionen bezeichnet man ein internes Fragment, welches durch eine kombinierte  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Fragmentierung aus einer Aminosäure entsteht [123, 124].



**Abb. 15:** ESI-Massenspektrum von Humaninsulin-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülonen im vier-, fünf- und sechsfach protonierten Zustand bei  $m/z$  1453,1, 1162,7 und 969,3.



**Abb. 16:** ESI-Produktionenspektrum des fünffach geladenen Quasimoleküls  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  1162,7 von Humaninsulin-Referenzsubstanz nach kollisionsinduzierter Fragmentierung (CID) mit den charakteristischen Produktionen des a-, y- und b-Typs.

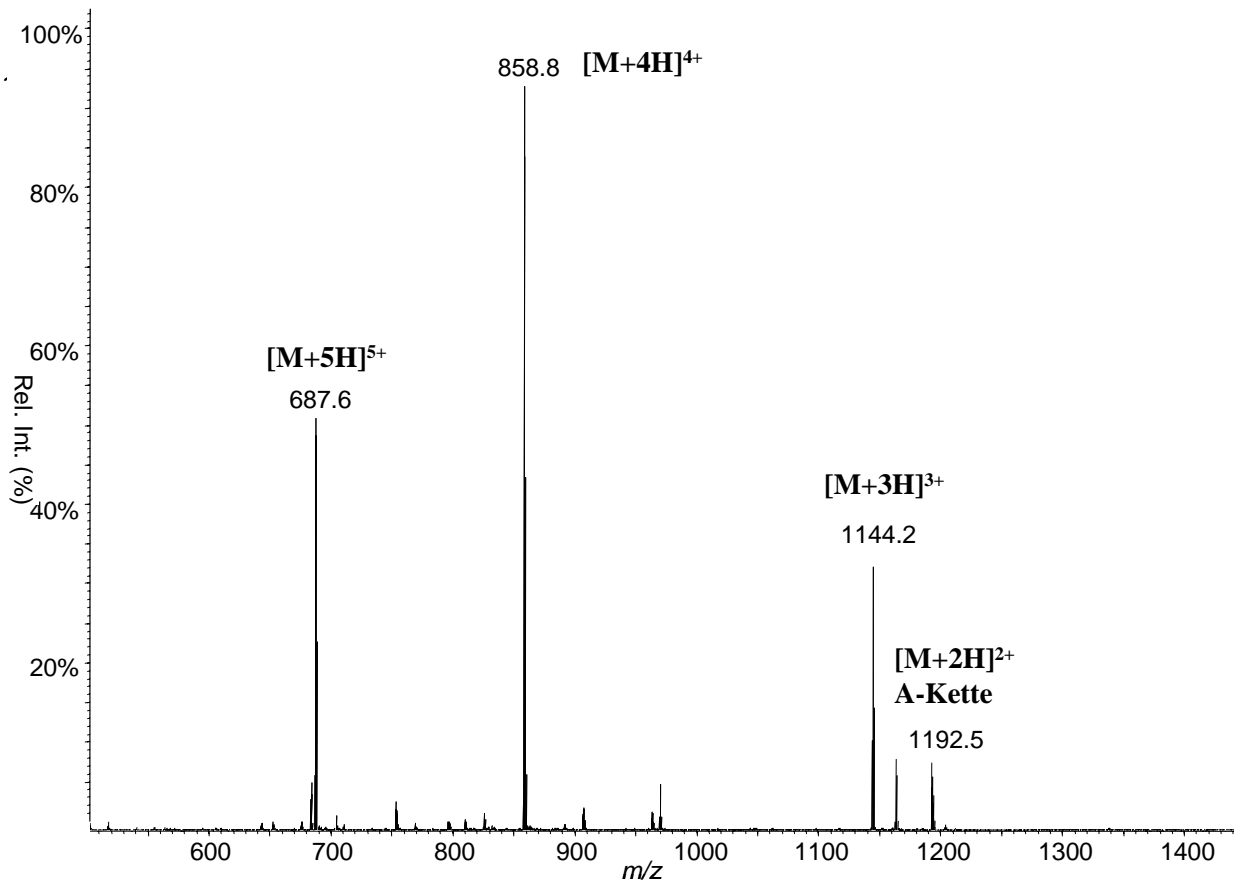
#### 4.1.2.2 Humaninsulin (reduzierte B-Kette)

Das Full-Scan-Spektrum von Humaninsulin-Referenzsubstanz im Bereich  $m/z$  500 – 1500 nach Reduktion und Spaltung der Peptid-Ketten mit TCEP-HCl zeigt ein intensives Signal bei  $m/z$  = 858,8, welches dem vierfach protonierten Quasimolekül  $[M+4H]^{4+}$  der reduzierten B-Kette von Humaninsulin zuzuordnen ist. Daneben können weitere, weniger intensive Signale bei  $m/z$  = 687,6 und 1144,2 als mehrfach geladene Moleküle  $[M+5H]^{5+}$  und  $[M+3H]^{3+}$  der B-Kette identifiziert werden (Abb. 17). Ein Quasimolekül der A-Kette ist hier zusätzlich bei  $m/z$  = 1192,5 als  $[M+2H]^{2+}$  zu erkennen, zeigt aber einen im Vergleich zum  $[M+4H]^{4+}$  der B-Kette eine etwa zehnfach niedrigere Intensität.

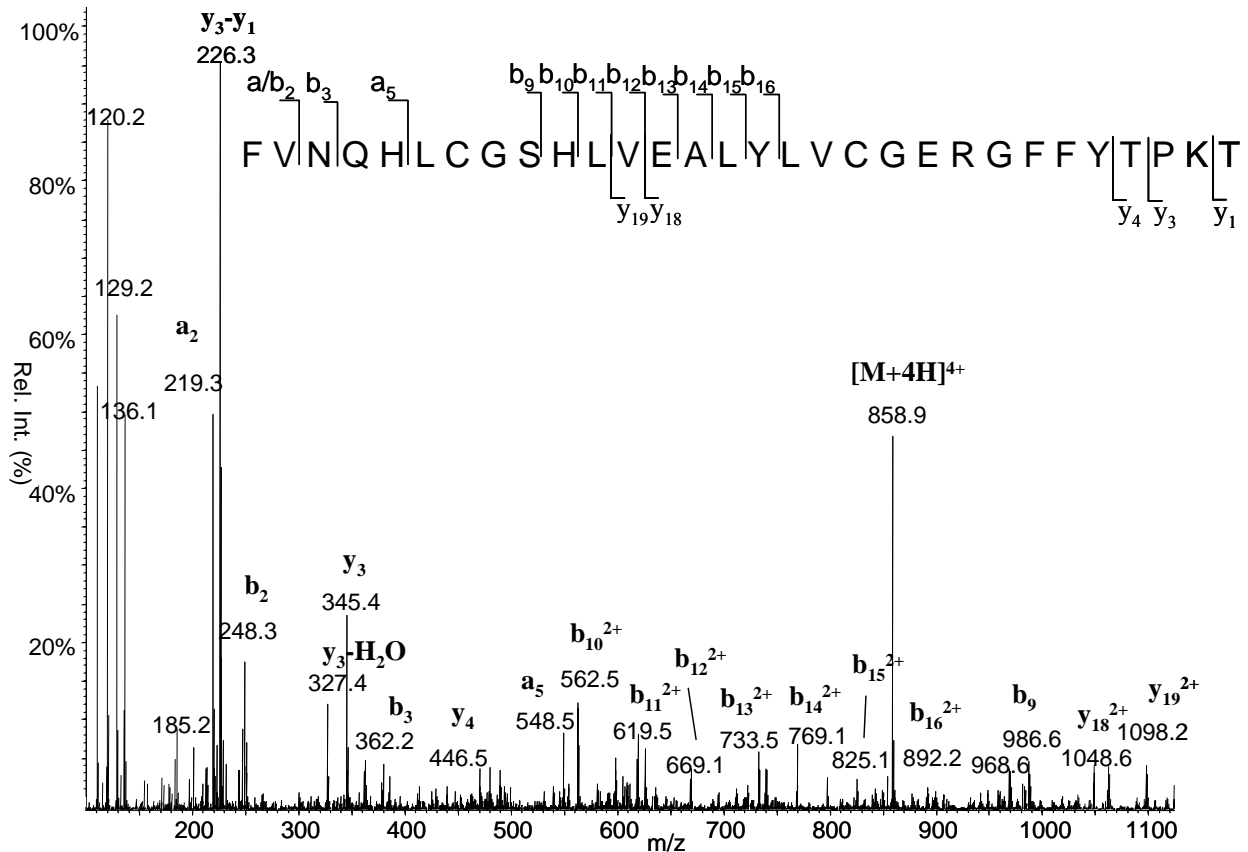
Fragmentierung des intensiven Vorläuferions  $m/z$  = 858,8 bei Kollisionsenergien von 45 eV führt zu einem aussagekräftigen Produktionen-Spektrum, wobei neben den bereits für das

intakte Humaninsulin identifizierten Fragmenten der B-Kette eine ganze Reihe zusätzlicher Produktionen identifiziert werden können (Abb. 18).

Umfangreiche Sequenzinformationen werden hierbei durch die Identifikation der doppelt geladenen Produktionen vom b-Typ (N-Terminus) bei  $m/z = 562, 619, 669, 733, 769, 825$  und  $892$  entsprechend  $b_{10}^{2+}$  bis  $b_{16}^{2+}$ , bzw. der einfach geladenen Ionen  $b_2, b_3, b_9$  und  $b_{10}$  bei  $m/z = 248, 362$  und  $987$  erhalten. Die Produktionen vom y-Typ, die der B-Kette von Humaninsulin zugeordnet werden können sind  $y_{19}^{2+}, y_{18}^{2+}, y_4, y_3, y_3-H_2O$  und  $y_3-y_1$  bei  $m/z = 1099, 1049, 446, 345, 327$  und  $226$ . Auch Fragmente vom a-Typ sind als  $a_2, a_5, a_{10}^{2+}$  und  $a_{11}^{2+}$  bei  $m/z = 219, 598$  und  $548$  im Produktionen-Spektrum der Referenzsubstanz erkennbar. Das Fehlen des Fragmentions bei  $m/z = 143$ , welches für das intakte Molekül als  $(A)_2$  identifiziert worden ist (siehe Kap. 4.1.2.1), bestätigt das Ergebnis, welches es der A-Kette zuordnet.



**Abb. 17:** ESI-Massenspektrum der reduzierten B-Kette von Humaninsulin-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülonen im drei-, vier- und fünffach protonierten Zustand bei  $m/z$  1144,2, 858,8 und 687,6. Das Signal bei  $m/z$  1192,5 repräsentiert das zweifach geladene Quasimolekülion  $[M+2H]^{2+}$  der reduzierten A-Kette.



**Abb. 18:** ESI-Produktionenspektrum des vierfach geladenen Quasimoleküls  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z$  858,9 der reduzierten B-Kette von Humaninsulin-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a-, y- und b-Typs.

#### 4.1.2.3 Humalog (intakt)

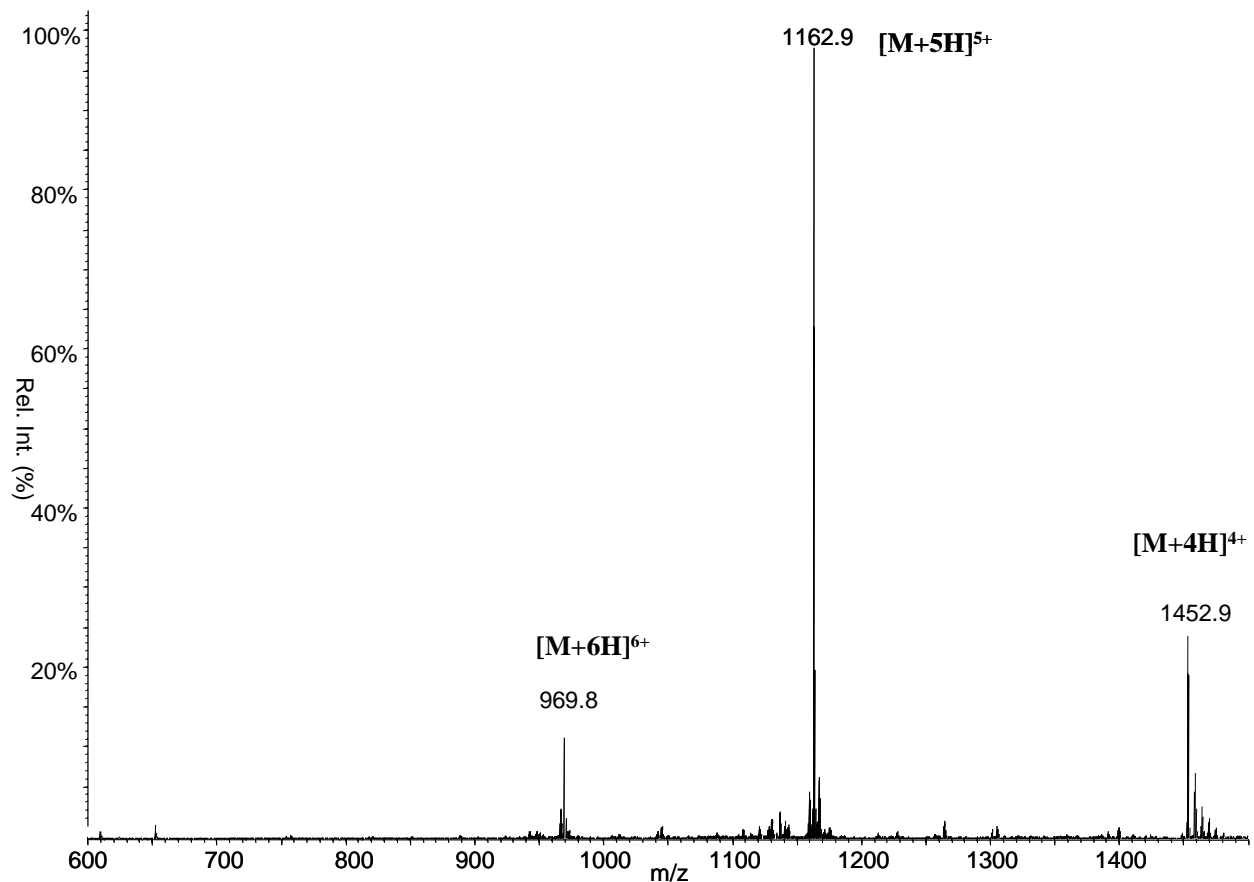
Da sich Humalog lediglich durch die Reihenfolge der Aminosäuren an Position B28/29 Lys-Pro von Humaninsulin (Pro-Lys) unterscheidet, hat es dieselbe molekulare Masse (5807 Da) und auch denselben dominierenden Ladungszustand.

Das Full-Scan-Spektrum im Bereich von  $m/z$  600 - 1500 zeigt den fünffach protonierten Ladungszustand  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z = 1162,9$  als intensivstes Signal, neben dem vierfach- $[M+4H]^{4+}$  bzw. sechsfach  $[M+6H]^{6+}$  protonierten Ladungszustand bei  $m/z = 1452,9$  bzw. 969,8 (Abb. 19).

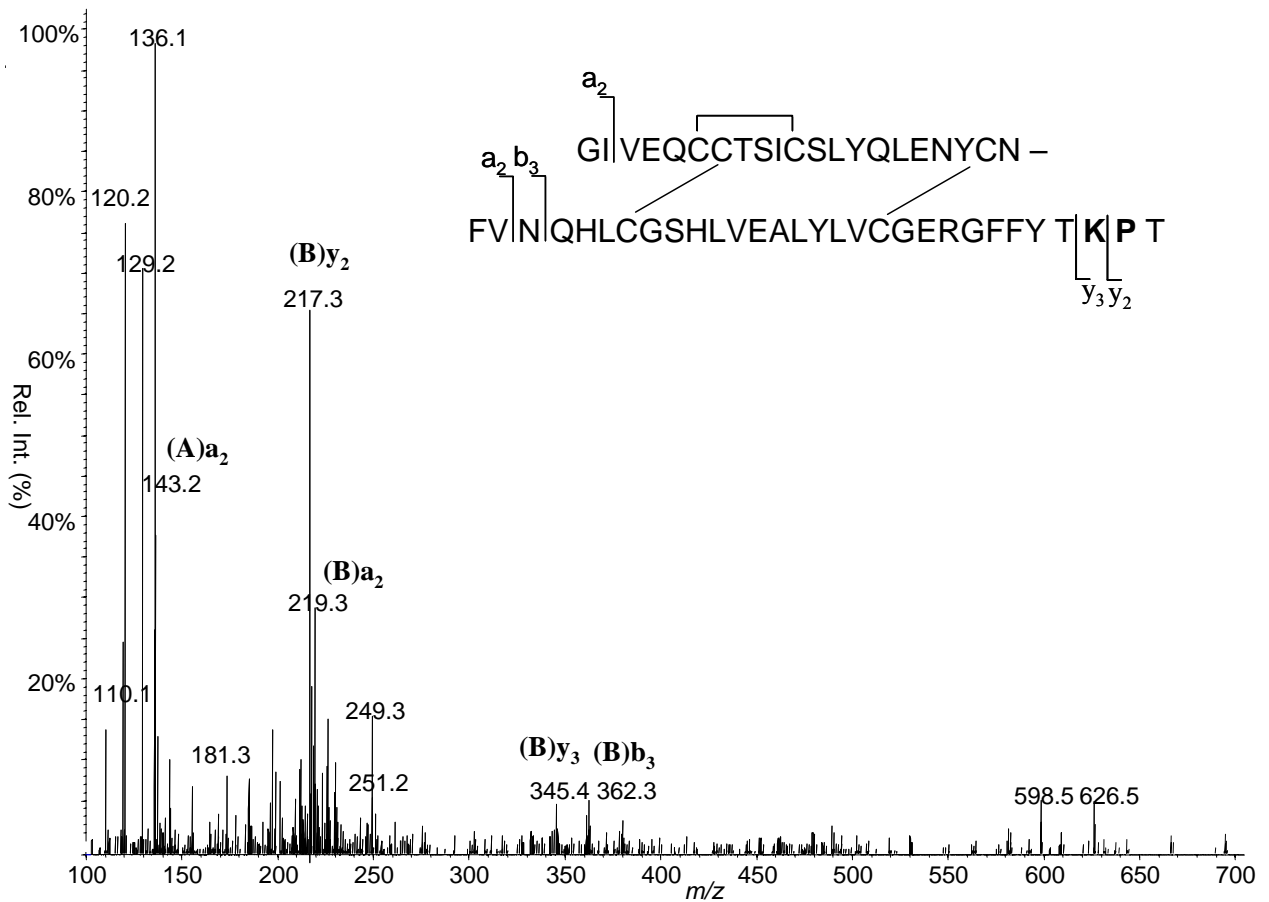
Durch CID des fünffach protonierten Quasimoleküls  $[M+5H]^{5+}$  bei Kollisionsenergien  $> 65$  eV, lassen sich im Produktionenspektrum charakteristische Fragmente aus der Aminosäuresequenz von Humalog nachweisen (Abb. 20).

Es handelt sich bei diesen Fragmenten hauptsächlich um b- und y-Ionen vom C-Terminus der B-Kette, die eine Unterscheidung gegenüber Humaninsulin ermöglichen sollen. Im Produktions-Spektrum der Humalog-Referenzsubstanz konnten die diagnostischen Ionen der B-Kette (B)<sub>y3</sub> bei  $m/z = 345$ , (B)<sub>y2</sub> bei  $m/z = 217$ , (B)<sub>b3</sub> bei  $m/z = 362$  und (B)<sub>a2</sub> bei  $m/z = 219$  identifiziert werden.

Dabei entspricht das (B)<sub>y2</sub>-Ion bei  $m/z = 217$  den Aminosäureresten B29/30 (Pro-Thr), welches in Humaninsulin so nicht vorkommen kann und eine eindeutige Unterscheidung der beiden Insuline erlaubt.



**Abb. 19:** ESI-Massenspektrum von Humalog-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülionen im vier-, fünf- und sechsfach protonierten Zustand bei  $m/z$  1453,9, 1162,9 und 969,8.



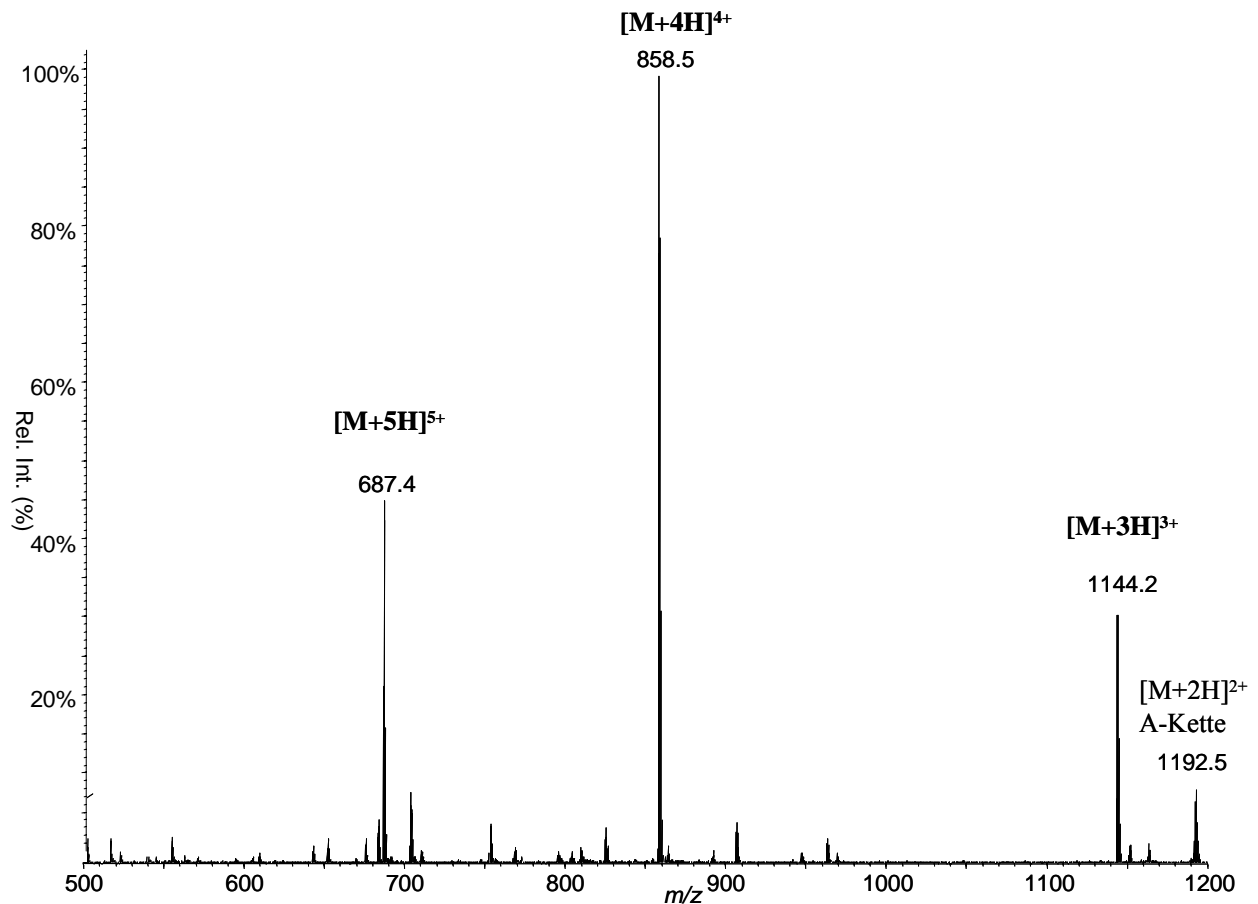
**Abb. 20:** ESI-Produktionenspektrum des fünffach geladenen Quasimoleküls  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  1162,9 von Humalog-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a-, y- und b-Typs. Modifikationen in der Aminosäuresequenz sind fett gekennzeichnet.

#### 4.1.2.4 Humalog (reduzierte B-Kette)

Im Full-Scan-Spektrum der reduzierten B-Kette von Humalog ist das vierfach protonierte Quasimolekül  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z = 858,5$  als intensivstes Signal und damit als Vorläuferion für nachfolgende Produktionen-Experimente zu erkennen (Abb.21). Bei Kollisionsenergien von 45 eV erfolgt eine ausreichende Fragmentierung, die zu einer umfangreichen massenspektrometrischen Charakterisierung der reduzierten B-Kette des schnell wirkenden Insulinanalogens herangezogen werden kann (Abb.22).

Die Generierung und Identifikation der doppelt geladenen Produktionen vom b-Typ (N-Terminus) bei  $m/z = 563, 619, 669, 733, 769, 825$  und  $892$  entsprechend  $b_{10}^{2+}$  bis  $b_{16}^{2+}$ , bzw. den einfach geladenen  $b_2, b_3$  und  $b_9$ -Ionen bei  $m/z = 248, 362$  und  $987$  erfolgt in derselben Weise wie für Humaninsulin. Die Produktionen vom y-Typ, die der B-Kette von Humalog

zugeordnet werden können sind  $y_{19}^{2+}$ ,  $y_{18}^{2+}$ ,  $y_4$  und  $y_3$  bei  $m/z = 1098$ ,  $1048$ ,  $446$  und  $345$ . Auch Fragmente vom a-Typ sind als  $a_2$ ,  $a_5$ ,  $a_{10}^{2+}$  und  $a_{11}^{2+}$  bei  $m/z = 219$ ,  $598$ ,  $548$  und  $605$  im Produktions-Spektrum der Referenzsubstanz erkennbar. Als intensivstes Fragmentation wird unter den gewählten Bedingungen das  $y_2$ -Ion bei  $m/z = 217$  detektiert, welches durch eine typische Prolin-gesteuerte Fragmentierung entsteht und, wie bereits für das intakte Peptid (siehe Kap. 4.1.2.3), die Unterscheidung von Humaninsulin ermöglicht [124].



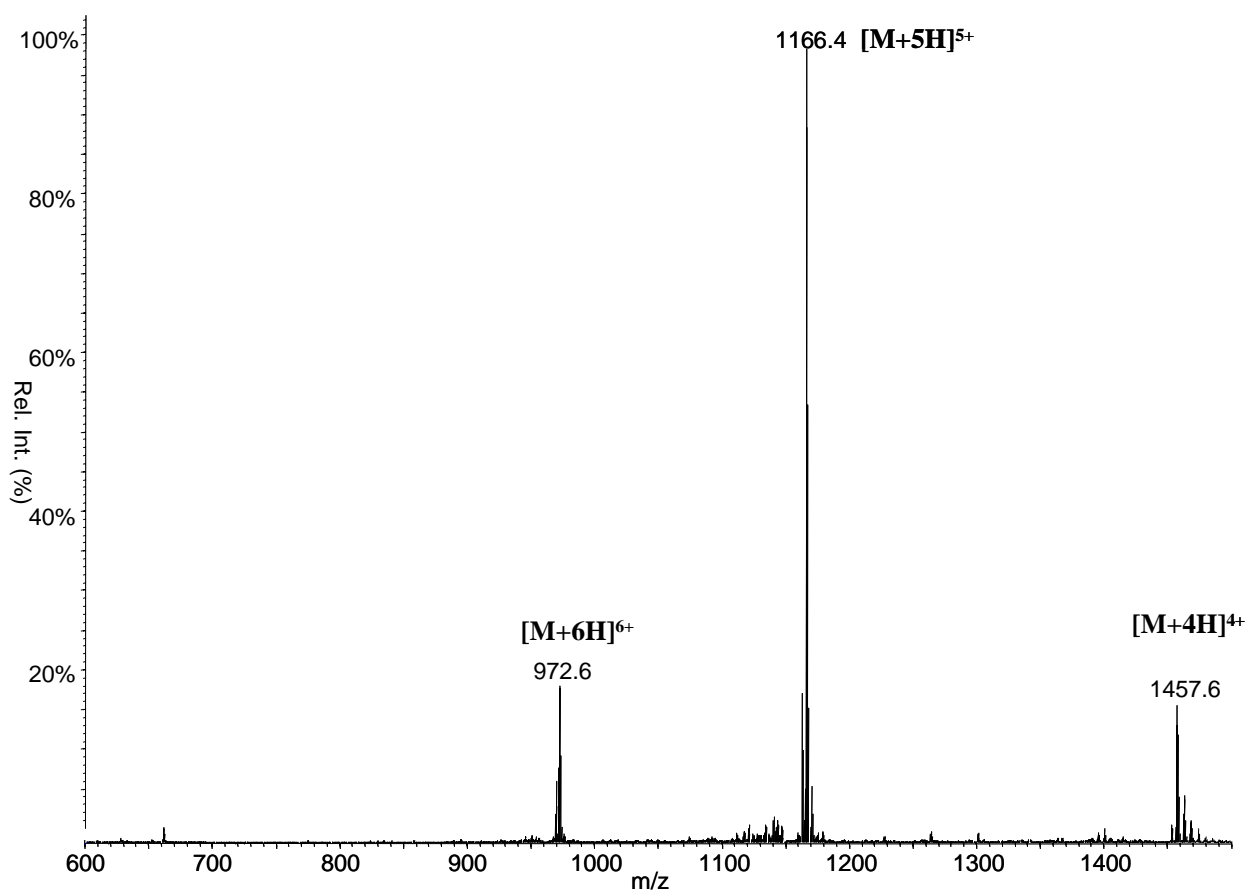
**Abb. 21:** ESI-Massenspektrum der reduzierten B-Kette von Humalog-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülonen im drei-, vier- und fünffach protonierten Zustand bei  $m/z$  1144,2, 858,5 und 687,4.



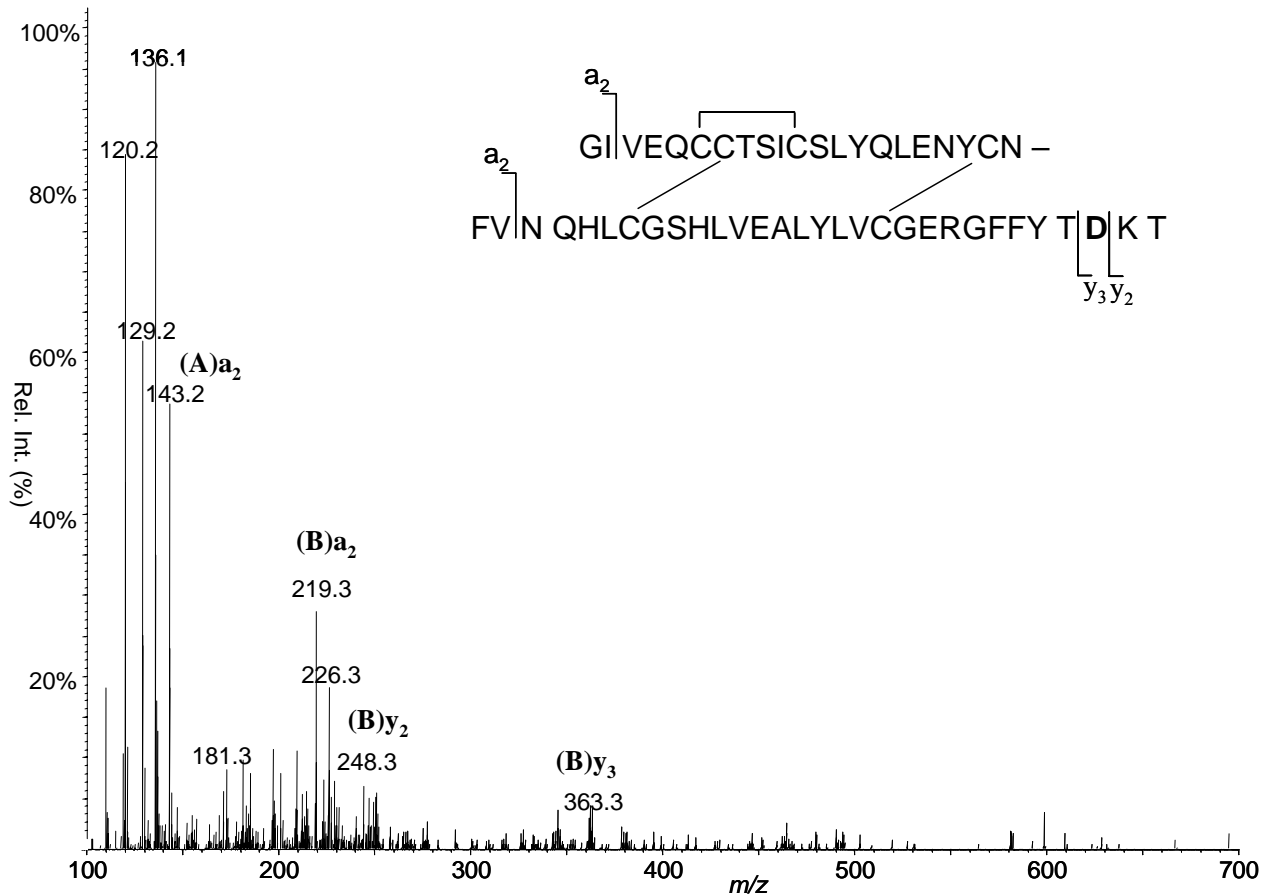


Ionenfalle charakteristische Fragmente aus der Aminosäuresequenz von Novolog nachweisen (Abb. 24).

Auch bei diesen Fragmenten handelt es sich hauptsächlich um  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Ionen aus beiden Insulin-Ketten, neben den in Kap. 4.1.2.1 beschriebenen Immoniumionen bei  $m/z$  120, 129 und 136. Als diagnostische Produktionen der B-Kette konnten im Spektrum der Novolog-Referenzsubstanz (B) $y_3$  bei  $m/z = 363$ , (B) $y_2$  bei  $m/z = 248$  und (B) $a_2$  bei  $m/z = 219$  identifiziert werden. Als charakteristisches A-Ketten-Fragment erscheint, wie bereits bei HI und Humalog, ein intensives Signal bei  $m/z = 143$  für das (A) $a_2$ -Produktion.



**Abb. 23:** ESI-Massenspektrum von Novolog-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülonen im vier-, fünf- und sechsfach protonierten Zustand bei  $m/z$  1457,6, 1166,4 und 972,6.



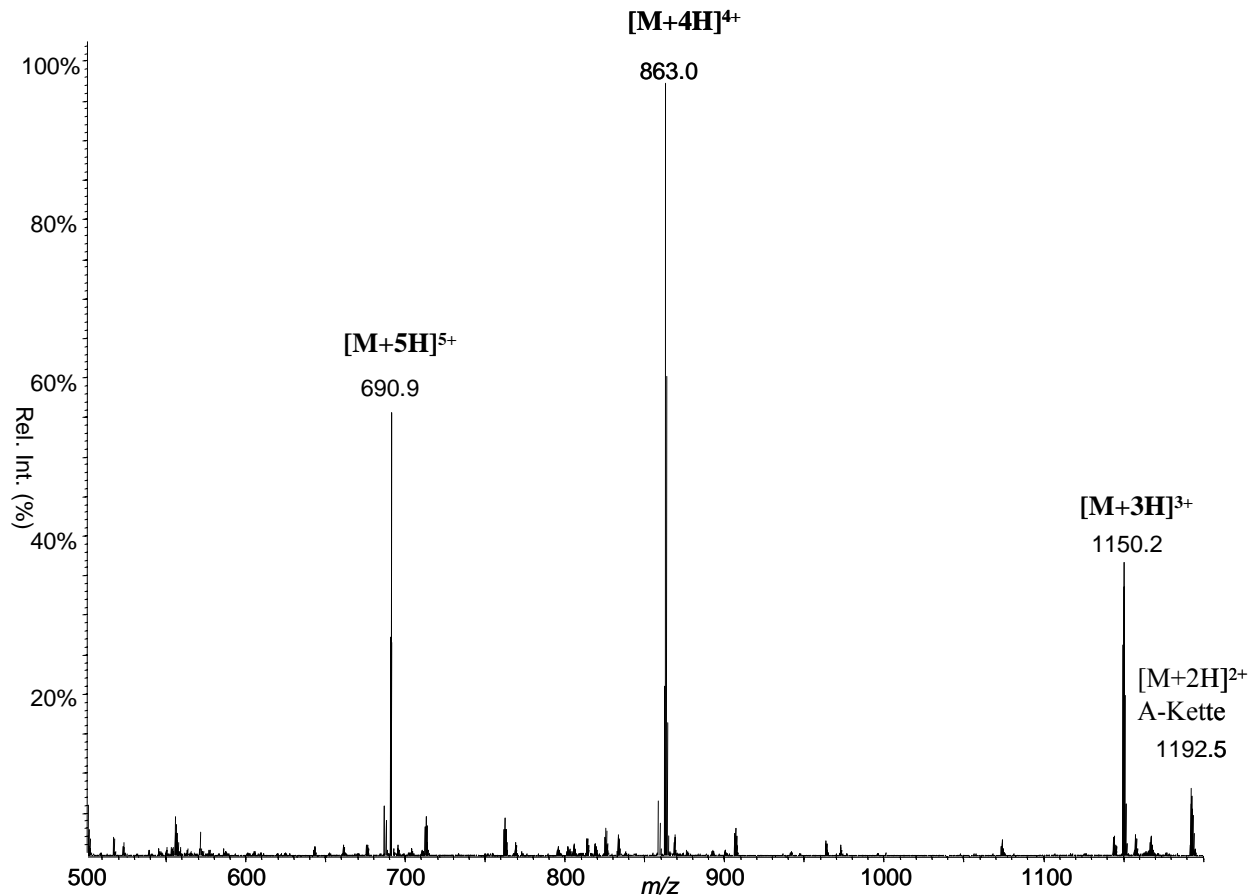
**Abb. 24:** ESI-Produktionenspektrum des fünffach geladenen Quasimoleküls  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  1166,4 von Novolog-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a- und y-Typs. Modifikationen in der Aminosäuresequenz sind fett gekennzeichnet.

#### 4.1.2.6 Novolog (reduzierte B-Kette)

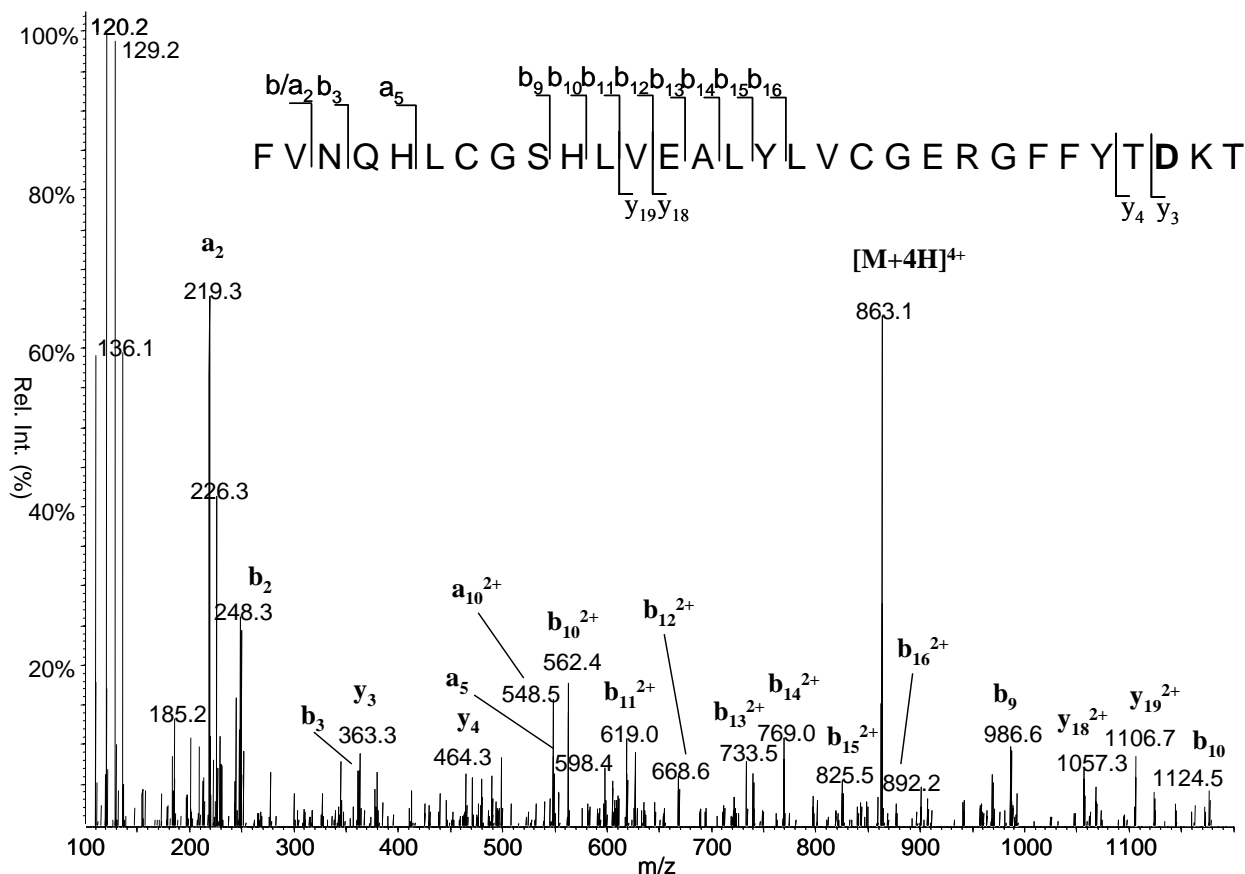
Nach Reduktion mit TCEP-HCl weist das Full-Scan-Spektrum der reduzierten B-Kette von Novolog das vierfach protonierte Quasimolekülion  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z = 863,0$  als intensivstes Signal und damit als Vorläuferion für nachfolgende Produktionen-Experimente aus (Abb. 25). Mit Kollisionsenergien von 45 eV erfolgt eine ausreichende Fragmentierung, die zu einer massenspektrometrischen Charakterisierung der reduzierten B-Kette des schnell wirkenden Insulinanalogen herangezogen werden kann (Abb. 26).

Die Identifikation der doppelt geladenen Produktionen vom b-Typ bei  $m/z = 562, 619, 669, 733, 769, 825$  und  $892$  entsprechend  $b_{10}^{2+}$  bis  $b_{16}^{2+}$ , bzw. den einfach geladenen  $b_2, b_3, b_9$  und  $b_{10}$ -Ion bei  $m/z = 248, 362, 987$  und  $1124$  erfolgt in derselben Weise wie für Humaninsulin. Die Produktionen vom y-Typ, die der B-Kette von Humalog zugeordnet werden können, sind

$y_{19}^{2+}$ ,  $y_{18}^{2+}$ ,  $y_4$  und  $y_3$  bei  $m/z = 1107, 1057, 464$  und  $363$ . Auch Fragmente vom a-Typ sind als  $a_2$ ,  $a_5$ ,  $a_{10}^{2+}$  und  $a_{11}^{2+}$  bei  $m/z = 219, 598, 548$  und  $605$  im Produktions-Spektrum der Referenzsubstanz erkennbar.



**Abb. 25:** ESI-Massenspektrum der reduzierten B-Kette von Novolog-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülonen im drei-, vier- und fünffach protonierten Zustand bei  $m/z$  1150,2, 863,0 und 690,9.



**Abb. 26:** ESI-Produktionenspektrum des vierfach geladenen Quasimoleküls  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z$  863,1 der reduzierten B-Kette von Novolog-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a-, y- und b-Typs. Modifikationen in der Aminosäuresequenz sind fett gekennzeichnet.

#### 4.1.2.7 Apidra (intakt)

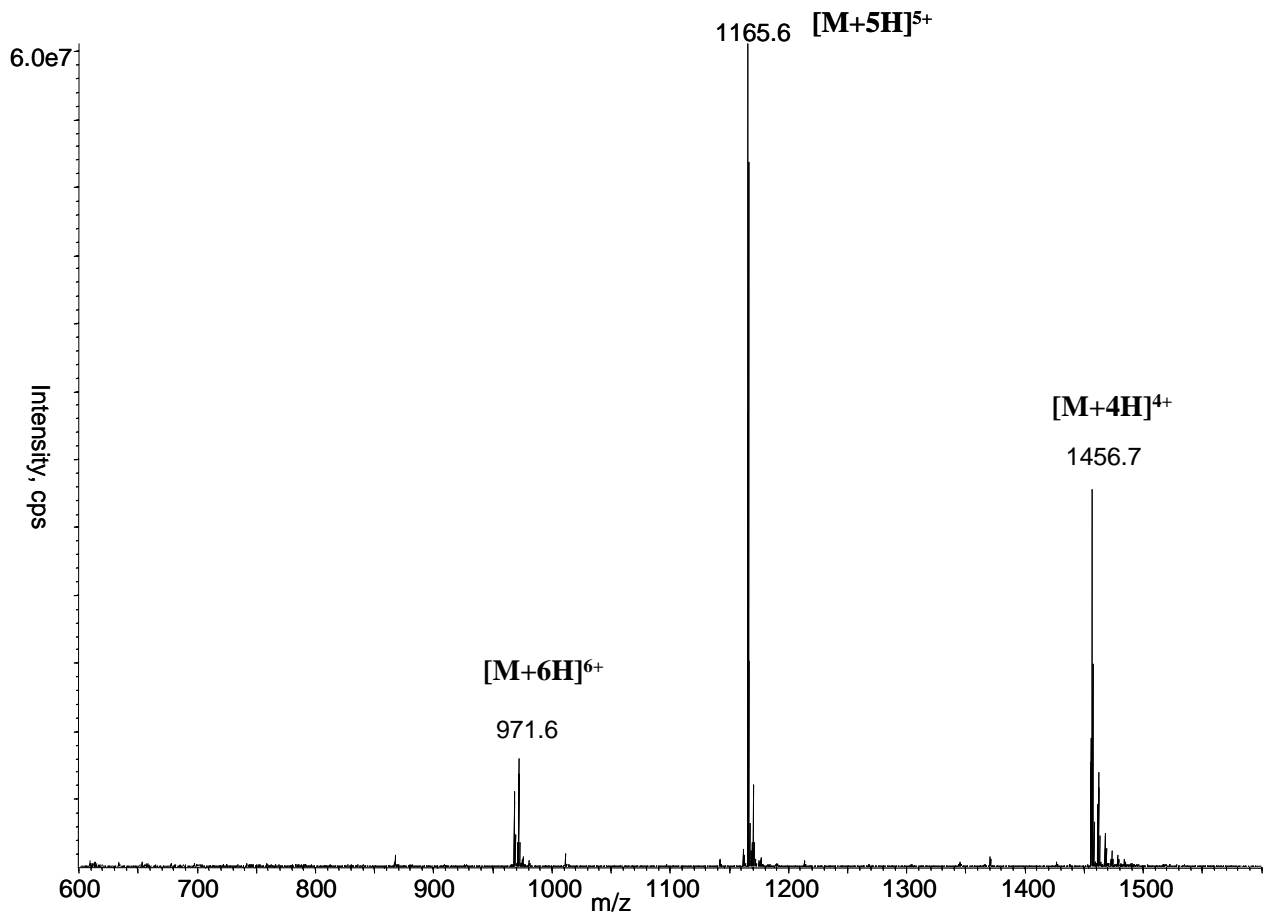
Das Analoge Apidra unterscheidet sich von HI durch den Austausch der Aminosäuren an Position B3 (Asparagin zu Lysin) und Position B29 (Lysin zu Glutaminsäure) und besitzt dadurch ebenfalls eine höhere molekulare Masse von 5823 Da.

Im Full-Scan-Spektrum im Bereich von  $m/z$  600 - 1500 zeigt sich als intensivstes Signal der fünffach protonierte Ladungszustand  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  = 1165,6, neben dem vierfach- $[M+4H]^{4+}$  bzw. sechsfach  $[M+6H]^{6+}$  protonierten Ladungszustand bei  $m/z$  = 1456,7 bzw. 971,6 (Abb. 27).

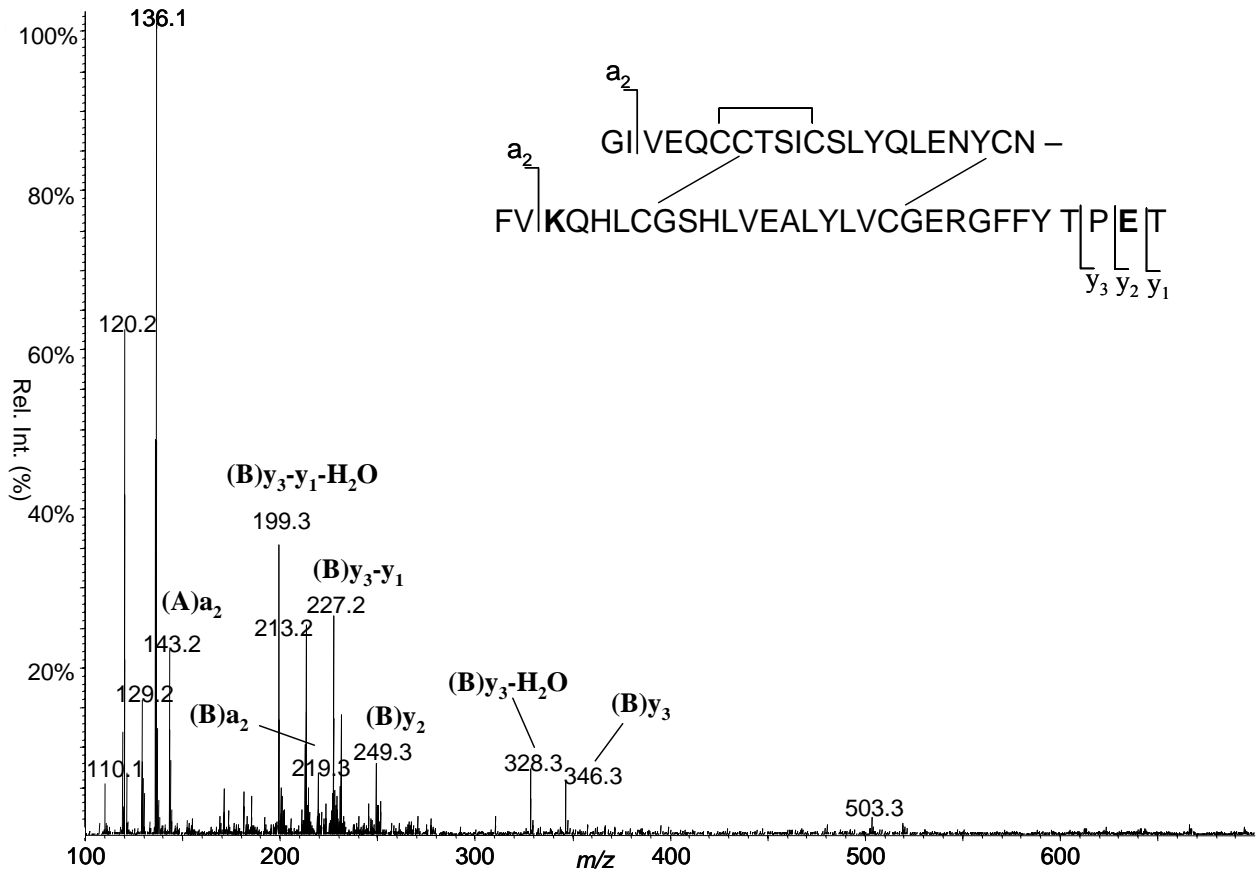
Durch kollisionsinduzierte Fragmentierung des fünffach protonierten Quasimoleküls bei  $m/z$  = 1165 entsprechend  $[M+5H]^{5+}$  bei Kollisionsenergien  $> 65$  eV, lassen sich im

Produktionen-Spektrum der linearen Ionenfalle charakteristische Fragmente aus der Aminosäuresequenz von Apidra nachweisen (Abb. 28).

Es handelt sich bei diesen Fragmenten wiederum hauptsächlich um  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Ionen vom C-Terminus der B-Kette. So konnten im Produktionen-Spektrum der Apidra-Referenzsubstanz die diagnostischen Ionen der B-Kette (B) $y_3$  bei  $m/z = 346$ , (B) $y_3$ -H<sub>2</sub>O bei  $m/z = 328$ , (B) $y_2$  bei  $m/z = 249$ , (B) $y_3$ - $y_1$  bei  $m/z = 227$ , (B) $y_3$ - $y_1$ -H<sub>2</sub>O bei  $m/z = 199$  und (B) $a_2$  bei  $m/z = 219$  identifiziert werden. In weiterführenden MS<sup>3</sup>-Experimenten konnte die Identifizierung des Fragments bei  $m/z = 199$  als (B) $y_3$ - $y_1$ -H<sub>2</sub>O bestätigt werden, indem in Q1 zunächst das Quasimolekülion bei  $m/z = 1165,7$  und in der LIT anschließend das Produktion bei  $m/z = 227$  isoliert und fragmentiert werden konnte. Als charakteristisches A-Ketten-Fragment wird, wie bereits bei HI und Humalog, ein intensives Signal bei  $m/z = 143$  für das (A) $a_2$  detektiert.



**Abb. 27:** ESI-Massenspektrum von Apidra-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülionen im vier-, fünf- und sechsfach protonierten Zustand bei  $m/z$  1456,7, 1165,6 und 971,6.



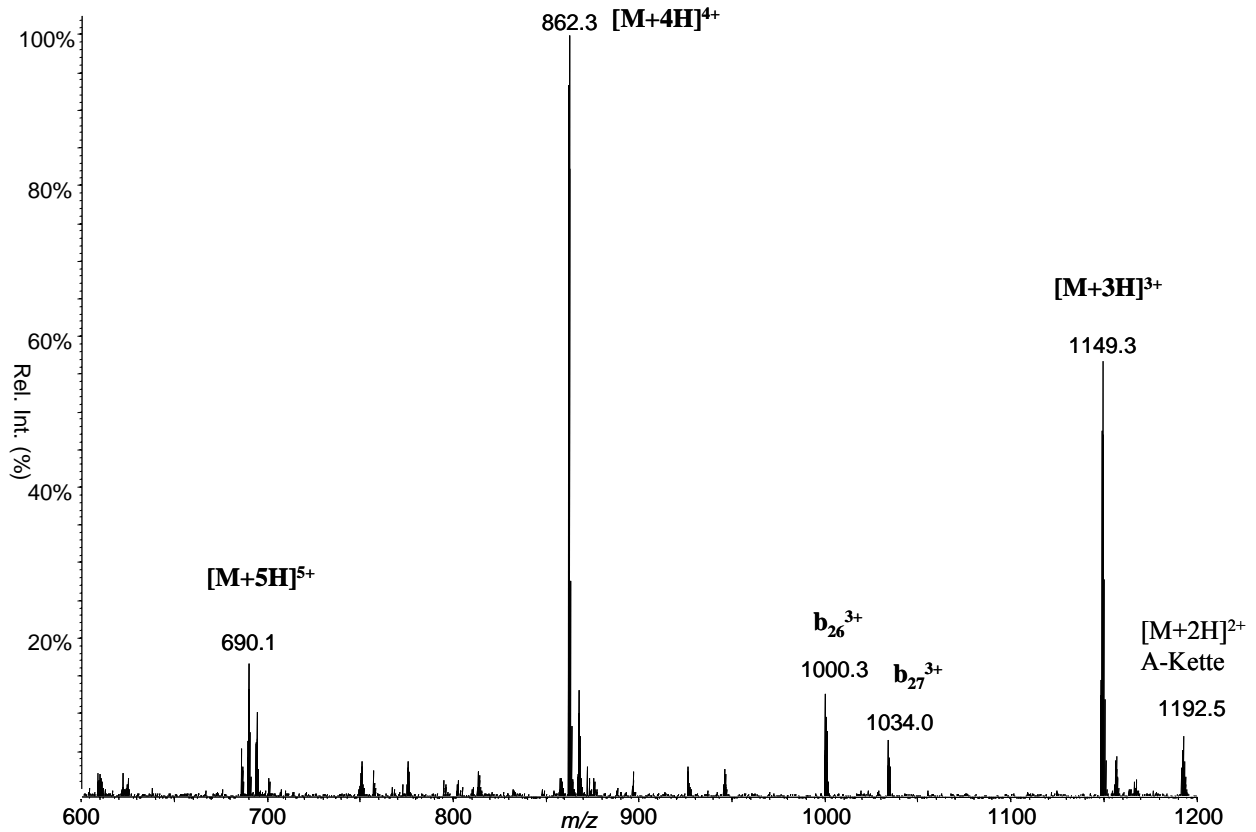
**Abb. 28:** ESI-Produktionenspektrum des fünffach geladenen Quasimoleküls  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  1165,6 von Apidra-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a- und y-Typs. Modifikationen in der Aminosäuresequenz sind fett gekennzeichnet.

#### 4.1.2.8 Apidra (reduzierte B-Kette)

Im Full-Scan-Spektrum der B-Kette von Apidra nach Reduktion erscheint das vierfach protonierte Quasimolekül  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z = 862,3$  als intensivstes Signal und wird anschließend als Vorläuferion für nachfolgende Produktionen-Experimente ausgewählt (Abb. 29). Bei Kollisionsenergien von 45 eV erfolgt eine Fragmentierung, die zur umfangreichen massenspektrometrischen Charakterisierung der reduzierten B-Kette des Insulinanalogens herangezogen werden kann (Abb. 30).

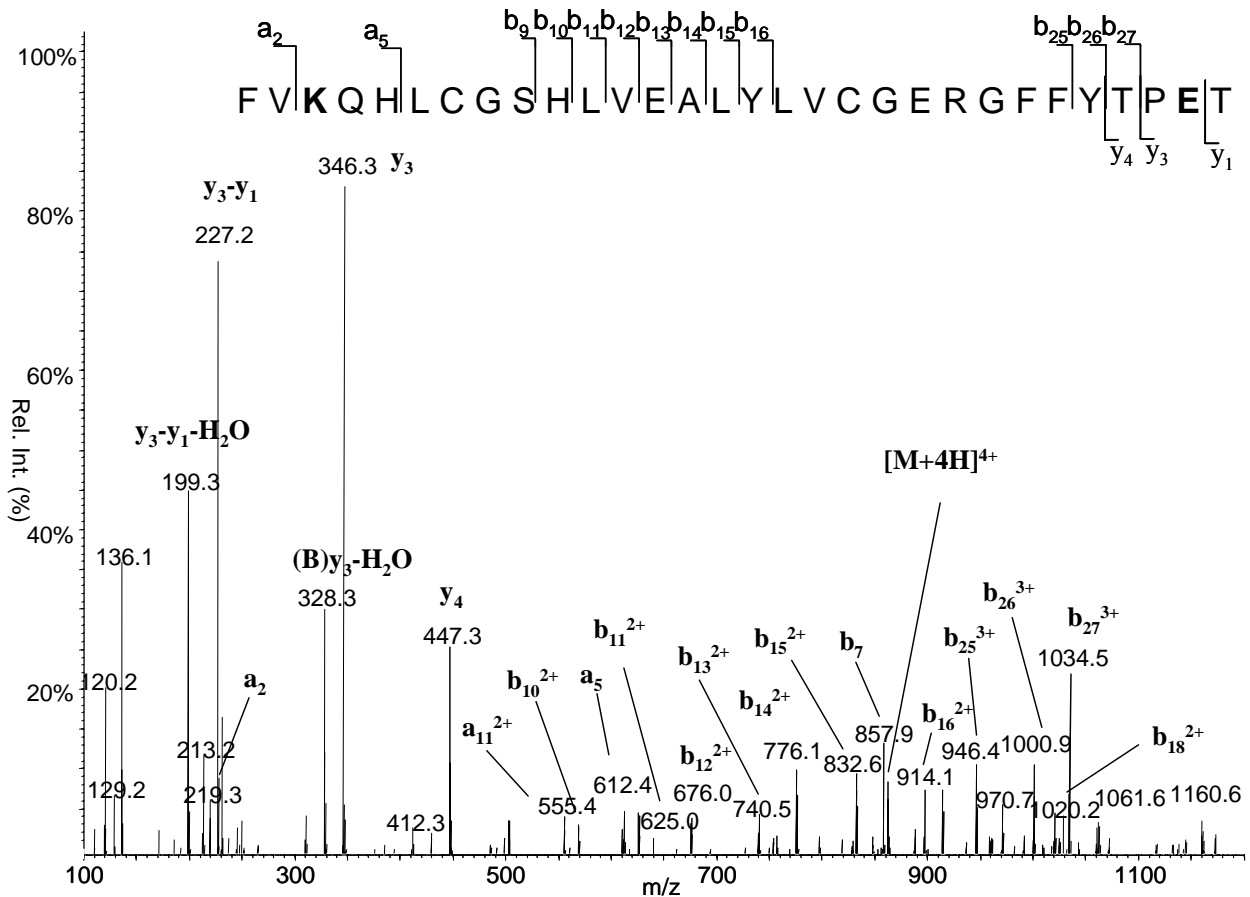
Die Identifikation der doppelt geladenen Produktionen vom b-Typ (N-Terminus) bei  $m/z = 569, 625, 676, 740, 776, 833, 914, 971$  und  $1020$  entsprechend  $b_{10}^{2+}$  bis  $b_{18}^{2+}$ , bzw. den dreifach geladenen Ionen  $b_{25}^{3+}$ ,  $b_{26}^{3+}$  und  $b_{27}^{3+}$  bei  $m/z = 946, 1001$  und  $1034$  entsprechen der bekannten Aminosäuresequenz mit der Modifikation am N-Terminus der B-Kette. Die Produktionen vom y-Typ, die der B-Kette von Apidra zugeordnet werden können sind  $y_4, y_3, y_3-H_2O, y_3-y_1$  und  $y_3-y_1-H_2O$  bei  $m/z = 447, 346, 328, 227$  und  $199$ . Auch Fragmente vom a-

Typ sind als  $a_2$ ,  $a_5$  und  $a_{11}^{2+}$  bei  $m/z = 219$ ,  $612$  und  $555$  im Produktions-Spektrum der Referenzsubstanz erkennbar.



**Abb. 29:** ESI-Massenspektrum der reduzierten B-Kette von Apidra-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülonen im drei-, vier- und fünffach protonierten Zustand bei  $m/z$  1149,3, 862,3 und 690,1.





**Abb. 30:** ESI-Produktionenspektrum des vierfach geladenen Quasimoleküls  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z$  862,3 der reduzierten B-Kette von Apidra-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a-, y- und b-Typs. Modifikationen in der Aminosäuresequenz sind fett gekennzeichnet.

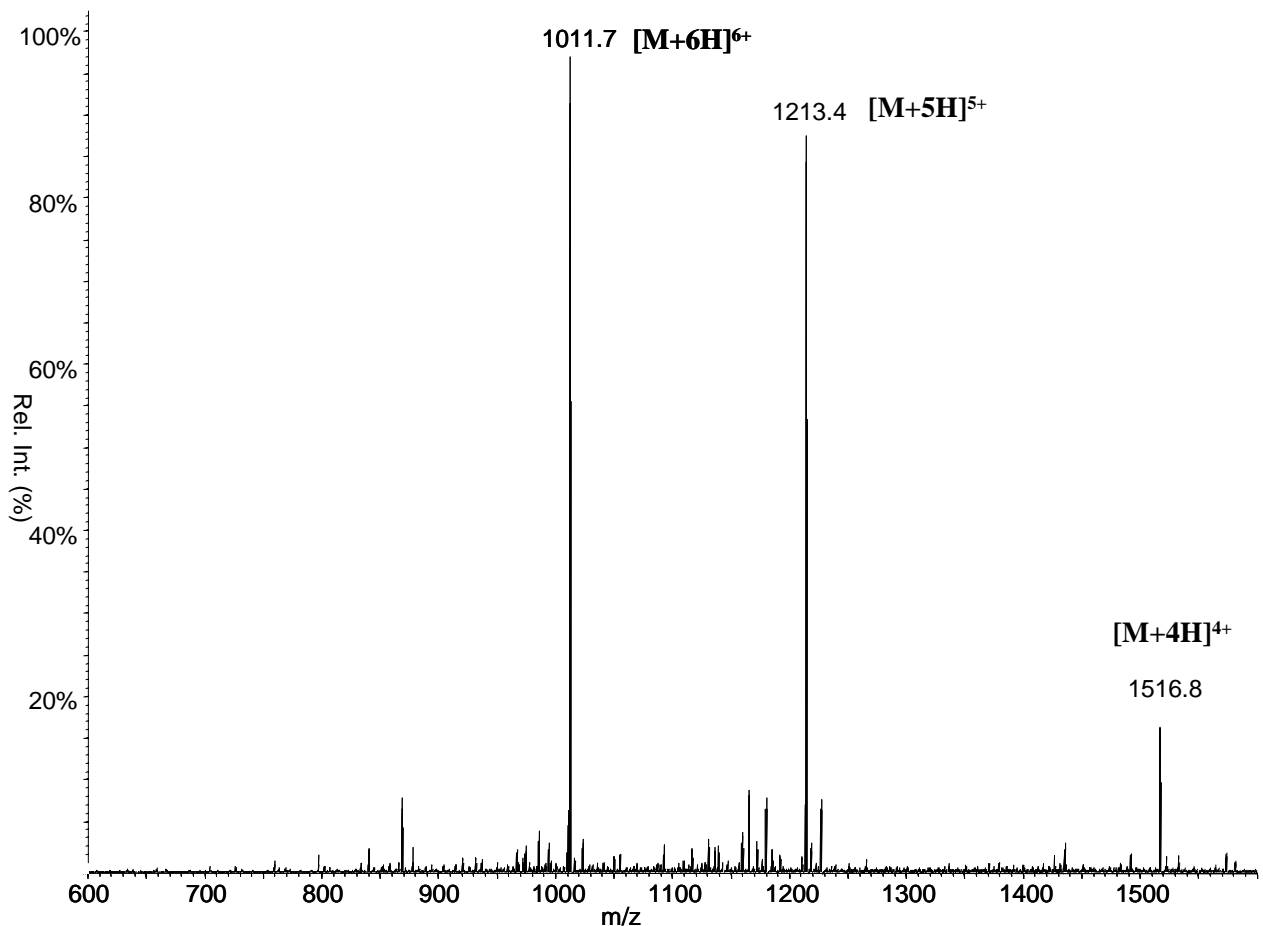
#### 4.1.2.9 Lantus (intakt)

Lantus unterscheidet sich von HI durch den Austausch der Aminosäure an Position A21 Asparaginsäure zu Glycin und zwei zusätzliche Arginin-Reste an Position B31+32. Es besitzt dadurch ebenfalls eine höhere molekulare Masse von 6063 Da.

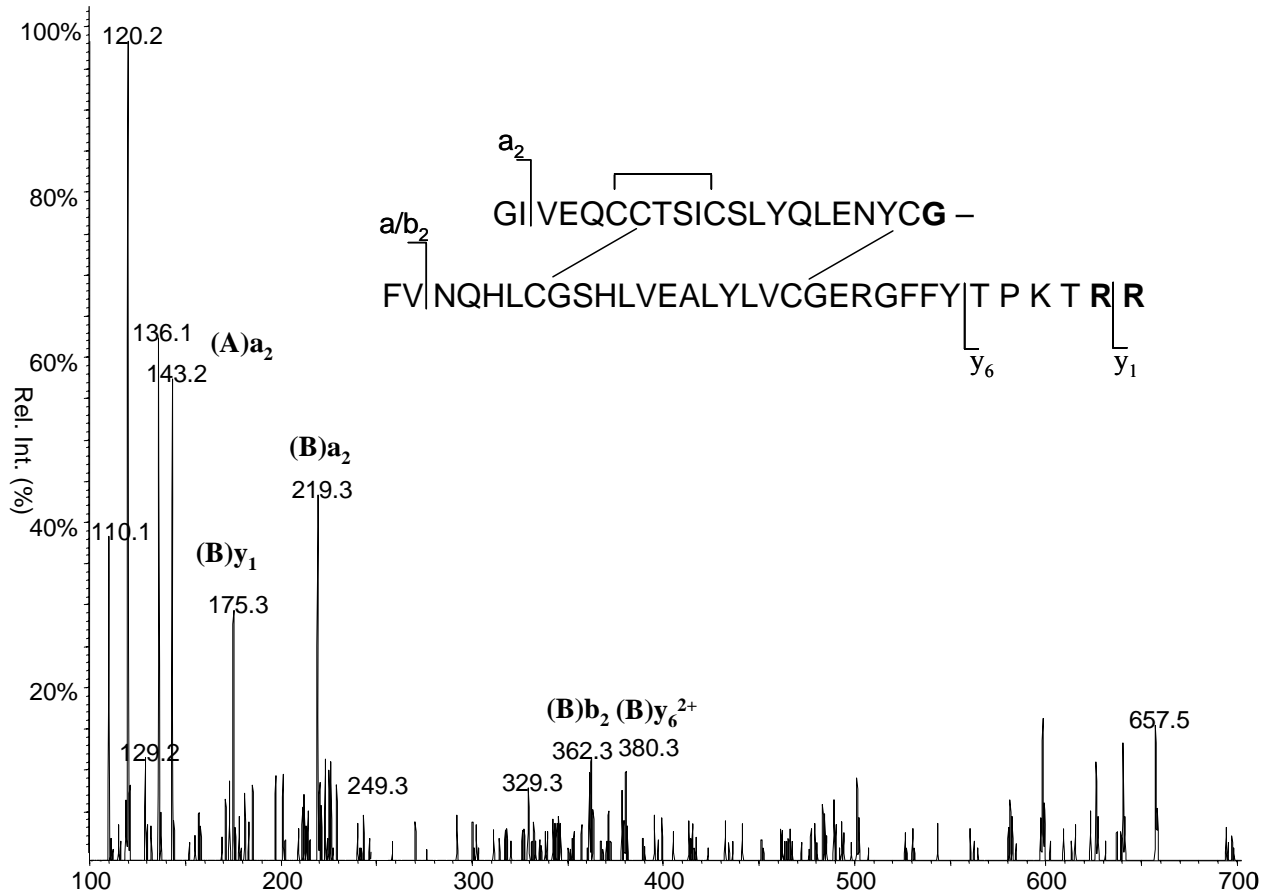
Im Full-Scan-Spektrum im Bereich von  $m/z$  600 - 1500 zeigt sich der sechsfach protonierte Ladungszustand  $[M+6H]^{6+}$  bei  $m/z = 1011,7$  als intensivstes Signal, neben dem nicht sehr viel weniger intensiven fünffach-  $[M+5H]^{5+}$  bzw. vierfach  $[M+4H]^{4+}$  protonierten Ladungszustand bei  $m/z = 1213,4$  bzw. 1516,8 (Abb. 31). Für die Fragmentierung wurde jedoch das fünffach protonierte Quasimolekül ausgewählt, da für die höhere Masse ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Produktionen-Chromatogramm beobachtet worden ist.

Durch kollisionsinduzierte Fragmentierung des Quasimoleküls bei  $m/z = 1213,4$  entsprechend  $[M+5H]^{5+}$  bei Kollisionsenergien  $> 65$  eV lassen sich im Produktions-Spektrum mit Hilfe der linearen Ionenfalle charakteristische Fragmente aus der Aminosäuresequenz von Lantus nachweisen (Abb. 32).

Es handelt sich bei diesen Fragmenten wiederum hauptsächlich um a-, b- und y-Ionen der B-Kette. So konnten im Produktions-Spektrum der Lantus-Referenzsubstanz die diagnostischen Ionen der B-Kette  $(B)y_6^{2+}$  bei  $m/z = 380$ ,  $(B)y_1$  bei  $m/z = 175$ ,  $(B)b_2$  bei  $m/z = 362$  und  $(B)a_2$  bei  $m/z = 219$  identifiziert werden. Als charakteristisches A-Ketten-Fragment ist, wie bereits bei HI, Novolog und Humalog, ein intensives Signal bei  $m/z = 143$  für das  $(A)a_2$  detektiert.



**Abb. 31:** ESI-Massenspektrum von Lantus-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimoleküle im vier-, fünf- und sechsfach protonierten Zustand bei  $m/z$  1516,8, 1213,4 und 1011,7.



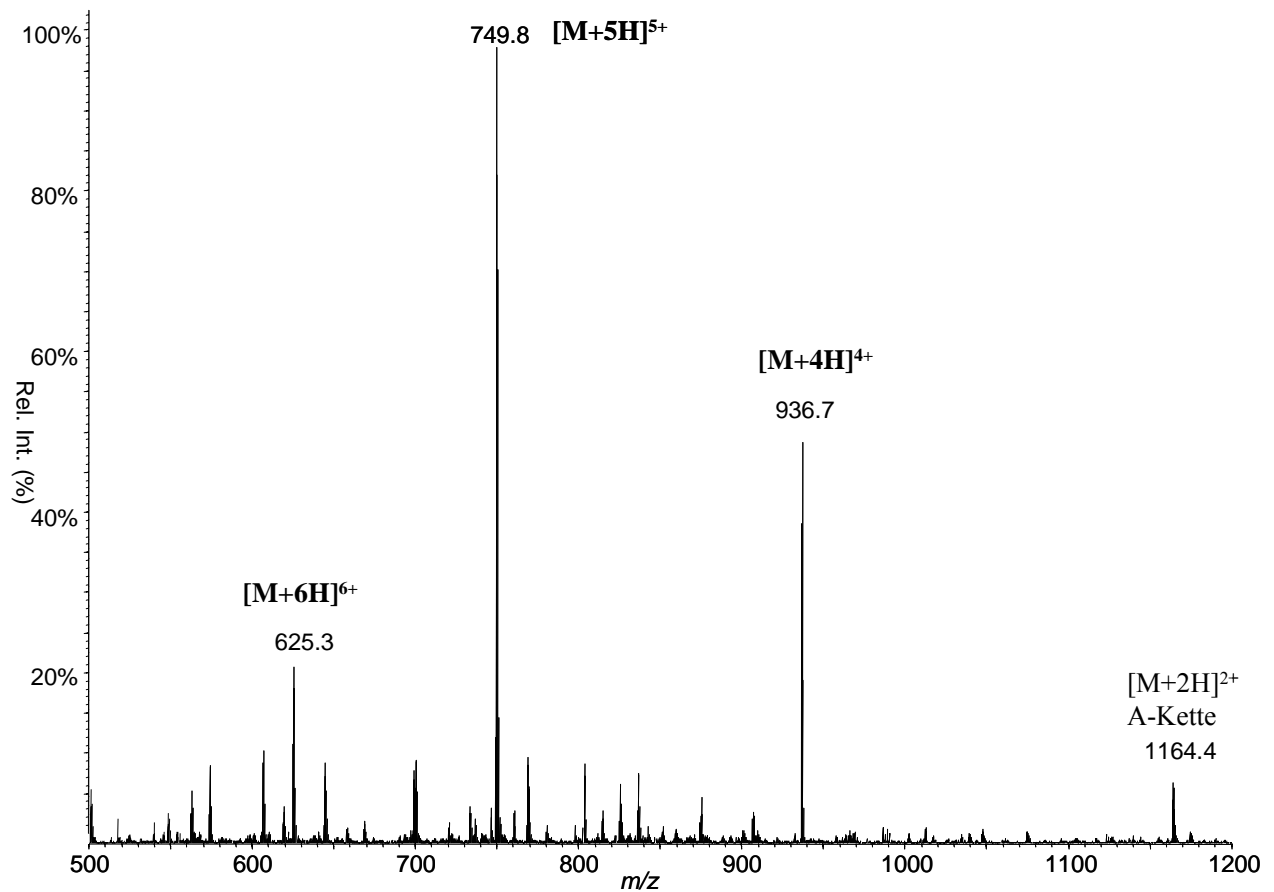
**Abb. 32:** ESI-Produktionenspektrum des fünffach geladenen Quasimoleküls  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  1213,4 von Lantus-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a-, y- und b-Typs. Modifikationen in der Aminosäuresequenz sind fett gekennzeichnet.

#### 4.1.2.10 Lantus (reduzierte B-Kette)

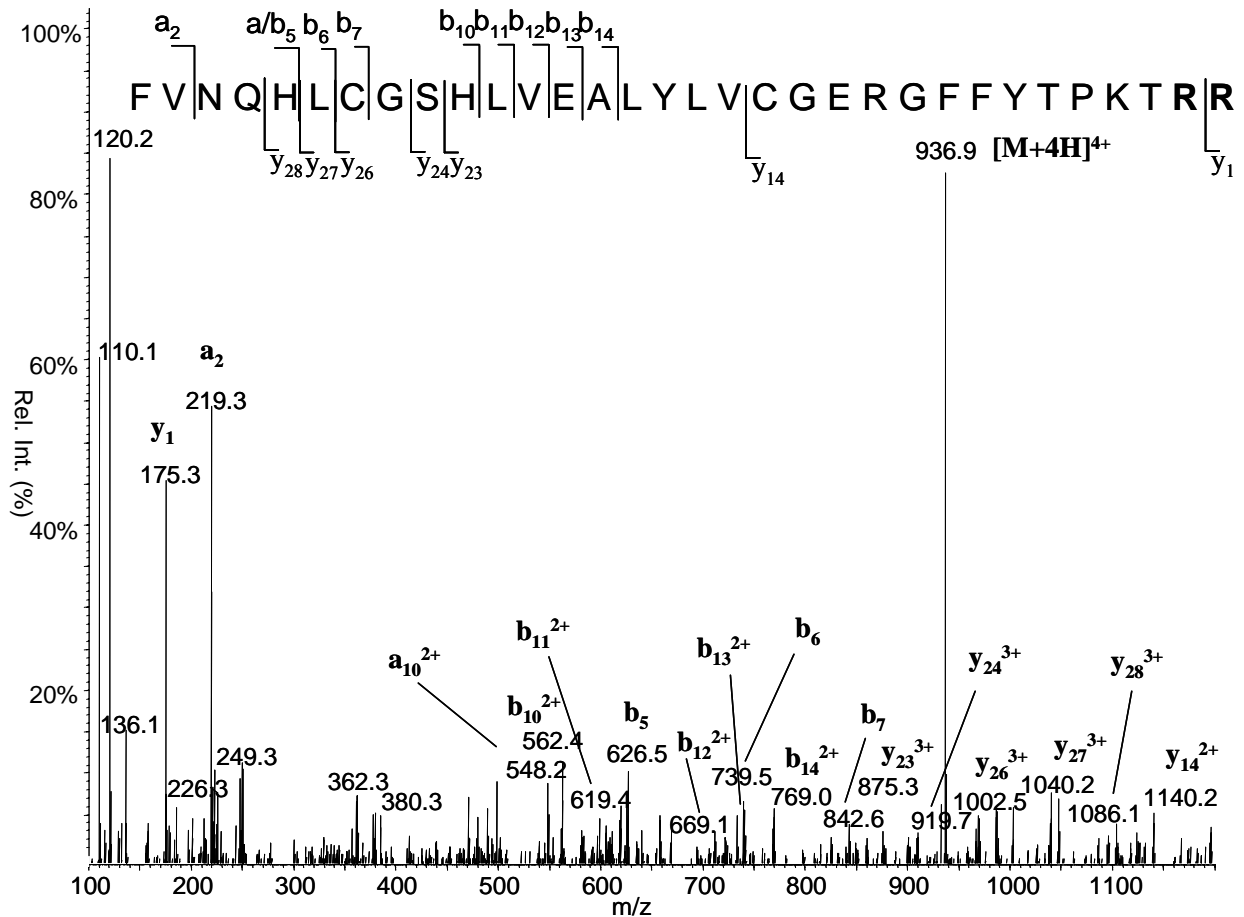
Im Full-Scan-Spektrum der reduzierten B-Kette von Lantus ist das vierfach protonierte Quasimolekül  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z = 936,7$  nicht als intensivstes Signal zu erkennen. Aufgrund des besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wird es jedoch dem fünffach geladenen Molekül vorgezogen und als Vorläuferion für nachfolgende Produktionsexperimente ausgewählt (Abb. 33). Bei Kollisionsenergien von 45 eV erfolgt eine ausreichende Fragmentierung, die zu einer umfangreichen massenspektrometrischen Charakterisierung der reduzierten B-Kette des lang wirkenden Insulinanalogens herangezogen werden kann (Abb. 34).

Die Identifikation der doppelt geladenen Produktionen vom b-Typ (N-Terminus) bei  $m/z = 562, 619, 669, 733$  und  $769$  entsprechend  $b_{10}^{2+}$  bis  $b_{14}^{2+}$ , bzw. den einfach geladenen  $b_5, b_6$

und  $b_7$  bei  $m/z = 626, 739$  und  $843$  entsprechen den jeweiligen Fragmenten von HI, weil der N-Terminus der B-Kette keine Modifikation trägt. Die Produktionen vom y-Typ, die der B-Kette von Lantus zugeordnet werden können sind  $y_1, y_{14}^{2+}, y_{23}^{3+}, y_{24}^{3+}, y_{26}^{3+}$  und  $y_{28}^{3+}$  bei  $m/z = 175, 1140, 875, 920, 1002, 1040$  und  $1086$ . Auch Fragmente vom a-Typ sind als  $a_2$  und  $a_{10}^{2+}$  bei  $m/z = 219$  und  $548$  im Produktions-Spektrum der Referenzsubstanz erkennbar.



**Abb. 33:** ESI-Massenspektrum der reduzierten B-Kette von Lantus-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülonen im vier-, fünf- und sechsfach protonierten Zustand bei  $m/z$  936,7, 749,8 und 625,3.



**Abb. 34:** ESI-Produktionenspektrum des vierfach geladenen Quasimoleküls  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z$  936,9 der reduzierten B-Kette von Lantus-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a-, y- und b-Typs. Modifikationen in der Aminosäuresequenz sind fett gekennzeichnet.

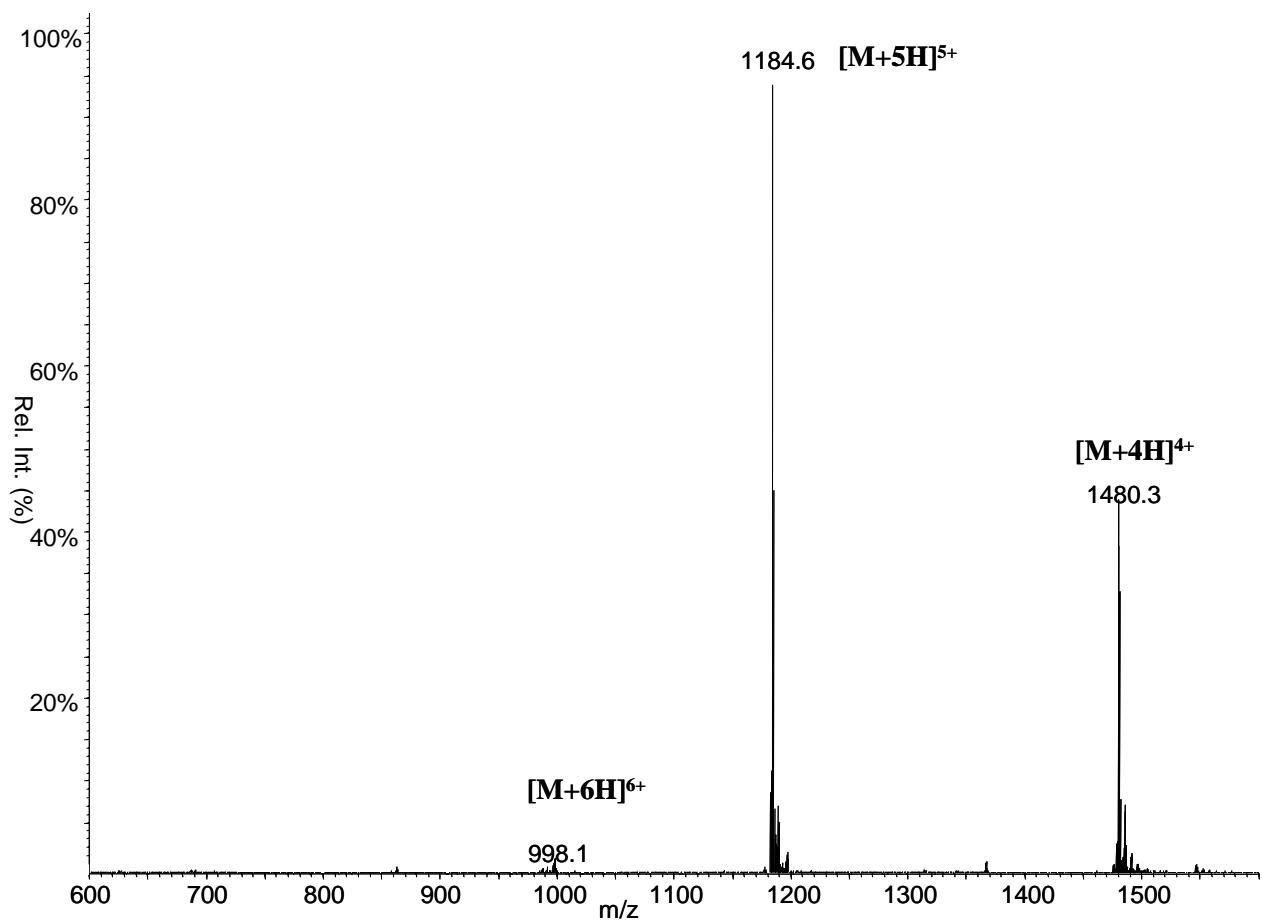
#### 4.1.2.11 Levemir (intakt)

Das lang wirkende Insulinanaloge Levemir unterscheidet sich von HI durch das Fehlen der Aminosäure an Position B30 Threonin und die Aminosäure Lysin an Position B29 ist über ihre  $\epsilon$ -Aminofunktion mit einer C14-Fettsäure (Myristinsäure) acyliert. Es besitzt dadurch ebenfalls eine im Vergleich zu HI höhere molekulare Masse von 5916 Da.

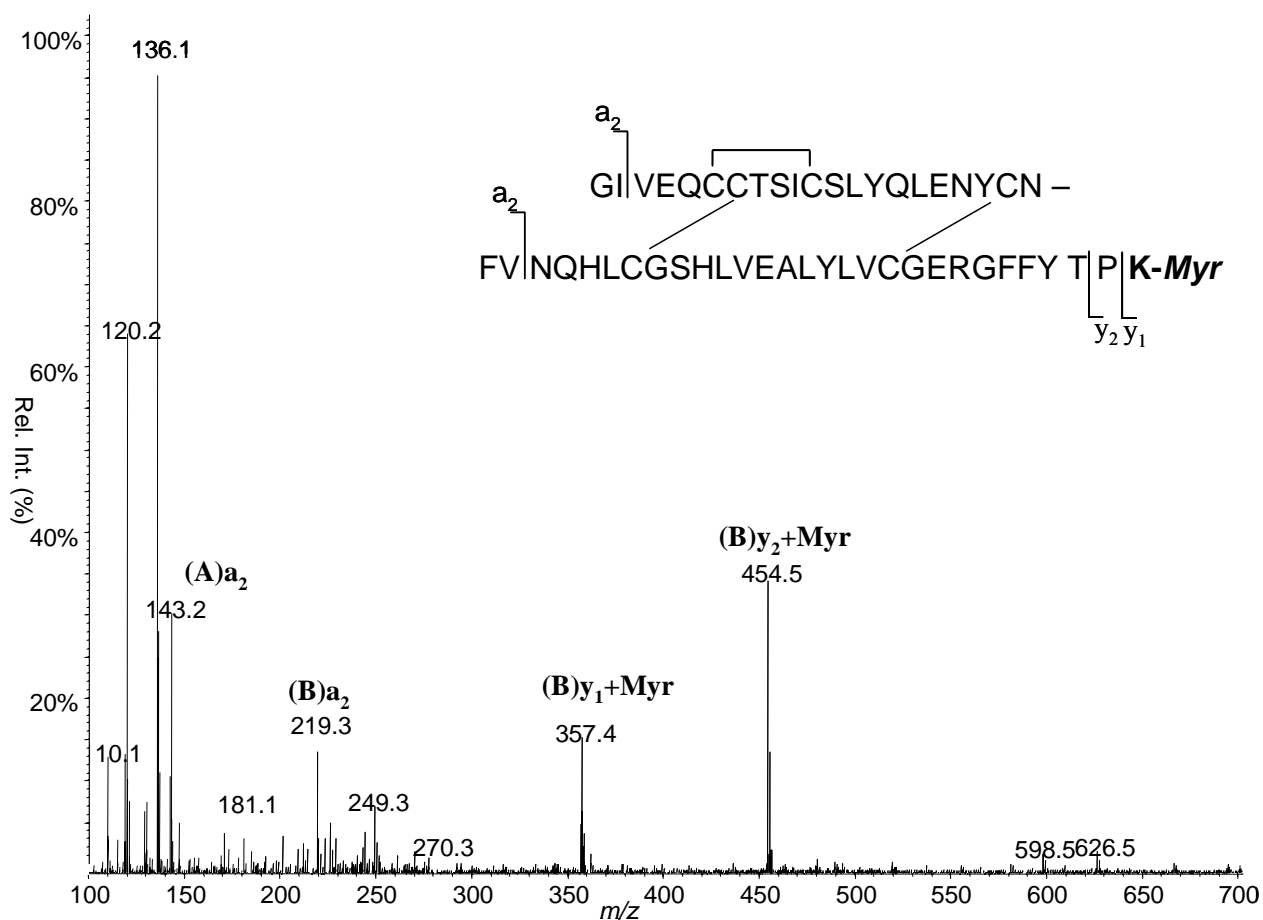
Das Full-Scan-Spektrum im Bereich von  $m/z$  600 - 1500 ohne Fragmentierung (niedrige Kollisionsenergie) zeigt den fünffach protonierten Ladungszustand  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  = 1184,6 als intensivstes Signal, neben dem weniger intensiven vierfach-  $[M+4H]^{4+}$  bzw. sechsfach  $[M+6H]^{6+}$  protonierten Ladungszustand bei  $m/z$  = 998,1 bzw. 1480,3 (Abb. 35).

Durch kollisionsinduzierte Fragmentierung des Quasimoleküls bei  $m/z = 1184,6$  entsprechend  $[M+5H]^{5+}$  bei Kollisionsenergien  $> 65$  eV lassen sich im Produktions-Spektrum der linearen Ionenfalle charakteristische Fragmente aus der modifizierten Aminosäuresequenz von Levemir nachweisen (Abb. 36).

Es handelt sich bei diesen Fragmenten neben den bekannten b-Ionen vom N-Terminus der B-Kette, auch um y-Ionen, deren molekulare Massen durch die  $C_{14}$ -Fettsäure an B29 um  $m/z = 211$  verschoben ist. So konnten im Produktions-Spektrum der Levemir-Referenzsubstanz die diagnostischen Ionen der B-Kette (B) $b_2$  bei  $m/z = 362$  und (B) $a_2$  bei  $m/z = 219$  identifiziert werden. Als charakteristisches A-Ketten-Fragment ist, wie bereits bei HI, Novolog und Humalog, ein intensives Signal bei  $m/z = 143$  für das (A) $a_2$  detektiert. Daneben erscheinen zwei intensive Signale im Produktions-Spektrum von Levemir bei  $m/z = 454$  und  $357$ , welche den y-Typ-Fragmenten von  $[Pro-Lys+Myristinsäure+H]^+$  und  $[Lys+Myristinsäure+H]^+$  zuzuordnen sind.



**Abb. 35:** ESI-Massenspektrum von Levemir-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimoleküle im vier-, fünf- und sechsfach protonierten Zustand bei  $m/z$  1480,3, 1184,6 und 998,1.



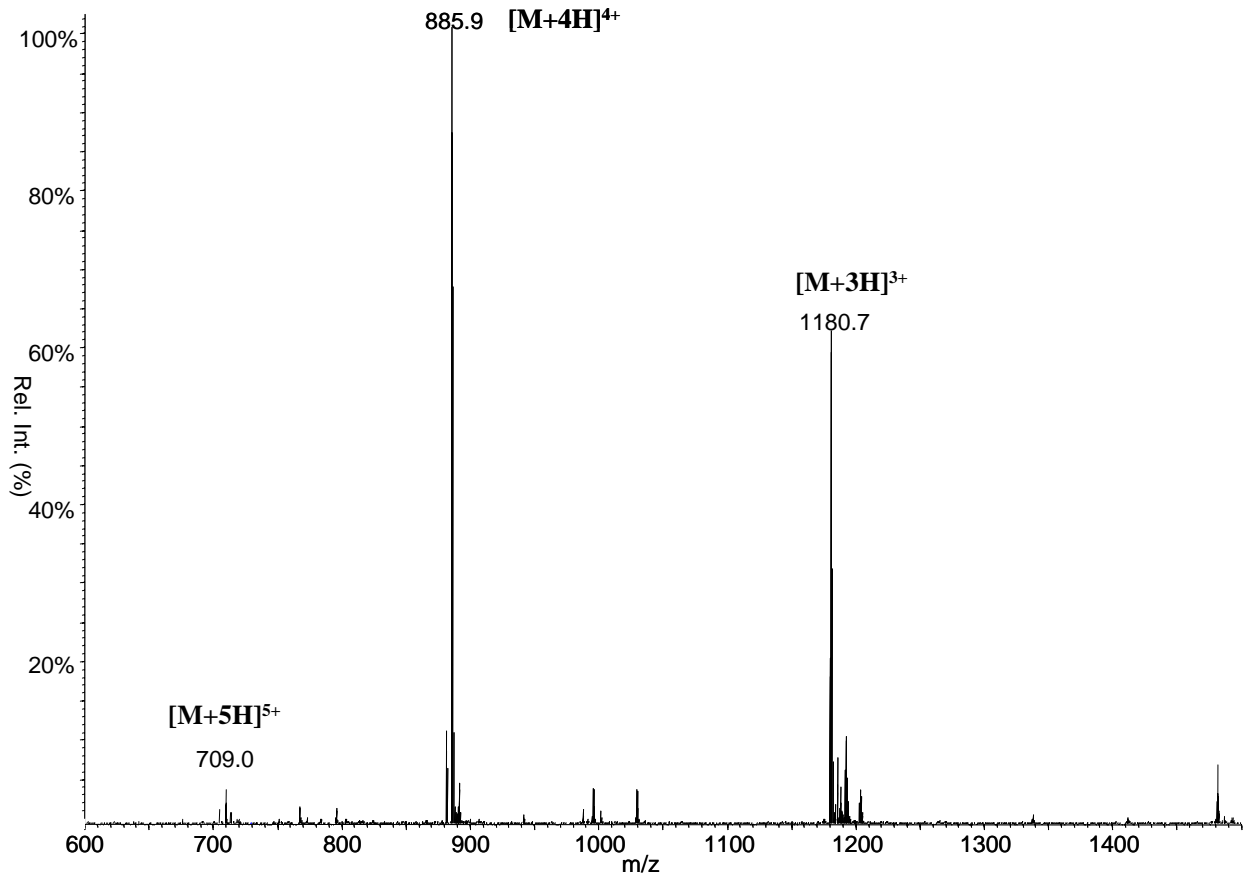
**Abb. 36:** ESI-Produktionenspektrum des fünffach geladenen Quasimoleküls  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  1184,6 von Levemir-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a- und y+Myr-Typs. Modifikationen in der Aminosäuresequenz sind fett gekennzeichnet.

#### 4.1.2.12 Levemir (reduzierte B-Kette)

Das Full-Scan-Spektrum der reduzierten B-Kette von Levemir (Abb. 37) weist das vierfach protonierte Quasimolekülion  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z = 885,9$  als intensivstes Signal aus und wird als Vorläuferion für nachfolgende Produktionen-Experimente ausgewählt. Bei Kollisionsenergien von 45 eV erfolgt eine ausreichende Fragmentierung, die zu einer umfangreichen massenspektrometrischen Charakterisierung der reduzierten B-Kette des lang wirkenden Insulinanalogens herangezogen werden kann (Abb. 38).

Die Identifikation der doppelt geladenen Produktionen vom b-Typ (N-Terminus) bei  $m/z = 562, 619, 669, 733, 769, 825$  und  $908$  entsprechend  $b_{10}^{2+}$  bis  $b_{16}^{2+}$ , bzw. den dreifach geladenen Ionen  $b_{25}^{3+}$ ,  $b_{27}^{3+}$  und  $b_{28}^{3+}$  bei  $m/z = 942, 1030$  und  $1062$  entsprechen den jeweiligen Fragmenten von HI, weil der N-Terminus der B-Kette keine Modifikation trägt.

Die Produktionen vom  $\gamma$ -Typ, die der B-Kette von Levemir zugeordnet werden können sind  $[y_1+Myr]^+$ ,  $[y_2+Myr]^+$ ,  $[y_3+Myr]^+$  und  $[y_{21}+Myr]^{3+}$  bei  $m/z = 357, 454, 555$  und  $882$ . Auch Fragmente vom  $\alpha$ -Typ sind als  $a_2$  und  $a_{10}^{2+}$  bei  $m/z = 219$  und  $548$  im Produktions-Spektrum der Referenzsubstanz erkennbar.

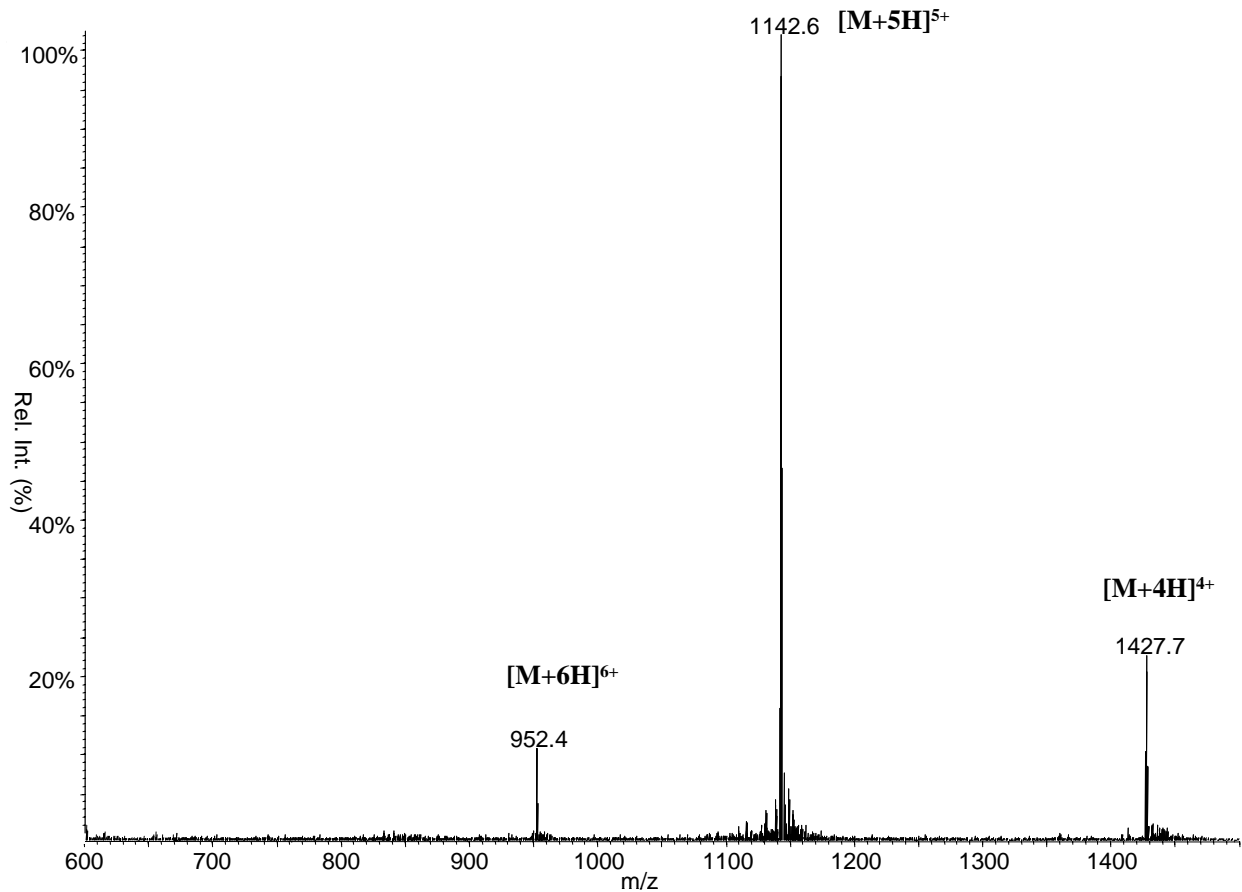


**Abb. 37:** ESI-Massenspektrum der reduzierten B-Kette von Levemir-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülonen im drei-, vier- und fünffach protonierten Zustand bei  $m/z$  1180,7, 885,9 und 709,0.

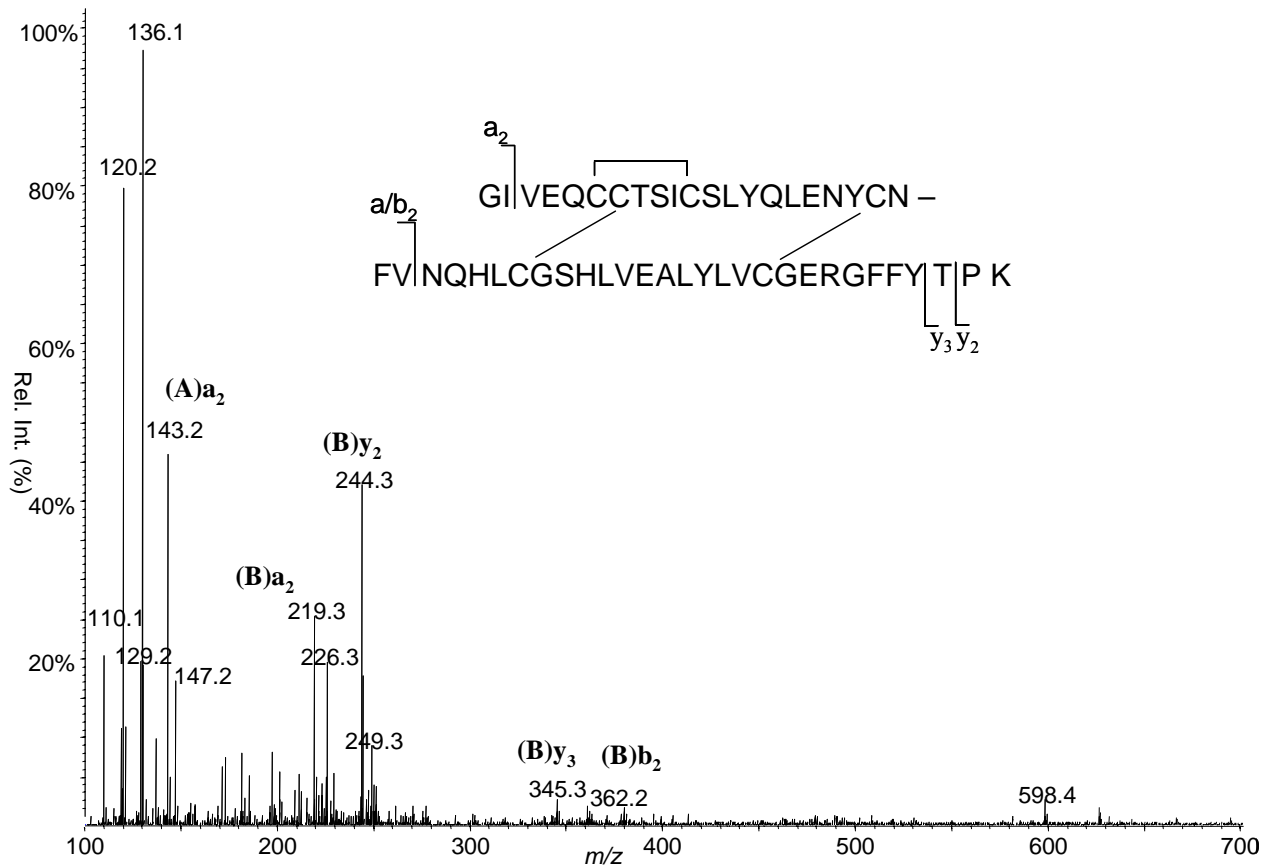




Bei diesen Fragmenten handelt es sich hauptsächlich um b- und y-, neben auch wenigen a-Ionen. So konnten im Produktions-Spektrum der DesB30-Humaninsulin-Referenzsubstanz die diagnostischen Ionen der B-Kette (B)<sub>y</sub><sub>3</sub> bei  $m/z = 345$ , (B)<sub>y</sub><sub>2</sub> bei  $m/z = 244$ , (B)<sub>b</sub><sub>2</sub> bei  $m/z = 362$  und (B)<sub>a</sub><sub>2</sub> bei  $m/z = 219$  identifiziert werden. Als von der A-Kette stammend, konnte das Fragment bei  $m/z = 143$  als (A)<sub>a</sub><sub>2</sub> bestimmt werden.



**Abb. 39:** ESI-Massenspektrum von DesB30 HI-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülonen im vier-, fünf- und sechsfach protonierten Zustand bei  $m/z$  1427,7, 1142,6 und 952,4.



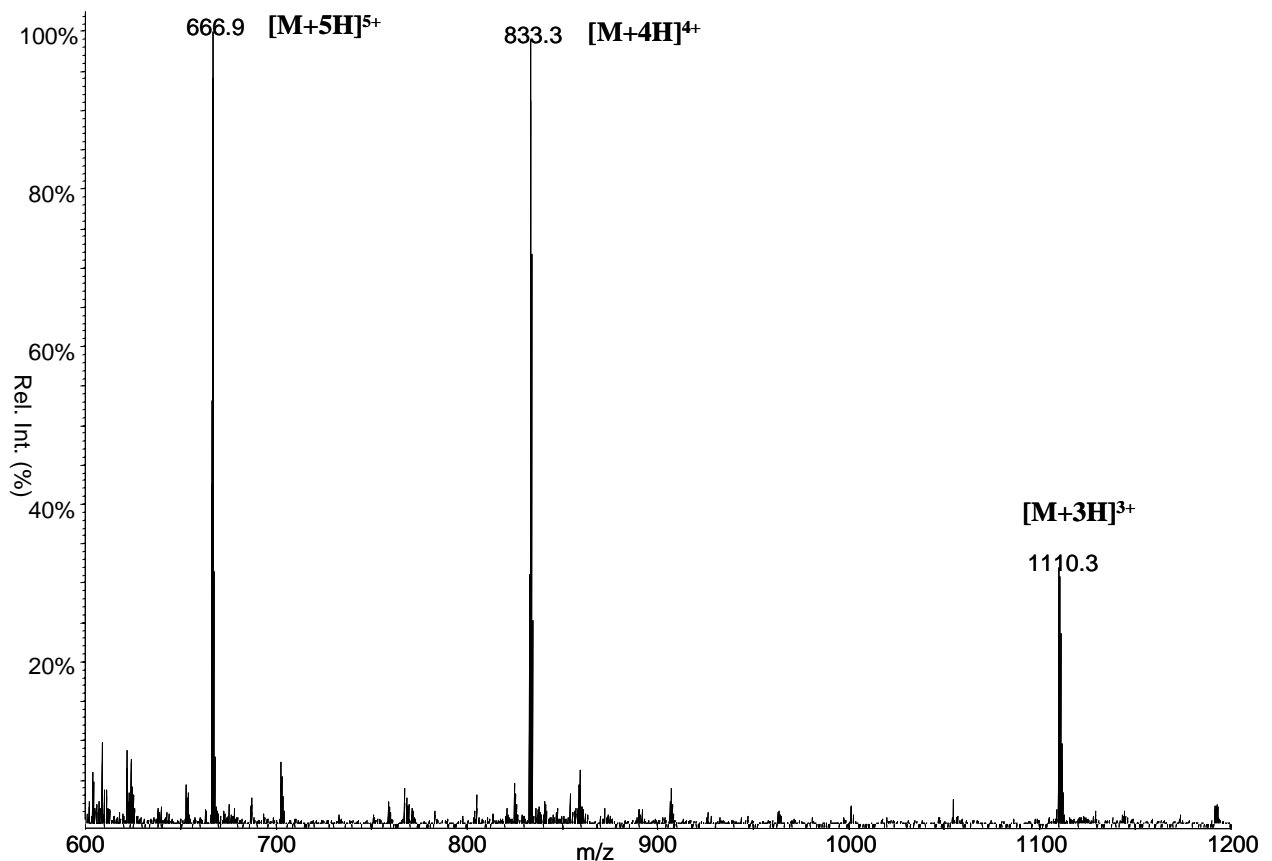
**Abb. 40:** ESI-Produktionenspektrum des fünffach geladenen Quasimoleküls  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  1142,6 von DesB30 HI-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a-, y- und b-Typs.

#### 4.1.2.14 DesB30 Humaninsulin (reduzierte B-Kette)

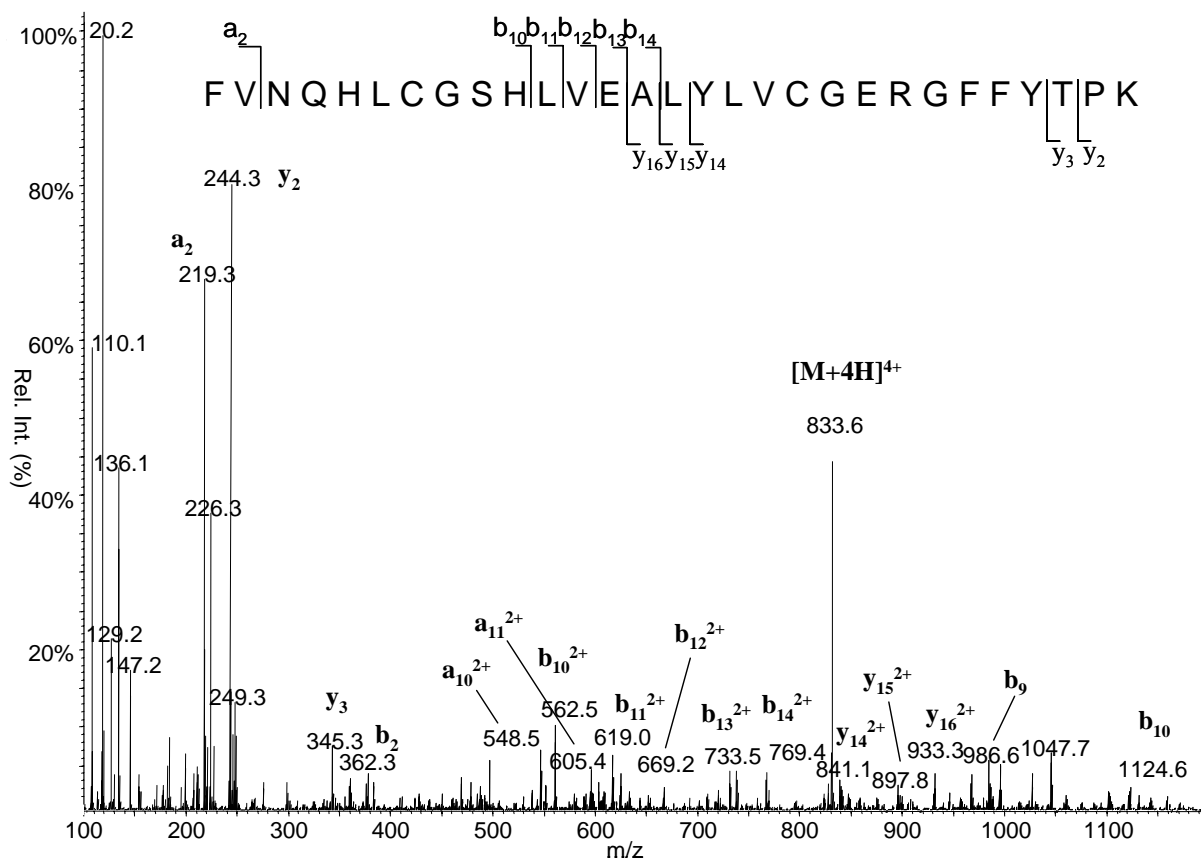
Das Full-Scan-Spektrum von DesB30-Humaninsulin-Referenzsubstanz im Bereich  $m/z$  600 – 1200 nach Reduktion und Spaltung der Peptid-Ketten mit TCEP-HCl zeigt ein intensives Signal bei  $m/z = 833,3$ , welches dem vierfach protonierten Quasimolekülion  $[M+4H]^{4+}$  der B-Kette von Humaninsulin zuzuordnen ist. Daneben können weitere, weniger intensive Signale bei  $m/z = 667$  und  $1110$  als mehrfach geladene Molekülonen  $[M+5H]^{5+}$  und  $[M+3H]^{3+}$  der B-Kette identifiziert werden (Abb. 41).

Fragmentierung des intensiven Vorläuferions  $m/z = 833,3$  bei Kollisionsenergien von 45 eV führt zu einem aussagekräftigen Produktionen-Spektrum, wobei neben den bereits für das intakte Humaninsulin identifizierten Fragmenten der B-Kette eine ganze Reihe zusätzlicher Signale identifiziert werden können (Abb. 42).

Umfangreiche Sequenzinformationen können hierbei durch die Identifikation der doppelt geladenen Produktionen vom b-Typ (N-Terminus) bei  $m/z = 562, 619, 669, 733$  und  $769$  entsprechend  $b_{10}^{2+}$  bis  $b_{14}^{2+}$ , bzw. den einfach geladenen  $b_3, b_9$  und  $b_{10}$ -Ion bei  $m/z = 362, 987$  und  $1125$  erreicht werden. Die Produktionen vom y-Typ, die der B-Kette von DesB30-Humaninsulin zugeordnet werden können sind  $y_{14}^{2+}, y_{15}^{2+}, y_{16}^{2+}, y_3$  und  $y_2$  bei  $m/z = 841, 898, 933, 345$  und  $244$ . Auch Fragmente vom a-Typ sind als  $a_2, a_{10}^{2+}$  und  $a_{11}^{2+}$  bei  $m/z = 219, 548$  und  $605$  im Produktionen-Spektrum der Referenzsubstanz erkennbar.



**Abb. 41:** ESI-Massenspektrum der reduzierten B-Kette von DesB30 HI-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülonen im drei-, vier- und fünffach protonierten Zustand bei  $m/z$  1110,3, 833,3 und 666,9.



**Abb. 42:** ESI-Produktionenspektrum des vierfach geladenen Quasimoleküls  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z$  833,6 der reduzierten B-Kette von DesB30 HI-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a-, y- und b-Typs.

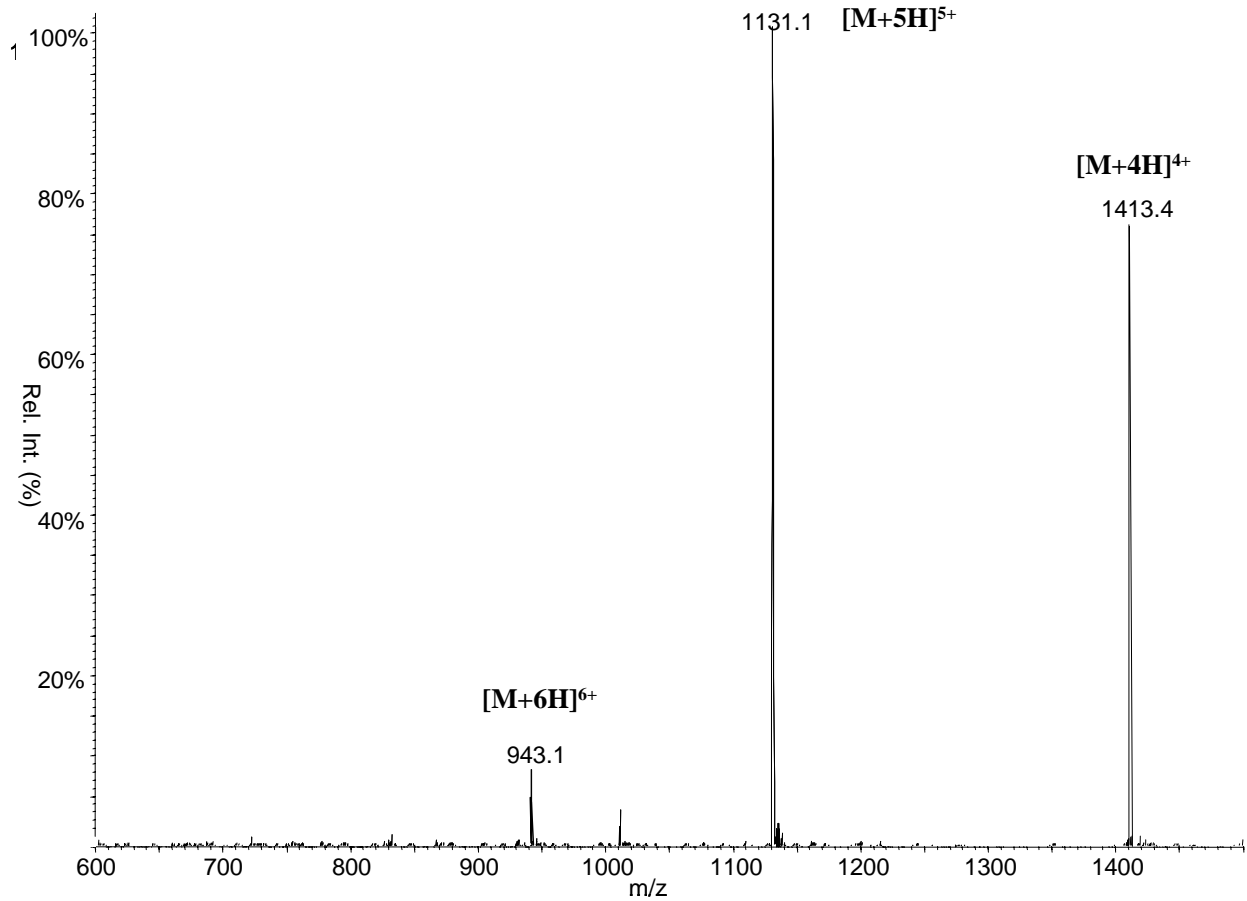
#### 4.1.2.15 DesB30-32 Lantus (intakt)

Im Full-Scan-Spektrum im Bereich von  $m/z$  600 - 1500 ohne Fragmentierung (niedrige Kollisionsenergie) zeigt sich der fünffach protonierte Ladungszustand  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  = 1131,1 als intensivstes Signal, neben dem vierfach-  $[M+4H]^{4+}$  bzw. sechsfach  $[M+6H]^{6+}$  protonierten Ladungszustand bei  $m/z$  = 1413,4 bzw. 943,1 (Abb.43).

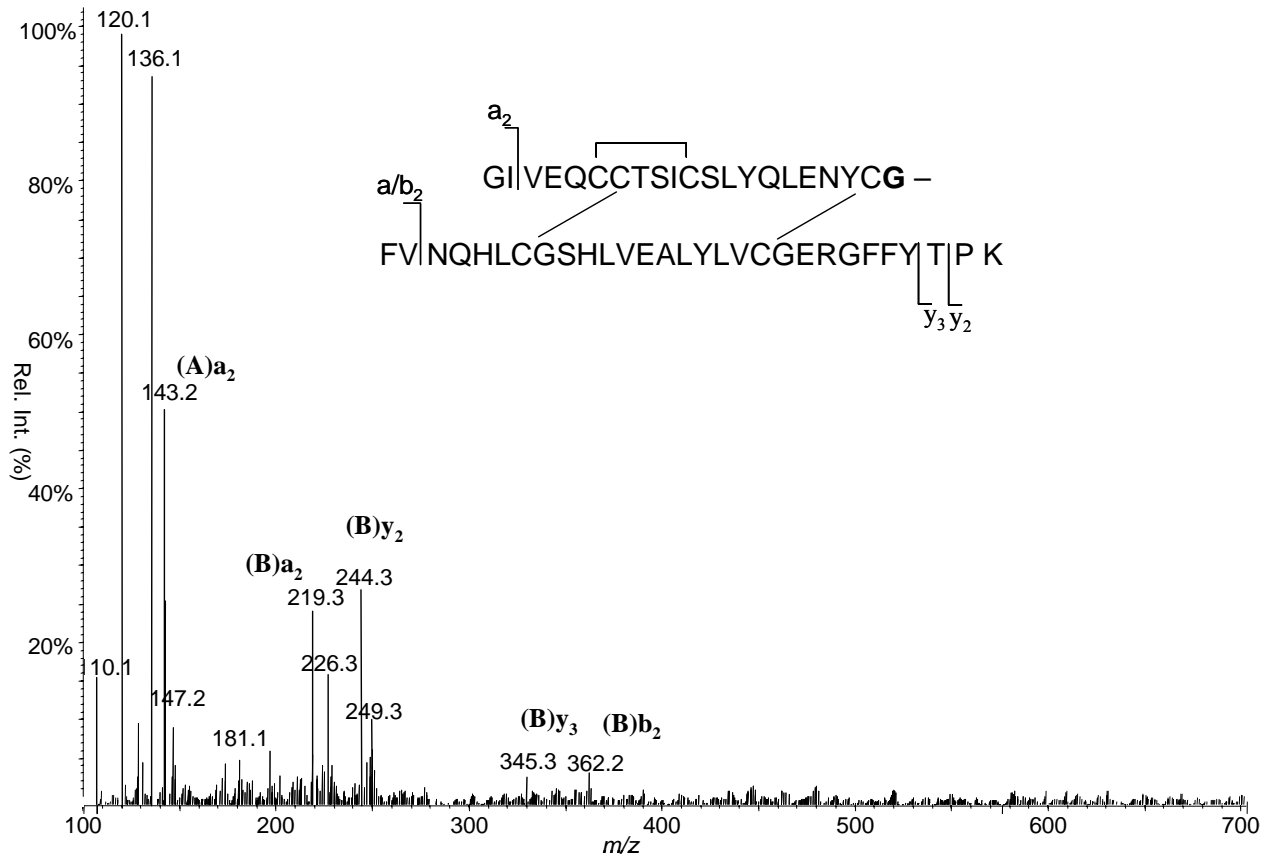
Durch kollisionsinduzierte Fragmentierung des fünffach protonierten Quasimoleküls  $[M+5H]^{5+}$  bei Kollisionsenergien > 65 V lassen sich im Produktionen-Spektrum der linearen Ionenfalle kleine, aber sehr charakteristische Fragmente aus der Aminosäuresequenz von DesB30-32 Lantus nachweisen (Abb. 44).

Bei diesen Fragmenten handelt es sich hauptsächlich um y-, neben auch wenigen a-Ionen. So konnten im Produktionen-Spektrum der DesB30-32 Lantus-Referenzsubstanz die

diagnostischen Ionen der B-Kette (B)<sub>y3</sub> bei  $m/z = 345$ , (B)<sub>y2</sub> bei  $m/z = 244$ , (B)<sub>y2</sub>-H<sub>2</sub>O bei  $m/z = 226$  und (B)<sub>a2</sub> bei  $m/z = 219$  identifiziert werden. Als von der A-Kette stammend, konnte das Fragment bei  $m/z = 143$  als (A)<sub>a2</sub> bestimmt werden.



**Abb. 43:** ESI-Massenspektrum von DesB30-32 LAN-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülionen im vier-, fünf- und sechsfach protonierten Zustand bei  $m/z$  1413,4, 1131,1 und 943,1.



**Abb. 44:** ESI-Produktionenspektrum des fünffach geladenen Quasimoleküls  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  1131,1 von DesB30-32 LAN-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des a-, y- und b-Typs. Modifikationen in der Aminosäuresequenz sind fett gekennzeichnet.

#### 4.1.2.16 DesB30-32 Lantus (reduzierte B-Kette)

Die Aminosäuresequenz der reduzierten B-Kette der DesB30-32 Lantus ist identisch mit der Sequenz von DesB30 HI-B-Kette, weil nach Verlust der Aminosäuren B30-32 nur noch die Modifikation an Position A21 vorhanden ist und diese bei der Analyse der reduzierten B-Kette nicht berücksichtigt wird. Das Produktionen-Spektrum ist daher ebenfalls identisch (siehe Abb. 42) und es können hier dieselben diagnostischen Produktionen identifiziert werden. Eine Unterscheidung bezüglich der Herkunft des vierfach protonierten Vorläuferions bei  $m/z = 833,3$  ist ohne vorhergehende Messung der intakten Insuline nicht mehr möglich.

### 4.1.3 Flüssigkeitschromatographie

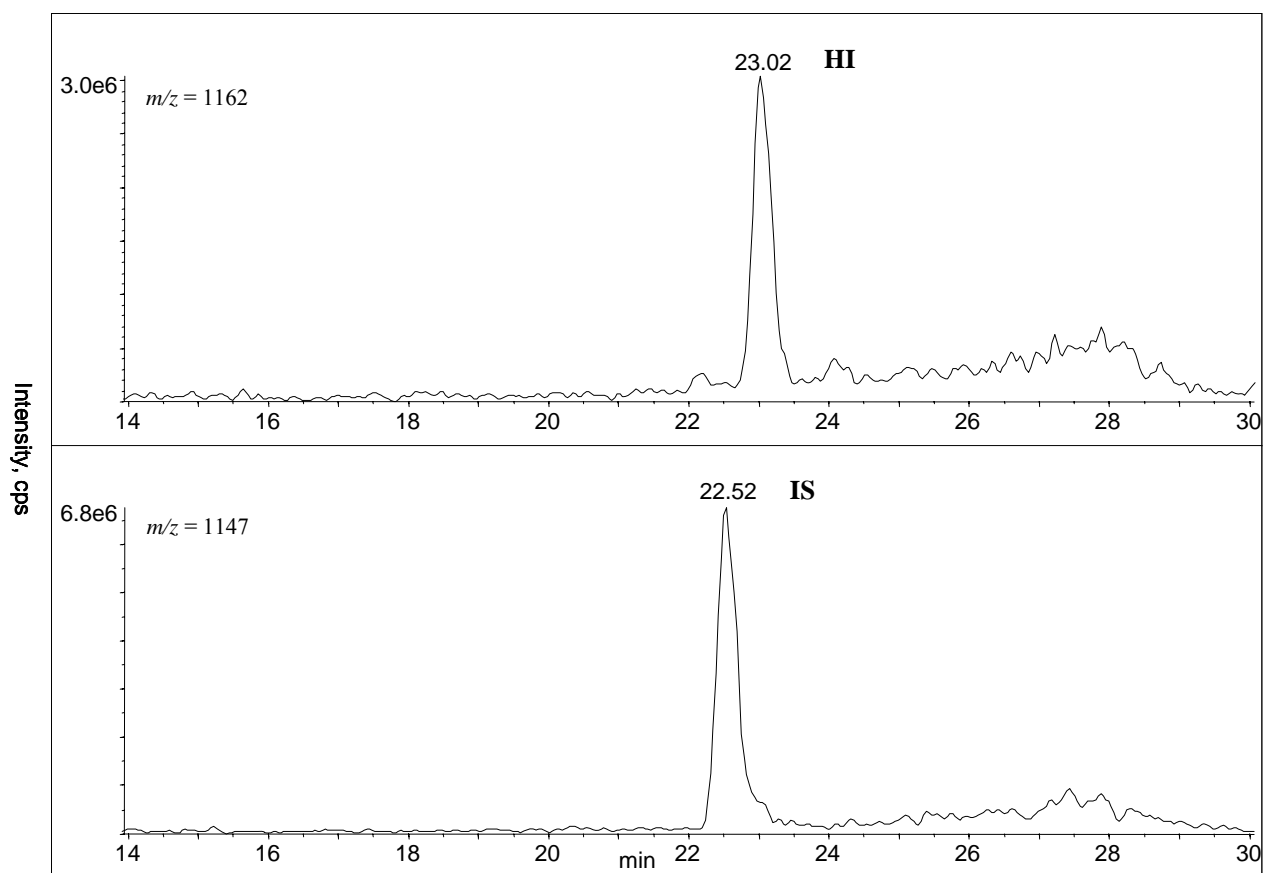
Die Methode zur chromatographischen Trennung der Insulinanalogen mit der HPLC wurde zunächst ohne Matrix mit den vorhandenen Referenzsubstanzen entwickelt. Dabei wurde versucht, neben einer symmetrischen Peakform auch eine chromatographische Trennung der Insuline untereinander zu erreichen. Eine solche Trennung, die gleichbedeutend mit einer Unterscheidung anhand von chromatographischen- zusätzlich zu den massenspektrometrischen Eigenschaften ist, konnte insbesondere für die isomeren HI und Humalog unter den gewählten Parametern nicht erreicht werden. Generell zeigen alle getesteten Insuline ein sehr ähnliches chromatographisches Verhalten auf dem RP-LC-System mit einem zeitlichen Elutionsunterschied vom frühest- zum spätest-eluierenden Analyten von weniger als einer Minute. Die Laufzeit für eine Bestimmung beträgt mehr als 35 min inklusive Reequilibrierung der analytischen Säule. Die Equilibrierungszeit nimmt dabei bis zu 20 Min pro Injektion in Anspruch, weil durch den geringen Laufmitteldurchsatz bei 70  $\mu\text{L}/\text{min}$  das Säulenmaterial entsprechend lange bei Anfangsbedingungen (28 % Puffer B) für die folgende Injektion konditioniert werden muß. Dieser geringe Laufmittelfluss ermöglicht aber auch eine hohe Ionisierungseffizienz in der ESI-Quelle und ist entscheidend mitverantwortlich für die nötige Empfindlichkeit im unteren fmol/mL-Bereich zu gewährleisten [125, 126]. Je nach Wahl des Gradientenprofils und unter Berücksichtigung des systembedingten Totvolumens können die absoluten Retentionszeiten der jeweiligen Insulinanalogen zwischen 16,5 und 22,5 min schwanken, wobei die relativen Retentionszeiten nicht beeinflußt werden. Ein Erhöhung des Laufmittelflusses von 70 auf 130  $\mu\text{L}/\text{min}$  nach 25 min (bzw. nach Elution der Analyten) hilft die Laufzeit insgesamt zu verkürzen, ohne an Empfindlichkeit zu verlieren.

### 4.1.4 Bestimmung von Humaninsulin in Plasma

Zur Überprüfung der Effizienz der entwickelten Methode wurden Plasmaproben von gesunden Menschen ohne Behandlung mit Insulin (d.h. Nicht-Diabetikern) in unterschiedlichen Fastenzuständen analysiert. Die Möglichkeit endogenes Humaninsulin in diesen Proben nachzuweisen sollte als Indikator für eine ausreichende Empfindlichkeit zur Messung von exogen zugeführtem Insulin dienen und den Arbeitsbereich der Methode



vorgeben (Abb. 45). Weiterhin konnten die experimentell bestimmten Konzentrationen abgeschätzt und mit Literaturdaten verglichen werden, um deren Plausibilität und Übereinstimmung zu prüfen. Die dabei ermittelten Insulinkonzentrationen im Plasma sind stark abhängig vom jeweiligen Fastenzustand des Organismus bei der Blutabnahme, bestätigen aber die in der Literatur beschriebenen Werte in guter Übereinstimmung [9]. Es konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung von 2 mL Plasma eine ausreichend gute Empfindlichkeit erreicht werden kann, um selbst Basal-Insulinkonzentrationen von ca. 0,3 - 0,5 ng/mL noch nachzuweisen zu können.

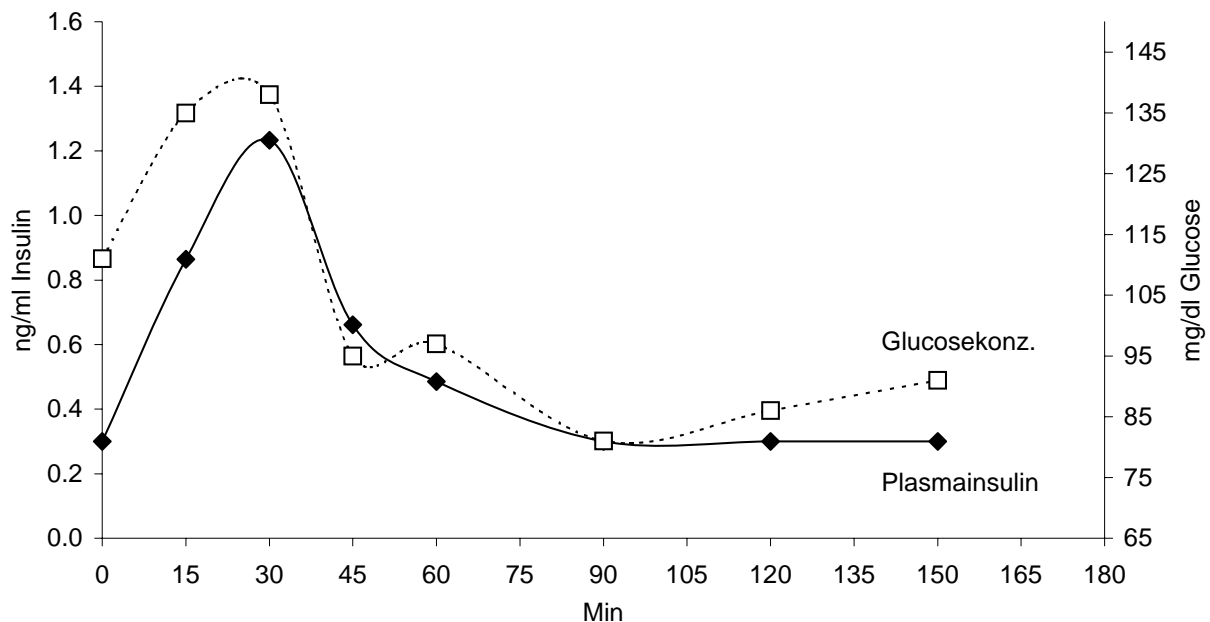


**Abb. 45:** ESI-Produktionen-Chromatogramme der fünffach geladenen Quasimolekülonen von HI ( $m/z$  1162) und Rinderinsulin als IS ( $m/z$  1147) aus einer realen Plasmaprobe mit ca. 1,0 ng/mL endogenem HI mit intensiven Signalen bei 23,0 für HI bzw. 22,5 min für den IS.

Diese Basalwerte wurden dann auch als zu erreichende Nachweisgrenze für die Insulinanalogen angenommen, da es keinerlei konkrete Hinweise auf zu erwartende Plasmakonzentrationen bei Athleten gibt, die Insulin als leistungssteigernde Substanz mißbrauchen. Da diese Athleten sich jedoch einen Effekt dieser Substanzen unter Zufuhr hoher Kohlenhydratmengen versprechen, sollten die eingesetzten Hormondosen eher in

hyper- als in sub-physiologischen Mengen zu finden sein, auch unter Mißachtung der möglichen schwerwiegenden Folgen für den Organismus [127].

Die Werte von Humaninsulin im Plasma nach oraler Aufnahme von 75 g Glukose (oralen Glukose-Toleranztest, oGTT) wurden nach ca. 30 min mit bis zu 1,5 ng/mL bestimmt, wobei die jeweiligen Insulinkonzentrationen in nahezu optimaler Korrelation (bei gesunden Menschen) zu den simultan gemessenen Glukosekonzentrationen ermittelt worden sind (siehe Abb. 46). Die obere Grenze des Arbeitsbereiches der Methode wurde unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse auf ca. 2 ng/mL Plasma festgelegt, da höhere Werte für gesunde Menschen nicht physiologisch sind [9].



**Abb. 46:** Plasmainsulin- (◆) und Glukosekonzentrationen (□) eines gesunden Menschen nach oraler Gabe von 75 g Glukose mit acht Meßpunkten über einen Zeitraum von 150 min nach Glukose-Belastung.

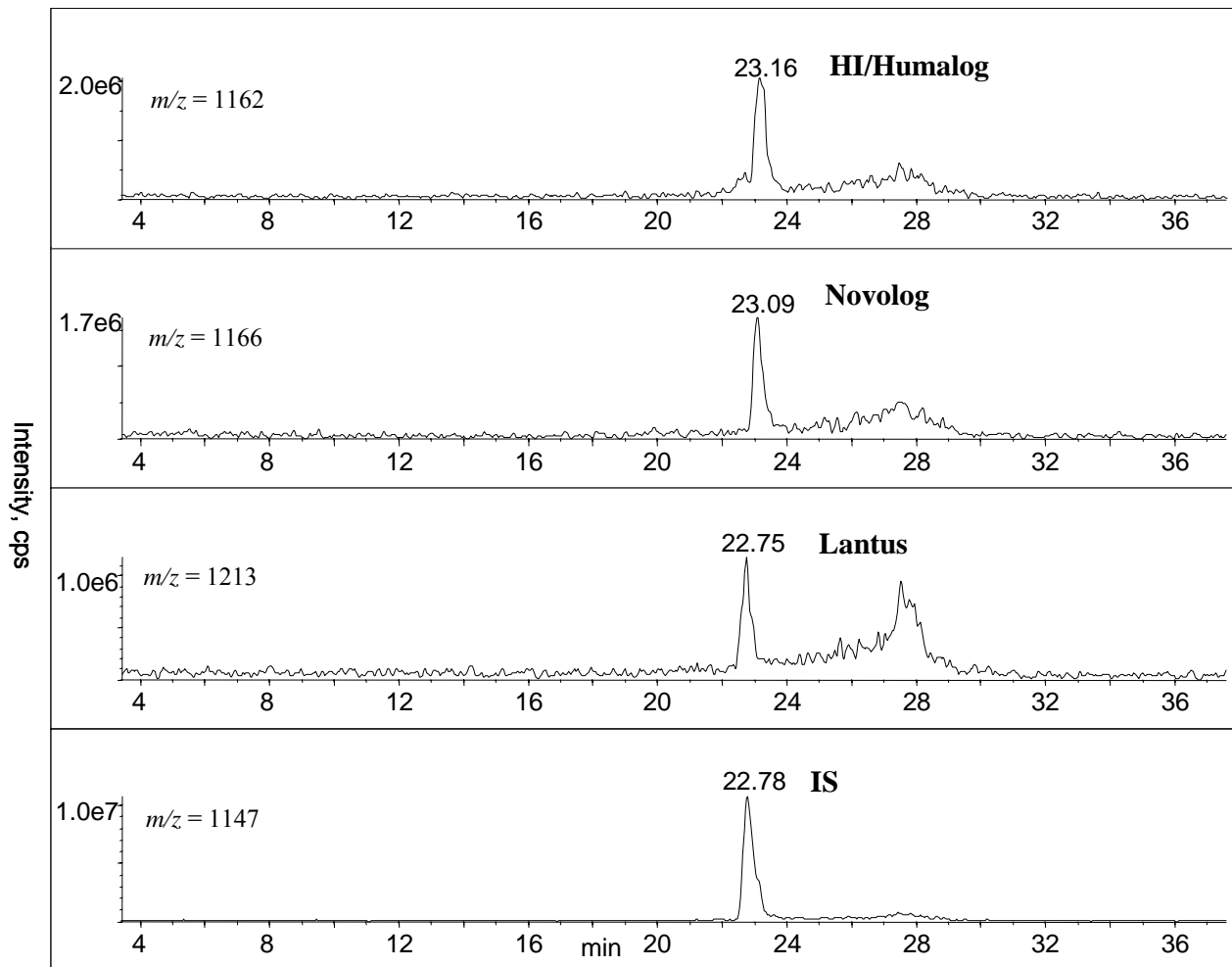
## 4.2 Methodenvalidierung: Humalog, Novolog und Lantus im Plasma

### 4.2.1 Spezifität

Der Parameter der Spezifität spielt bei der Entwicklung einer analytischen Methode, die im Dopingbereich eingesetzt werden soll, eine besondere Rolle. Schon durch die Wahl der hochspezifischen massenspektrometrischen Detektion sollen sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Ergebnisse nahezu ausgeschlossen werden. Dies ist durch mögliche bioanalytische Ansätze (ELISA, RIA etc.) unter Berücksichtigung von auftretenden Kreuzreaktionen schwieriger umzusetzen [9, 10, 72, 87, 121]. Im Verlauf der Validierung muss im Folgenden dann gezeigt werden, dass die Spezifität matrixunabhängig, d.h. von interindividuellen Matrixeinflüssen nicht beeinflusst wird. Dies wurde durch die Analyse von 10 unterschiedlichen Blank-Plasmen gezeigt, wobei diese Plasmen bezüglich des endogenen Humaninsulins nicht als „Blank“ bezeichnet werden können. Für die Analytik der Insulinanalogen Novolog und Lantus stellt die Anwesenheit von HI im Plasma kein Problem dar, weil sie sich in ihrer molekularen Masse unterscheiden. Demzufolge konnten in den zehn Plasmen von gesunden Teilnehmern keine interferierenden Signale in den jeweiligen Produktionenchromatogrammen für Novolog und Lantus festgestellt werden.

Im Falle des schnell wirkenden HI-Isomeren Humalog kann der Parameter der Spezifität nicht unkompliziert abgehandelt werden, da eine Differenzierung anhand der molekularen Masse nicht möglich ist und auch keine chromatographische Trennung erreicht werden konnte. Zur Unterscheidung können jedoch die Ergebnisse der massenspektrometrischen Charakterisierung herangezogen werden. Das Produktion  $y_2$  bei  $m/z = 217$  der B-Kette von Humalog kann als diagnostisches Fragmentation dienen, da es durch CID von HI nicht entstehen kann und folglich in allen zehn Blank-Plasmen zur entsprechenden Retentionszeit nicht detektiert worden ist (siehe auch Kap. 4.1.2.1 ff).

Weiterhin zeigten sich in Blank-Plasmen, die jeweils einzeln mit Humalog, Novolog oder Lantus dotiert wurden, keine interferierende Signale in den anderen Produktionen-Experimenten und auch das Chromatogramm einer Probe, die ohne Zugabe von ISTD aufgearbeitet wurde, ergab kein Signal in der zugehörigen Ionenspur zur entsprechenden Retentionszeit. Ein Beispiel von Produktionen-Chromatogrammen einer Plasmaprobe, die mit 1,0 ng/mL Humalog, Novolog und Lantus dotiert worden ist, ist in Abb. 47 gezeigt.



**Abb. 47:** ESI-Produktionen-Chromatogramme der fünffach geladenen Quasimolekülonen von HI/Humalog ( $m/z$  1162, bei 23,2 min), Novolog ( $m/z$  1166, bei 23,1 min), Lantus ( $m/z$  1213, bei 22,8 min) und Rinderinsulin als IS ( $m/z$  1147, bei 22,8 min) aus einer Plasmaprobe, die mit ca. 1,0 ng/mL Humalog, Novolog und Lantus dotiert worden ist.

#### 4.2.2 Nachweisgrenze (LOD)

Die Nachweisgrenze der Methode wurde über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis eines dotierten Probenpools ( $n = 6$ ) ermittelt. Diese ist für alle drei Analogen nahezu gleich und liegt bei etwa 0,5 ng/mL. Alle Peakhöhen der Sechsfach-Bestimmung zeigen im entsprechenden Produktionen-Chromatogramm jeweils ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von mindestens 3:1. Zusätzlich wurde das Grundrauschen in den Chromatogrammen der 10 Blank-Plasmen aus der Spezifitätsmessung mit diesen Peakhöhen verglichen und auch hier ist ein ausreichendes  $S/N > 3$  gegeben. Bei der Nachweisgrenze für Humalog muss hierbei berücksichtigt werden, dass sich die detektierten Signale als Summenparameter aus Humalog

und HI (endogen) zusammensetzen. Um jedoch eine möglichst realistische Abschätzung für die Nachweisgrenze für Humalog treffen zu können, wurde ein Blank-Plasmapool verwendet, der nur sehr wenig ( $< 0,3$  ng/mL) HI enthielt (siehe auch Kap. 4.2.5).

#### 4.2.3 Präzision an der Nachweisgrenze

Die Auswertung der relativen Standardabweichung als Indikator für die Präzision erfolgte über das Verhältnis der jeweiligen Analyt-Peakflächen zur Peakfläche des internen Standards aus dem entsprechenden Totalionenstrom (TIC) der Produktionenexperimente. Es wurde hierzu wiederum die Sechsfach-Bestimmung am LOD ausgewertet. Für alle Analyten waren die über den ISTD korrigierten relativen Standardabweichungen unter 20 %, d.h. für Humalog: 13 %, für Novolog: 15 % und für Lantus: 14 %. Alle Bestimmungsreihen waren nach *Dixon* frei von Ausreißern [128].

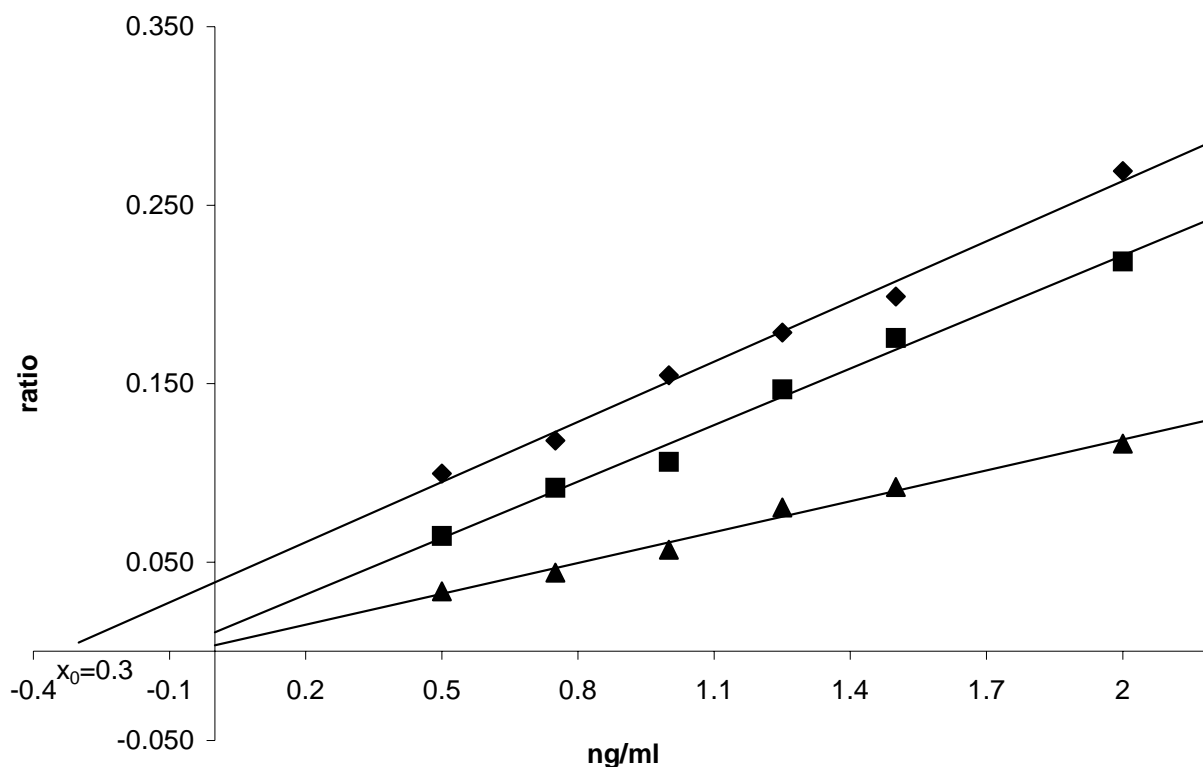
Dieser Parameter hat für eine Bestimmung mit qualitativem Charakter zwar nur eine untergeordnete Bedeutung, die Ergebnisse zeigen jedoch, dass auch im Bereich der Nachweisgrenze noch semiquantitative Aussagen erlaubt sind.

#### 4.2.4 Wiederfindung

Ein sehr wichtiger Parameter und guter Indikator für die Qualität einer Methode im Spurenbereich ist die absolute Wiederfindung und reziprok gleichbedeutend der Verlust an Analyten während der Probenaufarbeitung. Hat eine Methodenentwicklung eine Wiederfindung nahe 100 % erbracht, ist dies eine ideale Grundlage zur Optimierung aller übrigen Methodenparameter. Für die entwickelte Methode wurden die Wiederfindungsraten auf dem physiologisch realistischen Level von 1,0 ng/mL für alle drei Insulinanalogen mit 94 % für Humalog, 98 % für Novolog und 91 % Lantus bestimmt. Die relativen Standardabweichungen, die aus der jeweiligen sechsfach Bestimmung bei Dotierung der Proben vor- bzw. nach Aufarbeitung ( $n = 2 \times 6$ ) berechnet werden können, lagen dabei für alle Analyten unter 20 %.

#### 4.2.5 Linearität

Innerhalb des Arbeitsbereiches (0,5 bis 2 ng/mL) der Methode wurde durch Analyse von unabhängig dotierten Proben bei 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 und 2,0 ng/mL die Korrelation der ermittelten Werte überprüft. Für alle drei Analogen ergab der F-Test ( $p = 95\%$ ) der Verfahrensstandardabweichungen nach *Mandel* [129], dass eine lineare Annäherung erlaubt ist. Die Geradengleichungen mit den dazugehörigen Korrelationskoeffizienten sind für Humalog:  $y = 0,1144x + 0,0357$ ,  $r = 0,993$ ; für Novolog:  $y = 0,1058x + 0,0104$ ,  $r = 0,992$  und für Lantus:  $y = 0,0566x + 0,0049$ ,  $r = 0,990$ . Dabei ist auffällig, dass die Kalibriergerade für Humalog im Vergleich zur Geraden von Novolog einen deutlich größeren y-Achsenabschnitt bei etwa gleicher Steigung aufweist, also nach oben verschoben ist (siehe Abb. 48). Diese Verschiebung kann durch den geringen Gehalt an HI im Plasma, welches zur Dotierung benutzt wurde, erklärt werden. Dieser lässt sich sogar über eine Art modifiziertes Standardadditionsverfahren abschätzen, indem man den x-Achsenabschnitt der Gerade berechnet. Es ergibt sich daraus ein theoretischer Gehalt an HI im zur Linearitätsbestimmung genutzten Plasma von ca. 0,3 ng/mL ( $x_0$ , siehe Abb. 48), der etwa dem endogenen Basalwert im Fastenzustand entspricht.



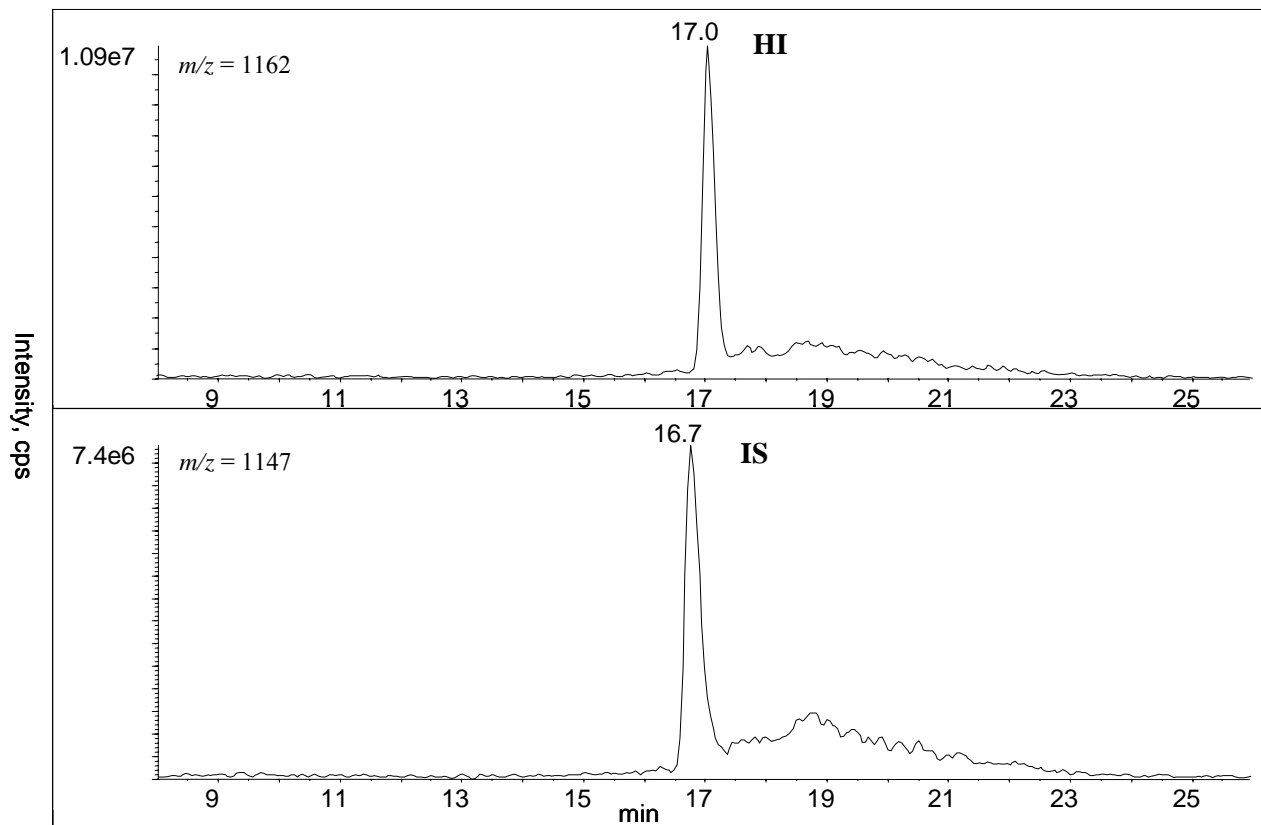
**Abb. 48:** Graphische Darstellung der Linearitätsbestimmung von Humalog (♦), Novolog (■) und Lantus (▲) im Bereich von 0,5 bis 2,0 ng/mL in dotierten Plasmaproben.

Auch die Linearität ist für die Bewertung einer qualitativ genutzten Methode von untergeordneter Bedeutung. Die Ergebnisse zeigen aber auch hier die Möglichkeit semiquantitative Abschätzungen für die einzelnen Analyten im Arbeitsbereich treffen zu dürfen. Wenn möglichst exakte Humaninsulinkonzentrationen bestimmt werden sollen, besteht ohne vorhandenes Blank-Plasma die Möglichkeit über ein Standardadditionsverfahren den Gehalt zu bestimmen [130].

### 4.3 Bestimmung von Humaninsulin in Urin

Die renale Ausscheidung von intaktem Insulin und die generelle Möglichkeit der massenspektrometrischen Bestimmung war zu Beginn der Studie noch unklar, weil eine solche analytische Methode in der wissenschaftlichen Literatur bisher noch nicht beschrieben worden ist. Daher wurde, wie bereits beim Plasma beschrieben, zunächst versucht, endogen gebildetes HI in Urinproben von gesunden Menschen nachzuweisen. Es zeigte sich, dass die Konzentrationen im Vergleich zum Plasma etwa um den Faktor 10 geringer sind (vgl. Abb. 46 und Abb. 50). Die zehnfache Menge Urin sollte demnach bei gleicher Wiederfindung

einen ähnlichen Response ergeben, und es wurde eine zusätzliche Festphasenextraktion vor der IAC eingeführt, um ein Volumen von ca. 10 – 20 mL Urin handhaben zu können. Als kritischer Faktor ist dabei der Anteil an organischem Lösungsmittel (Acetonitril) bei der Elution auf die IAC-Säule anzusehen, weil sich mit zu hohen Acetonitrilkonzentrationen kein stabiler Antigen-Antikörper-Komplex ausbildet. Das Problem konnte jedoch durch Verwendung eines möglichst kleinen Elutionsvolumen (1,6 mL mit 50% ACN) und anschließender Verdünnung mit PBS-Puffer zufriedenstellend gelöst werden. Abb. 49 zeigt die Produktions-Chromatogramme von HI und IS aus einer Urinprobe eines gesunden Probanden ohne Insulinbehandlung mit ca. 100 pg/mL endogenem HI.



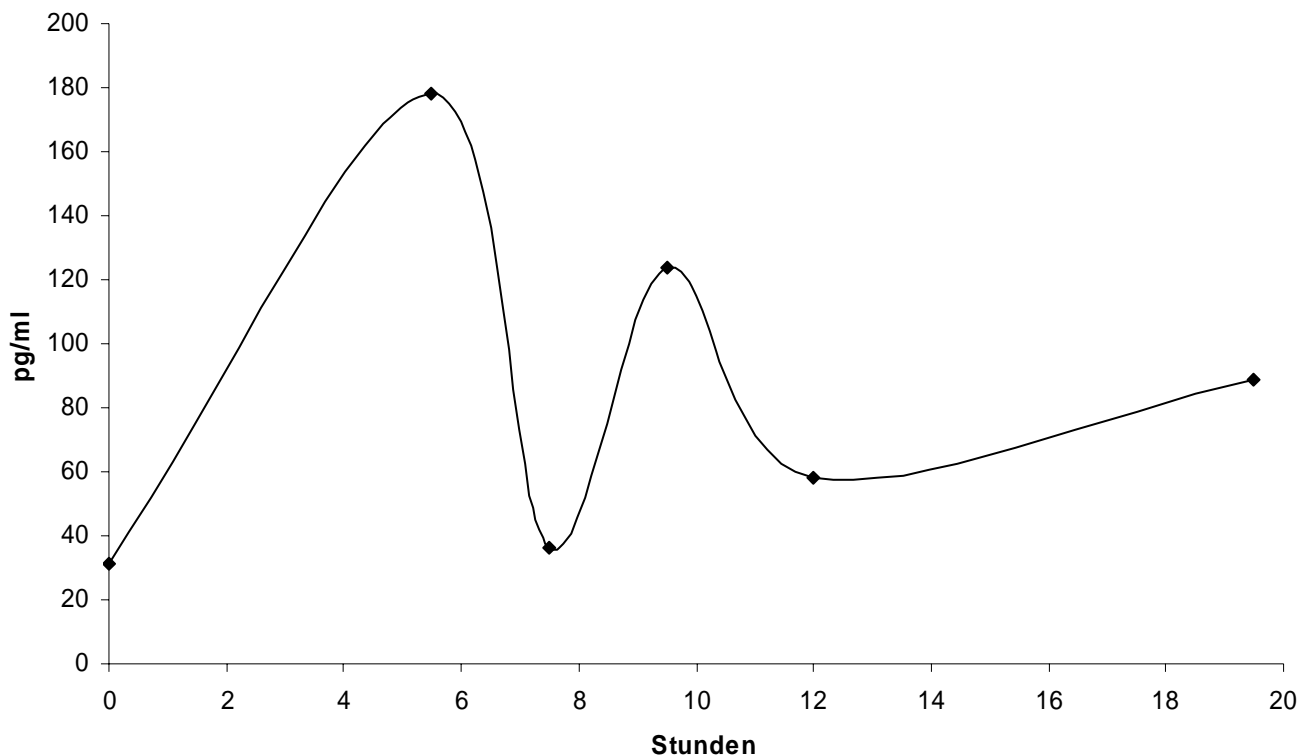
**Abb. 49:** ESI-Produktions-Chromatogramme der fünffach geladenen Quasimolekülonen von HI ( $m/z$  1162) und Rinderinsulin als IS ( $m/z$  1147) aus einer Urinprobe mit ca. 100 pg/mL endogenem HI mit intensiven Signalen bei 17,0 für HI bzw. 16,7 min für den IS.

Um auch für diese Matrix experimentelle Daten über den zu erwartenden Arbeitsbereich zu bekommen, wurde das Ausscheidungs-Profil von HI eines gesunden Menschen über 24



Stunden bestimmt. Die ermittelten Werte schwanken zwischen 30 und 200 pg/mL, wobei sich ein durchschnittliche Konzentration von ca. 80 pg/mL ergibt (Abb. 50). Bei einem Urinvolumen von 2 L / 24h ergibt sich daraus eine Menge von 160 ng HI / 24 h. Der tägliche Bedarf an Insulin liegt bei 0,5 – 1 IE / Tag / kg, d.h. bei einem 70 kg schweren Menschen gelangt über die Bauchspeicheldrüse 1,2 – 2,4 mg Insulin / Tag ins Blut [131, 132]. Die absolute Insulinmenge im 24h-Urin zeigt damit, dass nur ca. 0,01 % des endogen produzierten Hormons über den Urin intakt ausgeschieden werden [131].

Die experimentell ermittelten Daten für HI wurden als Grundlage zur Festlegung des Arbeitsbereiches für die Bestimmung der Insulinanalogen im Urin herangezogen, wobei eine Voraussage für die zu erwartenden Konzentrationen nicht möglich ist.



**Abb. 50:** Ausscheidungsprofil von endogen produziertem HI eines gesunden Menschen über 24 Stunden. Das Gesamtvolumen betrug ca. 2 L und die durchschnittliche Konzentration liegt bei etwa 80 pg/mL.

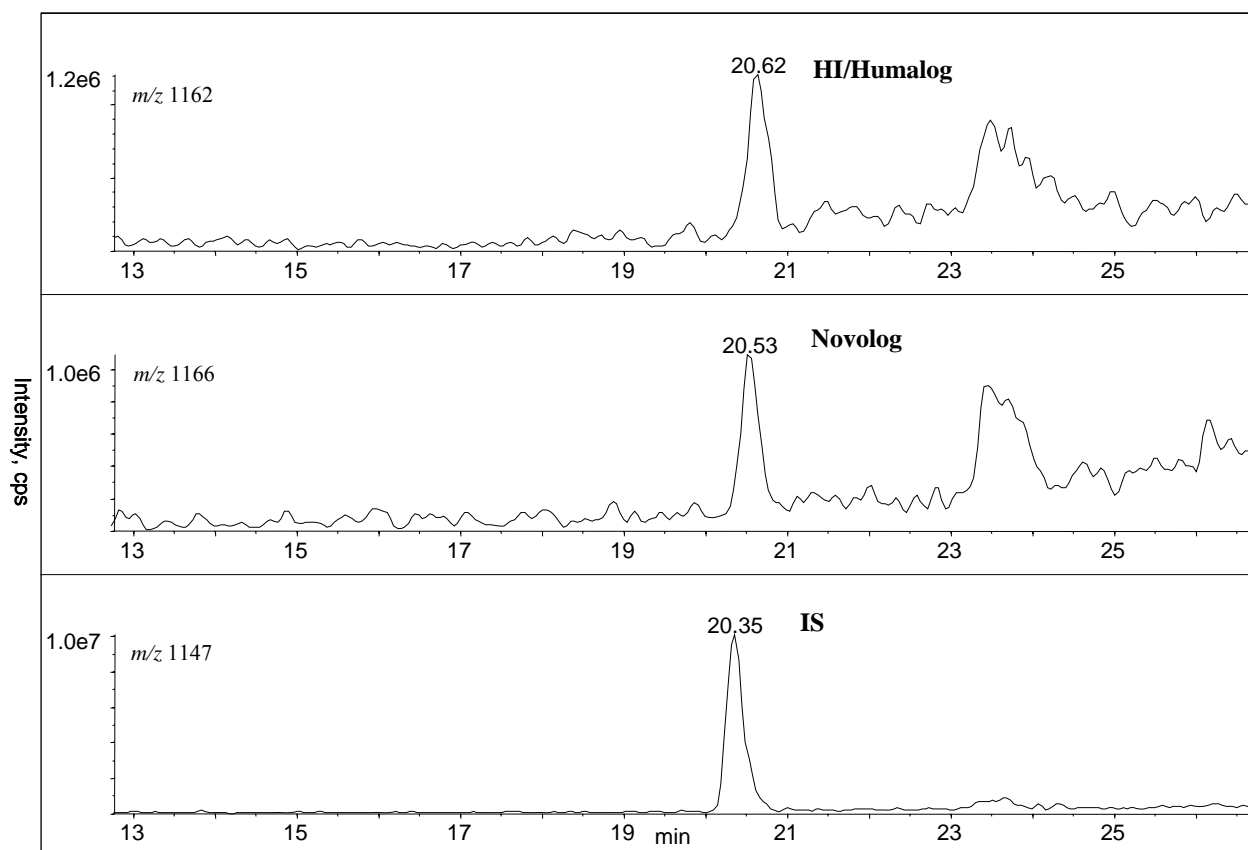
## 4.4 Methodenvalidierung der schnell wirkenden Insulinanalogen Humalog, Novolog und Apidra in Urin

### 4.4.1 Spezifität

Zehn unterschiedliche Urine gesunder Probanden zeigten für die urinäre Matrix keine interferierenden Signale in den entsprechenden Produktionen-Chromatogrammen von Novolog und Apidra. Wie bereits für die Plasma-Matrix beschrieben, kann die Spezifität von Humalog nur unter Berücksichtigung des jeweiligen Produktionen-Spektrums von HI / Humalog bei  $m/z = 1162$  zur entsprechenden Retentionszeit geprüft werden. Die Abwesenheit des diagnostischen Fragmentions bei  $m/z = 217$  belegt die Spezifität der Methode gegenüber Humalog. Aus den einzeln dotierten Urinproben ist ersichtlich, dass eine Unterscheidung von Novolog und Apidra nur unter Berücksichtigung der dazugehörigen Massenspektren erfolgen kann, weil die Massendifferenz der fünffach geladenen Molekülonen, die theoretisch berechnet bei  $m/z = 1166,2$  bzw.  $1165,5$  liegen (für die verwendeten nicht hochauflösenden Massenspektrometer), zu gering ist. Da auch keine ausreichende chromatographische Trennung erfolgt, wird die eindeutige Unterscheidung unter Berücksichtigung diagnostischer Produktionen im korrespondierenden MS/MS-Spektrum erreicht (vgl. Abb. 24 und 26 bzw. Abb. 28 und 30).

### 4.4.2 Nachweisgrenze (LOD)

Die Nachweisgrenze der Methode wird über ein Signal-zu-Rauschverhältnis zur entsprechenden Retentionszeit des Produktionen-Chromatogramms von mindestens 3 zu 1 bestimmt. Für 20 mL Urin konnte das LOD für die schnell wirkenden Analogen bei ca. 40 - 50 pg/mL (entspr. 7 - 9 fmol/mL) ermittelt werden und liegt somit im unteren endogenen Bereich (Abb. 51).



**Abb. 51:** ESI-Produktionen-Chromatogramme der fünffach geladenen Quasimolekülonen von HI/Humalog ( $m/z$  1162, bei 20,6 min), Novolog ( $m/z$  1166, bei 20,5 min) und Rinderinsulin als IS ( $m/z$  1147, bei 20,4 min,  $\sim 0,5$  ng/mL) aus einer Urinprobe, die mit ca. 50 pg/mL (am LOD) Humalog und Novolog dotiert worden ist. Die Differenzierung von HI und Humalog kann nur über das dazugehörige MS/MS-Spektrum gezeigt werden.

#### 4.4.3 Präzision am LOD

Zur Absicherung des ermittelten LOD wurde die Präzision einer sechsfach Bestimmung bei 50 pg/mL ermittelt. Für alle Analogen ergab die Auswertung ein  $S/N > 3$  und die relative Standardabweichung der über den ISTD korrigierten Peakflächen wurde mit  $< 20\%$  errechnet. Dabei wurden für die einzelnen Analyten Präzisionen von 9, 11 und 16 % für Humalog, Novolog bzw. Apidra bestimmt. Die Sechsfach-Bestimmung einer Urinprobe, die etwa 50 pg/mL HI (endogen) enthielt, ergab eine relative Standardabweichung von 15 %. Alle Bestimmungsreihen waren nach *Dixon* frei von Ausreißern [128].

#### 4.4.4 Wiederfindung

Die Wiederfindung, berechnet als der prozentuale Verlust an Analyten während der Aufarbeitung, wurde bei einer Konzentration von 100 pg/mL bestimmt, indem die Dotierung vor bzw. nach Aufarbeitung erfolgt ist. Die Wiederfindungsraten wurden mit 78, 72 und 80 % für Humalog, Novolog und Apidra berechnet, wobei die jeweiligen relative Standardabweichungen der Sechsfach-Bestimmungen weniger als 20 % betragen.

#### 4.4.5 Linearität

Innerhalb des festgelegten Arbeitsbereiches ist die Methode auf Linearität geprüft worden. Zwischen 50 und 200 pg/mL wurden Proben dotiert und die über den ISTD korrigierten Peakflächen bezüglich ihrer Korrelation ausgewertet. Die Kalibrierfunktionen mit Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Analogen ergaben für Humalog:  $y=1,542x-0,002$  mit  $r=0,992$ , Novolog:  $y=1,722x+0,004$  mit  $r=0,980$  und Apidra:  $y=1,523x-0,035$  mit  $r=0,992$ . Der Linearitätstest nach Mandel erlaubt eine lineare Annäherung für alle Analyten. Auch für Humaninsulin wurde die Linearität überprüft, wobei die Kalibrierfunktion bei  $y=2,301x+0,076$  mit  $r=0,991$  einen vergleichbar hohen y-Achsenabschnitt besitzt und dies (wie bereits bei Plasmaproben diskutiert) durch den endogenen Gehalt an HI im dotierten Urin begründet werden kann.

#### 4.4.6 Stabilität

Die Stabilität der Analyten in urinärer Matrix ist ein ebenfalls wichtiger Parameter für eine im Dopingbereich eingesetzte Methode, weil eine eventuelle Instabilität zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Die Ergebnisse belegen die Stabilität der Analyten über 8 Wochen bei 2-8 °C und 16 Wochen bei -18 °C, weil nach Lagerung und Analyse über diesen Zeitraum keine signifikant unterschiedlichen Peakflächen (d.h. größer als methodencharakteristische Präzision) für die jeweiligen Analogen und auch für HI ermittelt worden sind. Darüber hinaus hat die Stabilitätsprüfung bei Raumtemperatur nach 3 Tagen bei ca. 22°C keinen Abbau der Analyten in Urin gezeigt.

#### 4.5 Untersuchung von Patientenurinen und Dopingkontrollproben

Die einzelnen Validierungsparameter zeigen die prinzipielle Möglichkeit des Nachweises der synthetischen Insulinalogen im Urin. Ein wesentlich realistischerer Hinweis auf die Effizienz und die Einsatzfähigkeit der entwickelten Methode ist die Analyse von Urinproben diabetischer Patienten und Athleten, die mit den jeweiligen Insulinen behandelt worden sind. Tab. 5 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Dopingkontrollurine von Athleten, die an insulinpflichtigem *Diabetes mellitus* leiden und eine Behandlung mit Insulin auf dem Probenbegleitschreiben angegeben haben. Die hierbei erzielten Ergebnisse zeigen, dass auch nach subkutaner Injektion die schnell wirkenden Insuline Humalog, Novolog und Apidra intakt im Urin nachweisbar sind.

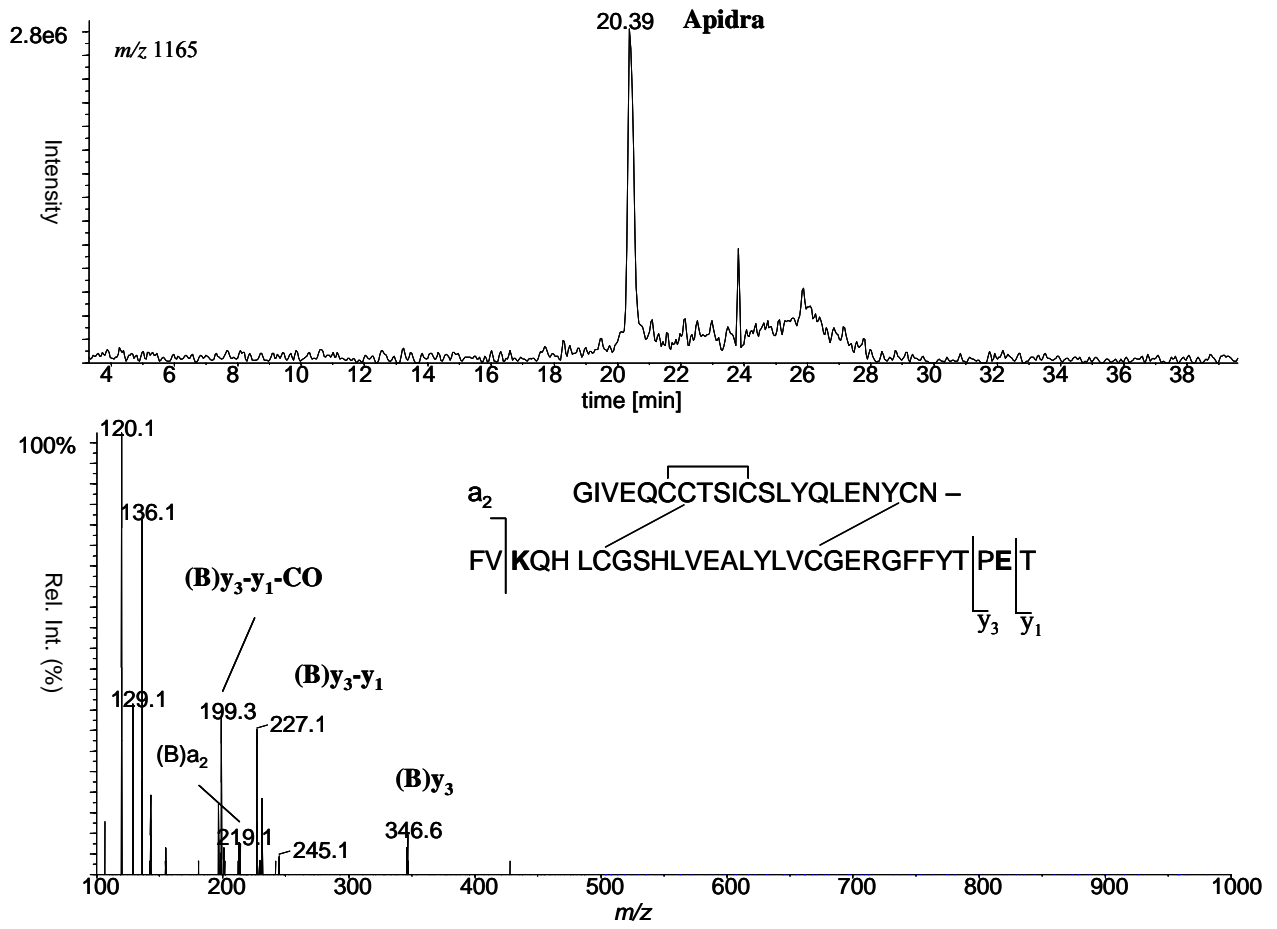
Es handelt sich bei den untersuchten Dopingkontrollproben nicht um „positive“ Dopingbefunde, weil die betreffenden Athleten nachweislich an *Diabetes mellitus* leiden und eine Ausnahmegenehmigung für die Behandlung mit Insulin besitzen.

In Abb. 52 und 53 sind die Chromatogramme mit den dazugehörigen MS/MS-Spektren einer regulären, urinären Dopingkontrollprobe eines diabetischen Athleten gezeigt, der eine Applikation mit Apidra angegeben hat. Sowohl die Analyse des intakten Insulins (Abb. 52), als auch der B-Kette nach Reduktion mit TCEP-HCl-Lösung (Abb. 53) erlauben eine eindeutige Identifizierung des Insulinalogen über die Retentionszeiten der Signale (bei 20,4 bzw. 23,3 min), sowie anhand der diagnostischen Produktionen vom a-, y- und b-Typ (siehe auch Kap. 4.1.2.7/8).

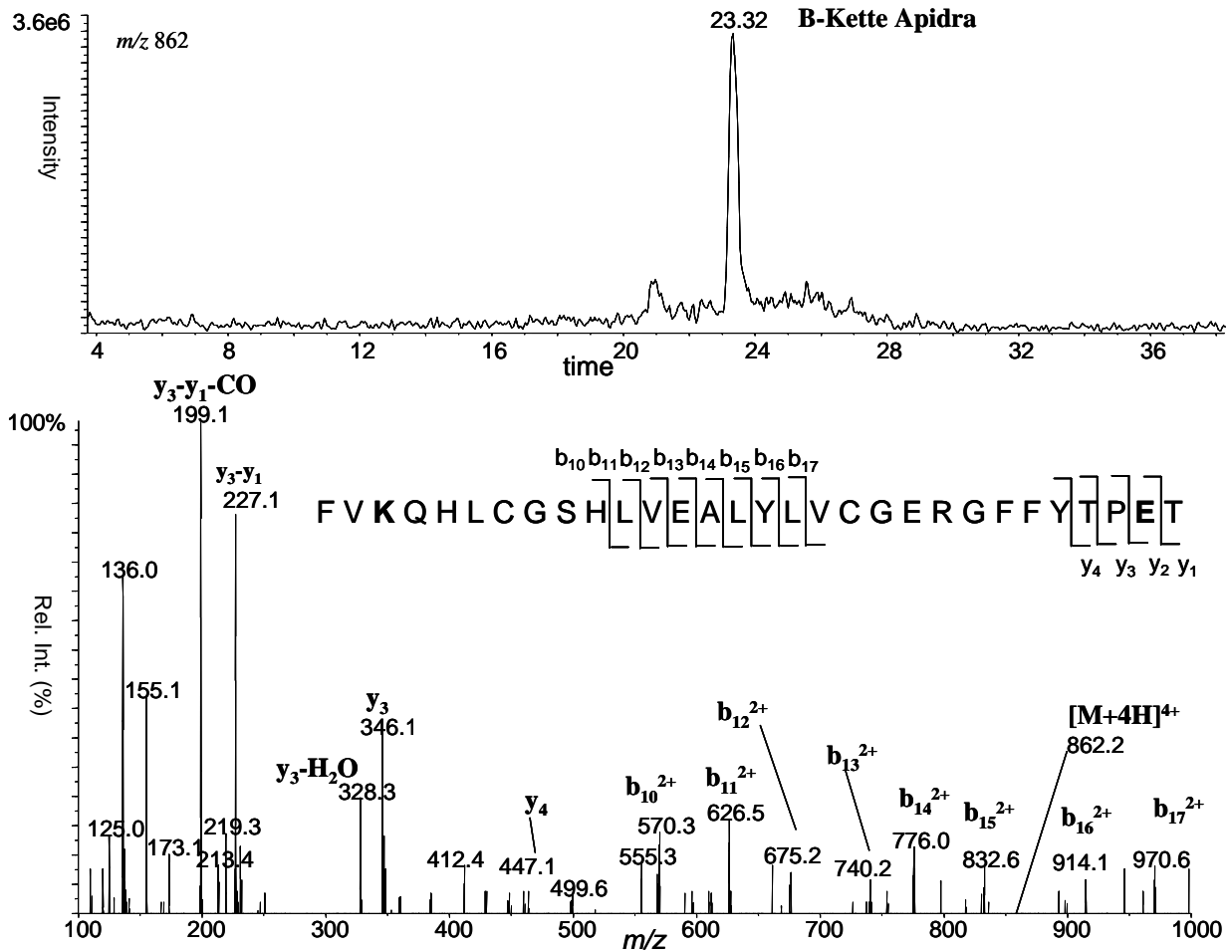
In Analogie dazu sind in Abb. 54 und 55 die Ergebnisse der Analyse einer Dopingkontrollprobe eines Athleten gezeigt, der mit Humalog behandelt worden ist. Auch hier kann die Applikation des synthetischen Insulins anhand der intensiven Signale in den Chromatogrammen (bei 17,4 in Abb. 54 bzw. 18,0 min in Abb. 55) und dem diagnostischen Ion  $y_2$  bei  $m/z$  217 in den MS/MS-Spektren für das intakte Molekül (Abb. 54) und der reduzierten B-Kette (Abb. 55) eindeutig nachgewiesen werden und gleichzeitig eine Differenzierung gegenüber HI vorgenommen werden (siehe auch Kap. 4.1.2.3/4).

**Tab. 5:** Untersuchte Dopingkontrollproben (Urin) von Athleten mit insulinpflichtigem *Diabetes mellitus*, aufgeschlüsselt nach Geschlecht, Sportart und identifiziertem Insulin bzw. Insulinanalogen.

Nr.	Geschlecht	Sportart	Insulin
1	m	Gewichtheben	HI
2	w	Kraftsport	HI
3	w	Wrestling	HI
4	m	Fussball	Humalog
5	m	Rollstuhl-Rugby	Novolog
6	m	Kraftsport	Apidra
7	w	Kanu	Apidra
8	m	Fussball	HI
9	m	Tennis	Novolog
10	w	Tennis	HI
11	m	Gewichtheben	Novolog
12	m	Kraftsport	HI
13	w	Hockey	Humalog
14	m	Kraftsport	Apidra
15	m	Leichtathletik	Novolog
16	w	Taekwondo	HI
17	m	Kugelstoßen	HI
18	m	Eishockey	Apidra
19	m	Leichtathletik	Novolog
20	w	Skilanglauf	Humalog

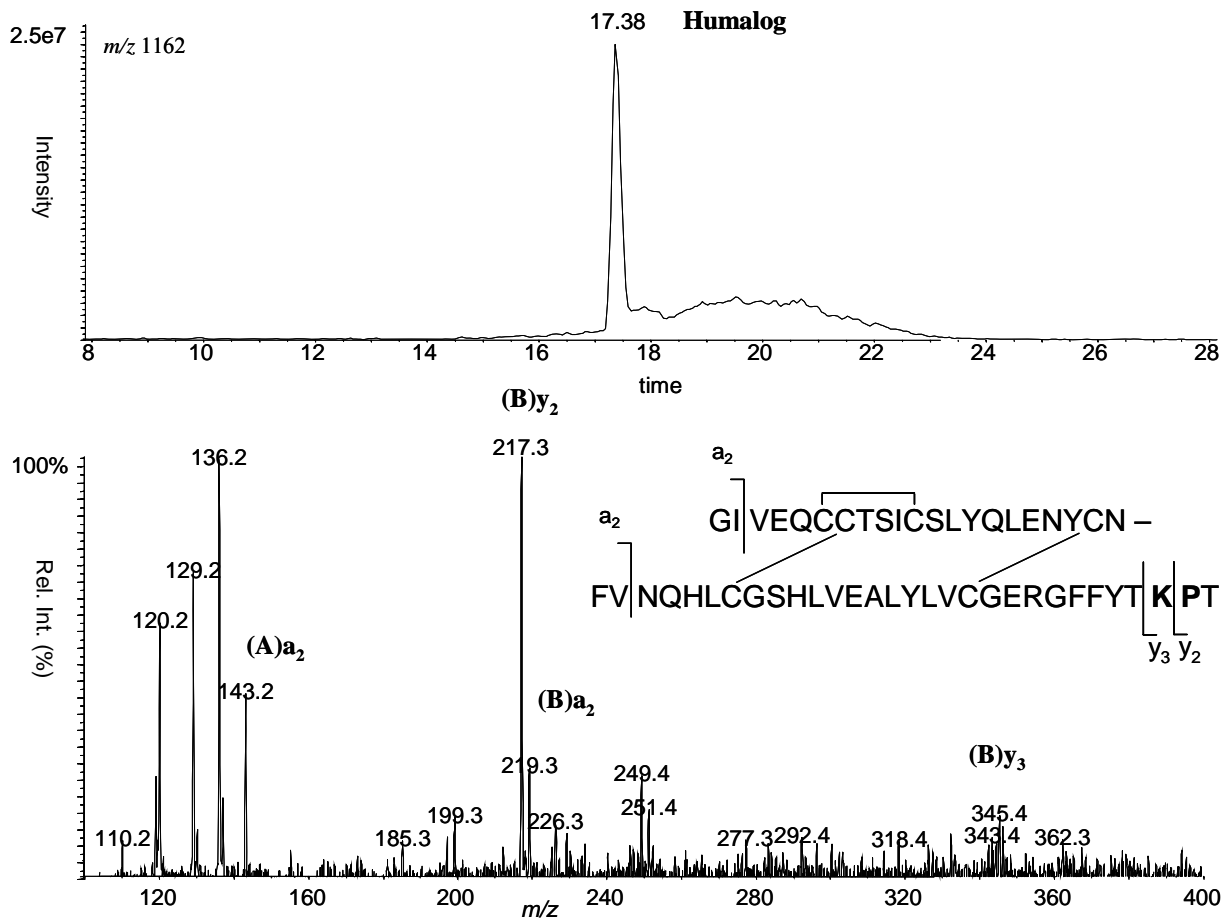


**Abb. 52:** ESI-Produktionen-Chromatogramm und MS/MS-Spektrum des fünffach geladenen Quasimoleküls von Apidra ( $m/z$  1165, bei 20,4 min) aus einer Dopingkontrollprobe eines Athleten, der als Diabetiker mit dem schnellwirkenden Insulinanalogon Apidra behandelt worden ist.

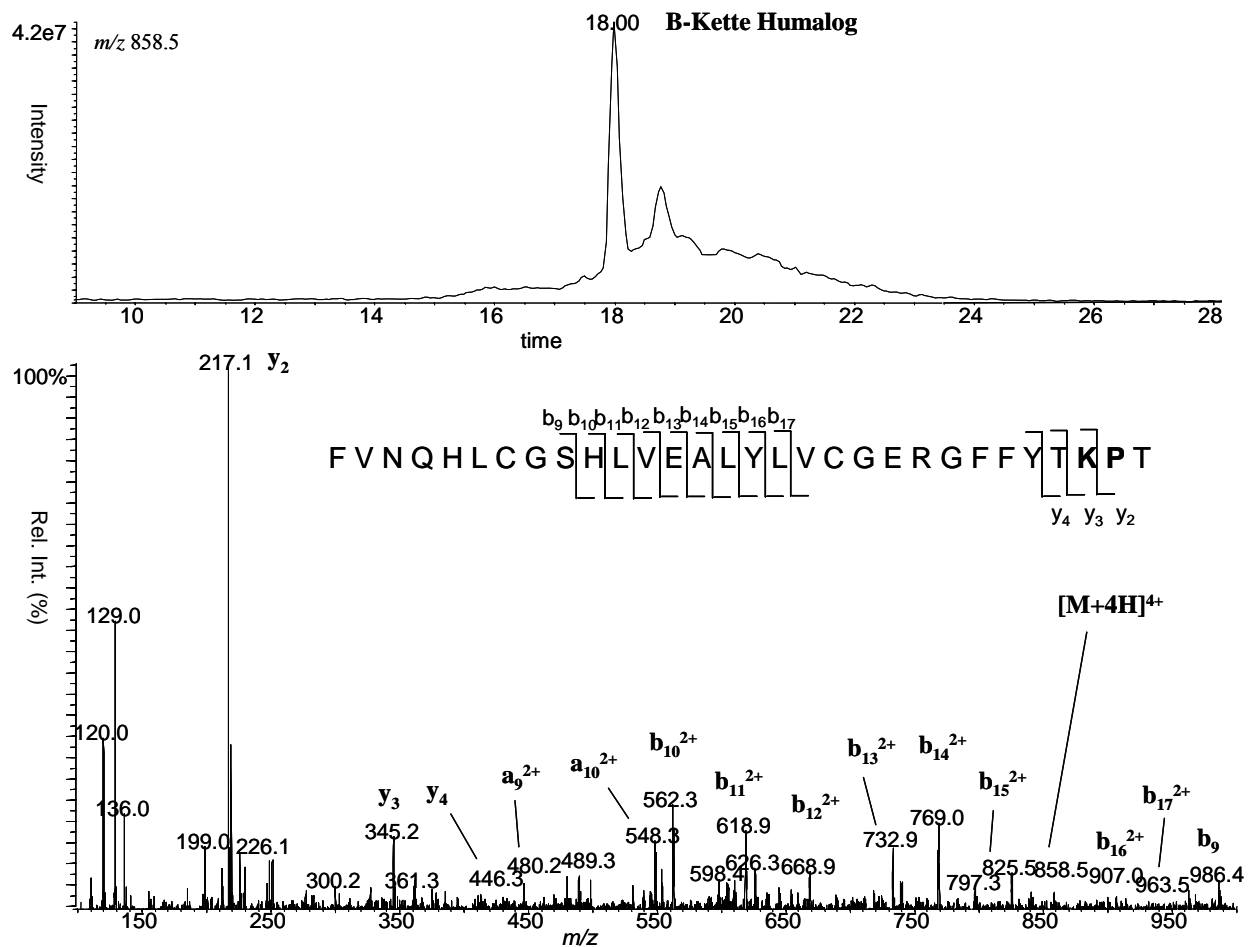


**Abb. 53:** ESI-Produktionen-Chromatogramm und MS/MS-Spektrum des vierfach geladenen Quasimoleküls der reduzierten B-Kette von Apidra ( $m/z$  862, bei 23,3 min) aus einer Dopingkontrollprobe (Urin) eines Athleten, der als Diabetiker mit dem schnellwirkenden Insulinanalogon Apidra behandelt worden ist.





**Abb. 54:** ESI-Produktionen-Chromatogramm und MS/MS-Spektrum des fünffach geladenen Quasimoleküls von HI/Humalog ( $m/z$  1162, bei 17,4 min) aus einer Dopingkontrollprobe eines Athleten (Diabetiker), der mit dem schnellwirkenden Insulinanalogon Humalog behandelt worden ist.



**Abb. 55:** ESI-Produktionen-Chromatogramm und MS/MS-Spektrum des vierfach geladenen Quasimoleküls der reduzierten B-Kette von HI/Humalog ( $m/z$  858,5, bei 18,0 min) aus einer Dopingkontrollprobe (Urin) eines Athleten (Diabetiker), der mit dem schnellwirkenden Insulinanalogon Humalog behandelt worden ist.

#### 4.6 Untersuchungen zur Analytik der langwirkenden Insulinanalogen Lantus und Levemir in Urin

Bei der Analyse von Urinen von Patienten oder Athleten, die als Diabetiker mit den langwirkenden Insulinanalogen Lantus oder Levemir behandelt worden sind, konnten im Gegensatz zu den schnell wirkenden Analogon zunächst keine dieser Analyten nachgewiesen werden. Auch der Transfer der Methode auf ein empfindlicheres Massenspektrometer (von API 2000 QTRAP auf API 4000 QTRAP) brachte diesbezüglich keine analytischen Erfolge, weil die langwirkenden Analoga offensichtlich nicht in ausreichender Menge intakt über die Niere ausgeschieden werden. Um jedoch trotzdem die Möglichkeit zu haben eine verbotene Applikation dieser Insuline im Dopingkontrollbereich aufzudecken, wurden verschiedene

metabolische Abbaewege mit eventuell auftretenden charakteristischen Metaboliten untersucht. Wie bereits im Literaturteil beschrieben (siehe Kap. 2.10), ist der Metabolismus von Insulin ein schon seit langem untersuchter Prozess, wobei durch eine *in vitro* Versuchsdurchführung mit speziellen Zellgeweben nie eine Exposition gegenüber allen Enzymklassen im Organismus simuliert werden kann [11, 114, 116, 117]. Erst die Identifizierung von Metaboliten nach vollständiger Körperpassage, d.h. von der Sekretion (bzw. Applikation) bis zur Ausscheidung, kann zur Implementierung von effizienten Zielanalyten für die Dopinganalytik führen.

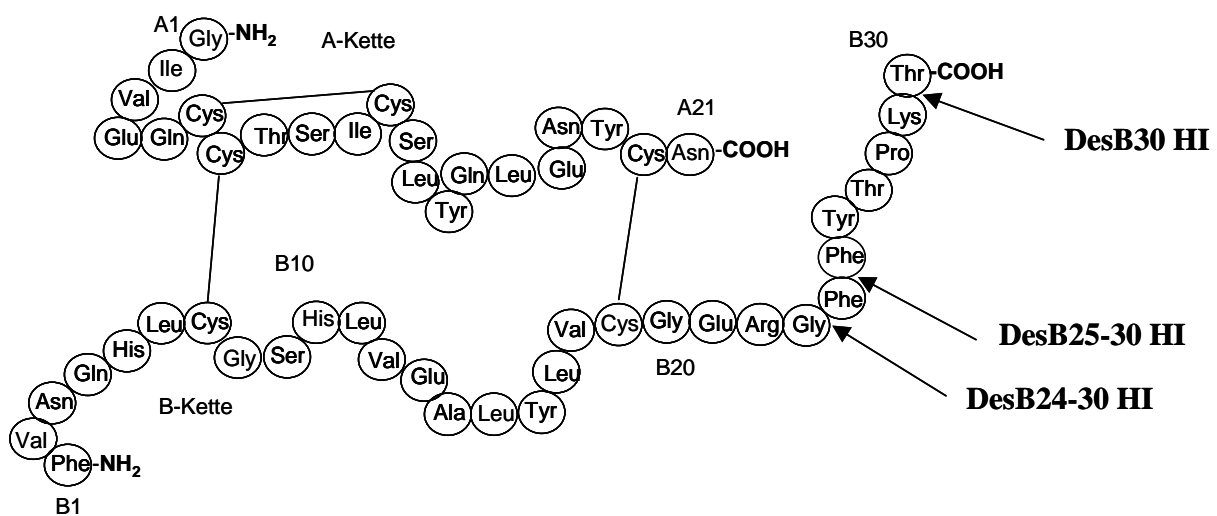
Die Suche nach in den Literatur bereits beschriebenen Abbauprodukten von HI im Urin macht dies ebenfalls deutlich (siehe auch Abb. 9), denn bis auf geringe Mengen von DesB25-30 HI konnten keine weiteren der Insulinbruchstücke gefunden werden, die sich theoretisch über die IAC hätten aufreinigen lassen können.

#### 4.7 Identifizierung der Abbauprodukte von HI und Levemir: DesB30 HI, DesB25-30 HI und DesB24-30 HI

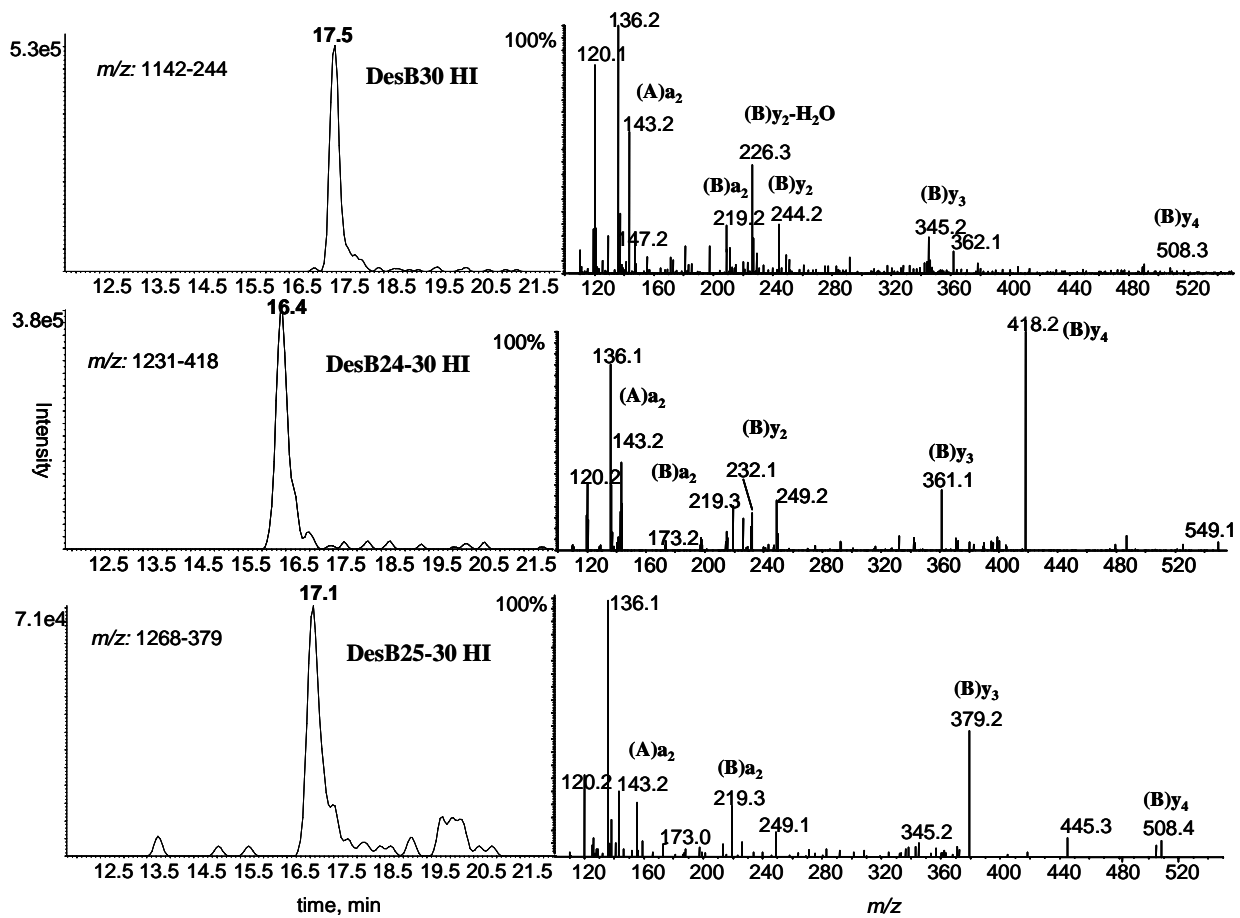
Die massenspektrometrische Identifizierung der Abbauprodukte wurde zunächst anhand von Urinproben von Patienten mit Insulinbehandlung (HI oder Levemir) nach beschriebener Probenaufarbeitung durchgeführt. Dazu wurden MS/MS-Experimente mit theoretisch kalkulierten Massen der verschiedenen Abbauprodukte entwickelt und die dazugehörigen Chromatogramme auf verdächtige Signale untersucht. Für das bis dahin unbekanntes Abbauprodukt DesB30 HI ergibt sich z. B. durch das Fehlen der Aminosäure Threonin an Position B30 ein Molekulgewicht von 5607 Da und für das fünffach protonierte Quasimolekülion  $[M+H]^{5+}$  wird ein Produktions-Experiment bei  $m/z = 1142$  durchgeführt (Abb. 56). Im resultierenden Chromatogramm zeigt sich ein intensives Signal zur etwa gleichen Retentionszeit wie intaktes HI, wobei mit dem dazugehörigen Produktionenspektrum das Abbauprodukt DesB30 HI eindeutig identifiziert werden kann (Abb. 57). Für die möglichen Abbauprodukte DesB29-30, DesB28-30, DesB27-30 und DesB26-30 HI wurden in den untersuchten Proben keine verdächtigen Signale detektiert. Die Anwesenheit der Abbauprodukte DesB25-30 HI und DesB24-30 HI (Molekulgewichte: 5070 bzw. 4923 Da) konnte dann jedoch wieder über charakteristische Produktionenspektren mit intensiven Signalen für die Quasimolekülionen  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z = 1269$  bzw. 1231 nachgewiesen werden. Weitere Metabolite (DesB23-30 HI o.ä.) von HI oder Levemir wurden in den untersuchten Urinproben nicht gefunden. Abb. 57 zeigt extrahierte Produktionen-

Chromatogramme mit den dazugehörigen MS/MS-Spektren aus einem Patientenurin nach Behandlung mit Levemir. Die Metaboliten DesB30 HI ( $m/z$  1142 bei 17,5 min), DesB24-30 HI ( $m/z$  1231 bei 16,4 min) und DesB25-30 HI ( $m/z$  1268 bei 17,1 min) können hier eindeutig durch intensive Signale im jeweiligen Chromatogramm und charakteristische Produktionen ( $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Fragmente) im MS/MS-Spektrum identifiziert werden. Zur zusätzlichen Absicherung der Ergebnisse können diese Experimente auch nach Reduktion für die B-Kette durchgeführt werden. So ist zum Beispiel in Abb. 58 das extrahierte Produktionen-Chromatogramm ( $m/z$  849) mit einem Signal bei 16,5 min für das Quasimolekül  $[M+3H]^{3+}$  und dem dazugehörigen MS/MS-Spektrum der DesB24-30 HI-B-Kette, isoliert aus einem Patientenurin nach Behandlung mit rekombinatem HI, gezeigt. Die Identifizierung kann hier anhand einer umfassenden Reihe von einfach- oder mehrfachgeladenen Produktionen des  $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\beta$ -Typs erfolgen.

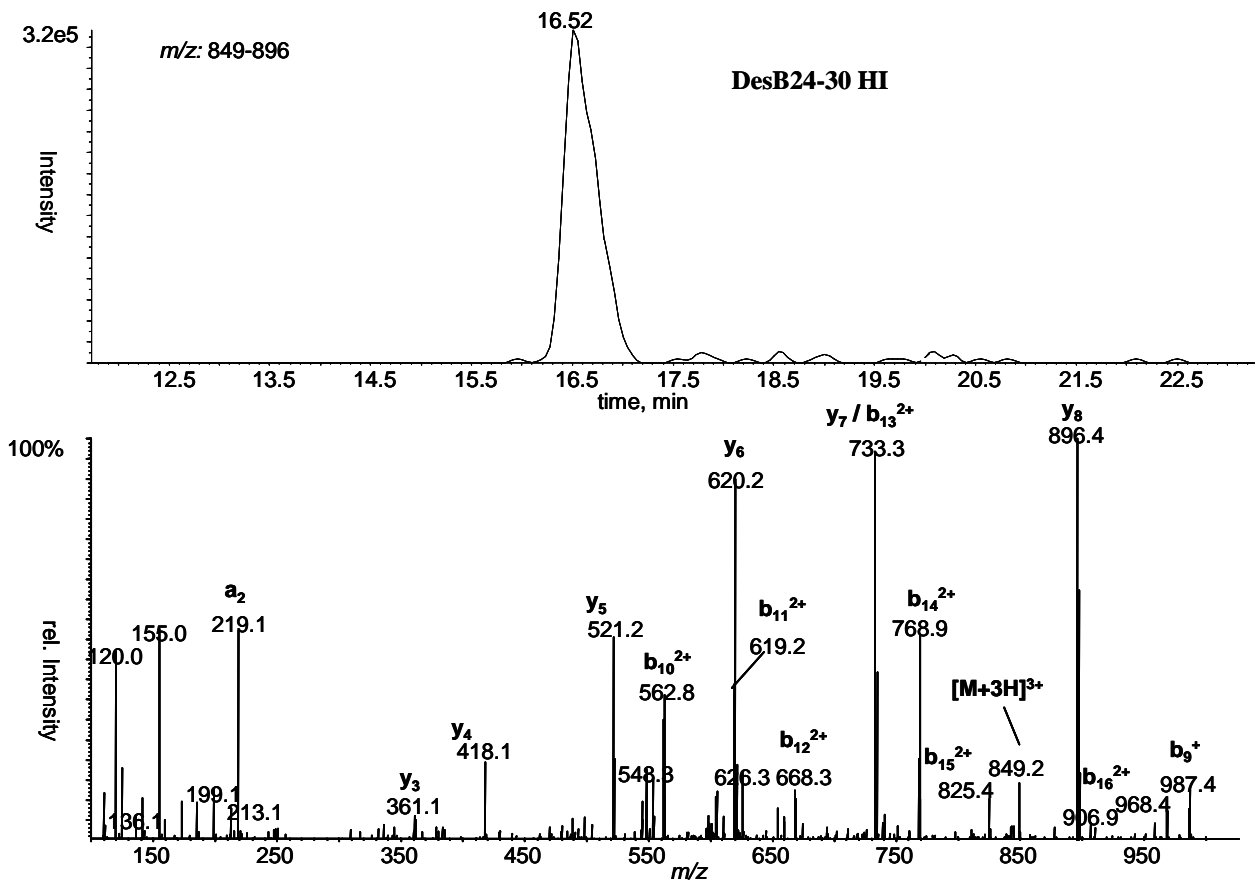
In allen untersuchten Proben war DesB30 HI jeweils Hauptmetabolit und selbst in Urinproben von gesunden Patienten ohne Insulinbehandlung kann dieser Analyt in Abhängigkeit vom HI-Gehalt regelmäßig nachgewiesen werden. Eine einfache Synthese durch enzymatische Hydrolyse mit Lys-C aus HI-Referenzsubstanz erbrachte jedoch nur eine ca. 50 %-ige Umsetzung und wurde damit als ungeeignet eingestuft. Einen DesB30 HI-Standard mit einer Reinheit von  $> 95\%$  wurde dann freundlicherweise von der Firma Novo Nordisk (Dänemark) zur Verfügung gestellt. Sowohl die Retentionszeit als auch das dazugehörige Produktionenspektrum der analysierten Referenzsubstanz bestätigten die Identität des bereits in den Urinen nachgewiesenen Abbauproduktes DesB30 HI (siehe auch Kap. 4.1.2.13/14).



**Abb. 56:** Aminosäuresequenz von Humaninsulin mit den Spaltungsstellen der aus Urin identifizierten metabolischen Abbauprodukte DesB30 HI, DesB25-30 HI und DesB24-30 HI.



**Abb. 57:** Extrahierte ESI-Produktions-Chromatogramme und MS/MS-Spektren der fünf- bzw. vierfach geladenen Quasimolekülonen von DesB30 HI als  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  1142-244, DesB24-30 HI als  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z$  1231-418 und DesB25-30 HI als  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z$  1268-379 aus einer Urinprobe von einem Patienten, der an *Diabetes mellitus* leidet und mit dem langwirkenden Insulinanalogon Levemir behandelt worden ist.



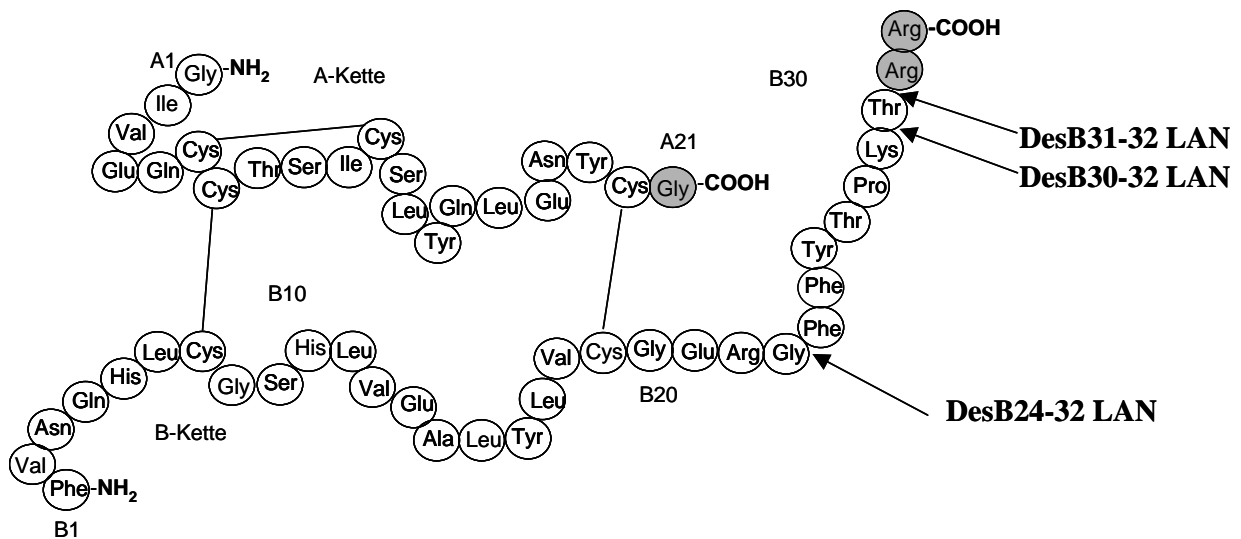
**Abb. 58:** Extrahiertes ESI-Produktions-Chromatogramm ( $m/z$  849-896) und MS/MS-Spektrum des dreifach geladenen Quasimoleküls  $[M+3H]^{3+}$  der reduzierten B-Kette von DesB24-30 HI aus einer Urinprobe von einem Patienten, der als Diabetiker mit rekombinantem HI behandelt worden ist.

#### 4.8 Identifizierung der Abbauprodukte von Lantus (LAN): DesB30-32 LAN, DesB31-32 LAN und DesB24-32 LAN

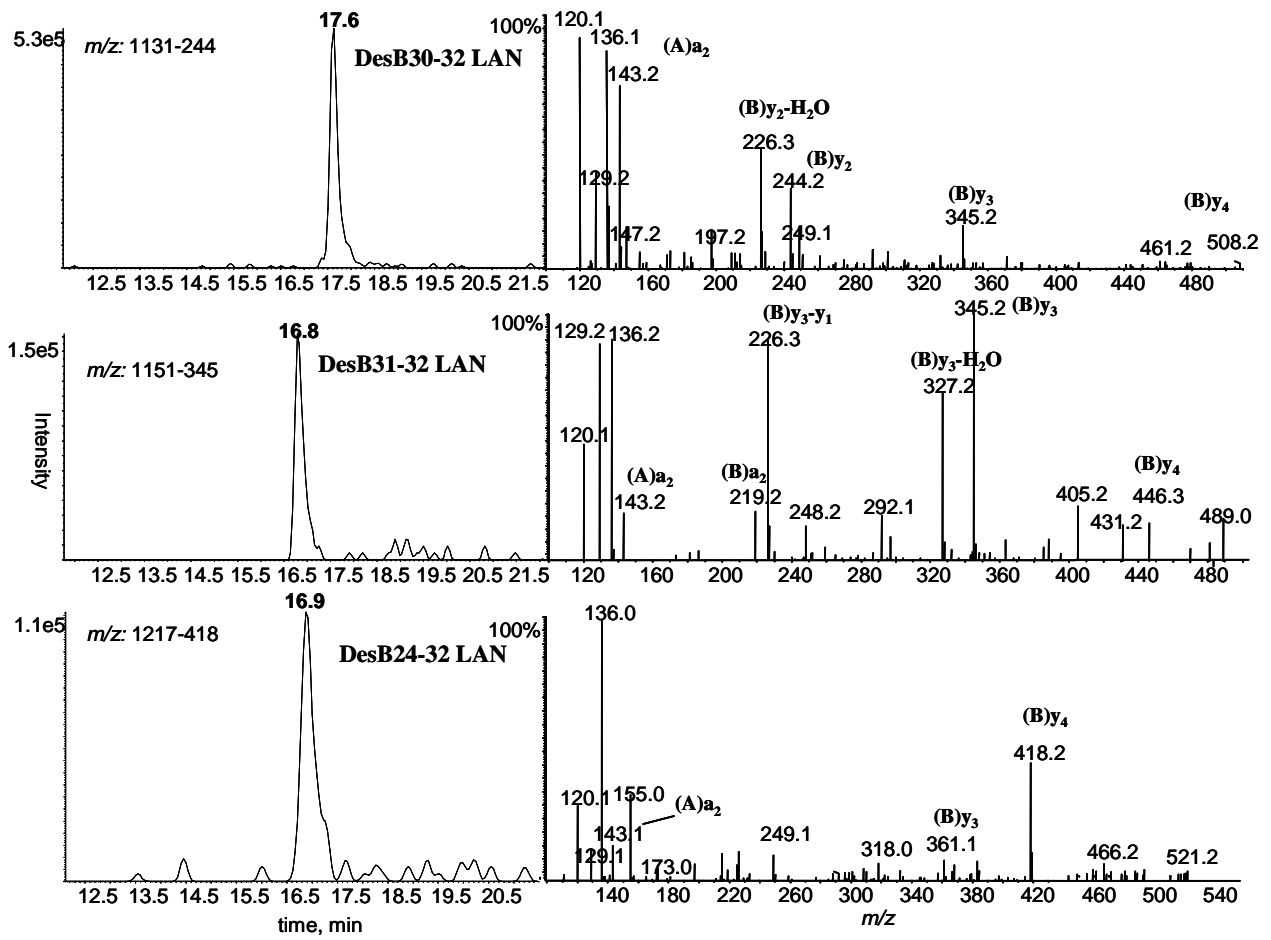
Wie bereits für die HI- und Levemir-Abbauprodukte erfolgreich angewendet, wurde auch für das langwirkende Analoge Lantus die Identifizierung der Metabolite zunächst aus Patientenurin durchgeführt. Mit Produktionen-Experimenten der vier- bzw. fünffach geladenen Quasimolekülen bei  $m/z = 1151$ ,  $1131$  und  $1217$  konnten die Abbauprodukte DesB31-32-, DesB30-32- und DesB24-30 LAN anhand von charakteristischen MS/MS-Spektren identifiziert werden (Abb. 59). Abb. 60 zeigt extrahierte Produktionen-Chromatogramme mit den dazugehörigen MS/MS-Spektren aus einem Patientenurin nach Behandlung mit Lantus. Die Metaboliten DesB30-32 LAN ( $m/z$  1131 bei 17,6 min), DesB31-32 LAN ( $m/z$  1151 bei

16,8 min) und DesB24-32 LAN ( $m/z$  1217 bei 16,9 min) können hier eindeutig durch intensive Signale im jeweiligen Chromatogramm und charakteristische Produktionen ( $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Fragmente) im MS/MS-Spektrum identifiziert werden. Alle diese LAN-Metaboliten unterscheiden sich von den Abbauprodukten von HI durch die Modifikation an der A-Kette und dem daraus resultierenden niedrigeren Molekulargewicht.

Im Gegensatz zu HI konnte ein DesB30-32 LAN-Standard recht einfach durch Hydrolyse mit Lys-C aus Lantus-Referenzsubstanz hergestellt werden. Die enzymatische Umsetzung war nach 2 h schon ausreichend (siehe Kap. 3.7.2). Mit Hilfe des charakteristischen Produktionenspektrums und der passenden Retentionszeit der so hergestellten Referenzsubstanz ist die Identität des Abbauproduktes DesB30-32 LAN zusätzlich bestätigt worden.



**Abb. 59:** Aminosäuresequenz von Lantus mit den Spaltungsstellen der aus Urin identifizierten metabolischen Abbauprodukte DesB31-32 LAN, DesB30-32 LAN und DesB24-30 LAN.



**Abb. 60:** Extrahierte ESI-Produktionen-Chromatogramme und MS/MS-Spektren der fünf- bzw. vierfach geladenen Quasimolekülonen von DesB30-32 LAN als  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  1131-244, DesB31-32 LAN als  $[M+5H]^{5+}$  bei  $m/z$  1151-345 und DesB24-32 LAN als  $[M+4H]^{4+}$  bei  $m/z$  1217-418 aus einer Urinprobe von einem Patienten (Diabetiker), der mit dem langwirkenden Insulinanalogen Lantus behandelt worden ist.

## 4.9 Methodvalidierung zum qualitativen Nachweis der Abbauprodukte DesB30 HI und DesB30-32 LAN in Urin

### 4.9.1 Spezifität

Zehn unterschiedliche Urine gesunder Teilnehmer zeigten für die urinäre Matrix keine interferierenden Signale in den entsprechenden Produktionen-Chromatogrammen von



DesB30 HI und DesB30-32 Lantus. Im Falle von DesB30 HI stand keine echte Blank-Matrix zur Verfügung und deshalb wurde eine Matrix verwendet, die nur sehr wenig HI und DesB30 HI enthielt.

#### 4.9.2 Nachweisgrenze (LOD)

Die Nachweisgrenze der Methode wird über ein Signal-zu-Rauschverhältnis zur entsprechenden Retentionszeit des Produktions-Chromatogramms von mindestens 3 bestimmt. Für 20 mL Urin liegt das LOD der beiden Analyten bei 25 pg/mL (entspr. 5 fmol/mL).

#### 4.9.3 Präzision am LOD

Zur Absicherung des ermittelten LOD wurde die Präzision einer Sechsfach-Bestimmung bei 25 pg/mL ermittelt. Für alle Analogen wurde bei einem  $S/N > 3$  eine relative Standardabweichung der über den ISTD korrigierten Peakflächen von  $< 20\%$  ermittelt. Dabei konnten für die einzelnen Analyten Präzisionen von 12 und 14 % für DesB30 HI bzw. DesB30-32 Lantus bestimmt werden. Alle Bestimmungsreihen waren nach *Dixon* frei von Ausreißern [128].

#### 4.9.4 Wiederfindung

Der Verlust von Analyten während der Aufarbeitung ist bei einer Konzentration von 200 pg/mL bestimmt worden, indem die Dotierung vor bzw. nach Aufarbeitung erfolgte. Die mittleren Wiederfindungsraten wurden mit 97 und 109 % für DesB30 HI bzw. DesB30-32 Lantus berechnet, wobei die jeweiligen relative Standardabweichungen der sechsfach Bestimmungen weniger als 20 % betragen.

#### 4.9.5 Linearität

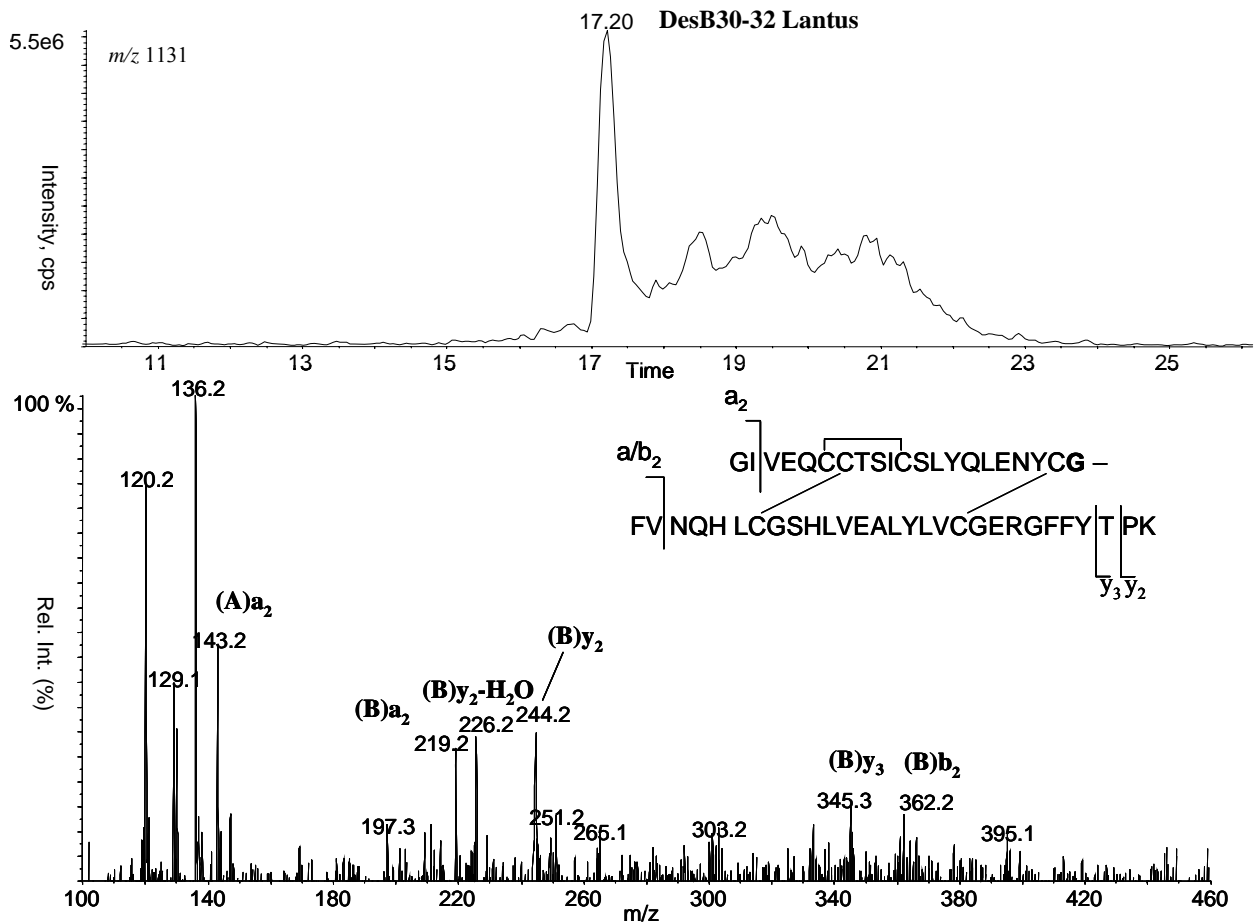
Innerhalb des festgelegten Arbeitsbereiches wurde die Linearität der Methode geprüft. Zwischen 25 und 200 pg/mL wurden Proben dotiert und die über den ISTD korrigierten Peakflächen bezüglich ihrer Korrelation ausgewertet. Die Kalibrierfunktionen mit Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Abbauprodukte sind für DesB30 HI:  $y=0.006x-0,242$  mit  $r=0,988$  und DesB30-32 Lantus:  $y=0,024x-0,075$  mit  $r=0,995$ . Der Linearitätstest nach Mandel erlaubt eine lineare Annäherung in beiden Fällen. Der vergleichsweise große y-Achsenabschnitt für die DesB30 HI-Funktion kann (wie bereits bei Plasmaproben diskutiert) durch den endogenen Gehalt des Analyten im dotierten Urin erklärt werden.

#### 4.9.6 Stabilität

Die Ergebnisse belegen die Stabilität der Analyten über 8 Wochen bei 2-8 °C und 16 Wochen bei -18 °C, weil nach Lagerung über diesen Zeitraum und Analyse keine signifikant unterschiedlichen Peakflächen (d.h. größer als methodencharakteristische Präzision) für die jeweiligen Metaboliten ermittelt worden sind. Auch konnte nach Lagerung über 3 Tage bei 22 °C keine Instabilität oder Abbau der Analyten im Urin festgestellt werden.

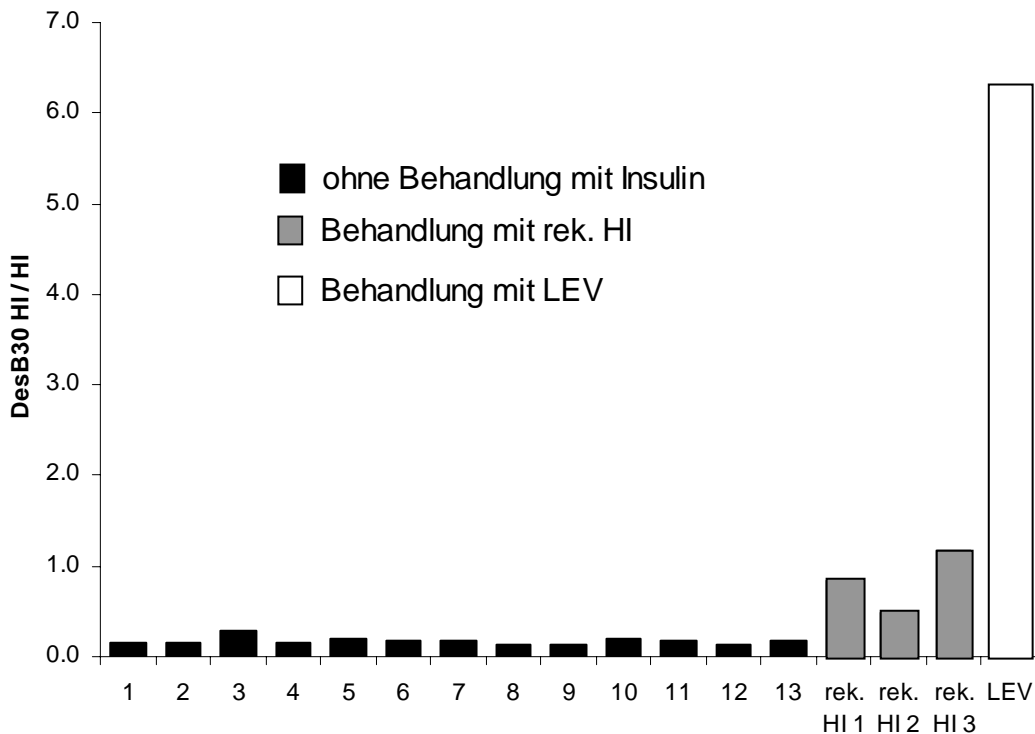
#### 4.10 Untersuchung von Dopingkontrollproben

Der Nachweis der Lantus-Abbauprodukte DesB30-32, DesB31-32 und DesB24-32 LAN in regulären Dopingkontrollproben von Athleten die nicht an *Diabetes mellitus* leiden ist ein direkter Beweis für den Mißbrauch des langwirkenden Insulinanalogen, denn durch die Modifikation der A-Kette an Position A21 sind alle diese Metaboliten massenspektrometrisch von den Abbauprodukten des HI unterscheidbar. Abb. 61 zeigt ein Chromatogramm mit entsprechendem MS/MS-Spektrum des fünffach protonierten Quasimoleküls ( $m/z$  1131) von DesB30-32 LAN, gemessen aus einem Dopingkontrollurin eines Athleten (Diabetiker), der mit Lantus behandelt worden ist.



**Abb. 61:** ESI-Produktionen-Chromatogramm und MS/MS-Spektrum des fünffach geladenen Quasimoleküls mit einem Signal bei 17,2 min für DesB30-32 LAN ( $m/z$  1131) aus einer regulären Dopingkontrollprobe eines Athleten mit *Diabetes mellitus*, der mit dem langwirkenden Insulinanalogon Lantus behandelt worden ist.

Ein solcher direkter Beweis für den potentiellen Mißbrauch von rekombinantem HI oder Levemir kann mit der entwickelten Methode leider nicht erbracht werden, da eine massenspektrometrische Unterscheidung der Herkunft von DesB30-, DesB25-30- und DesB24-30 HI nicht möglich ist. Die aufgeführten Analyten können sowohl aus endogen produzierten HI entstehen als auch nach einer verbotenen Applikation von rekombinantem HI oder Levemir im Urin nachgewiesen werden.



**Abb. 62:** Graphische Darstellung der Verhältnisse von DesB30 HI zu HI in 13 Urinproben von gesunden Menschen (schwarz), in 3 Proben von Patienten mit HI-Behandlung (grau) und einer Proben von einem Diabetiker nach Levemir-Applikation (weiß).

Ein möglicher Ansatz, um eine verbotene HI-Applikation nachzuweisen, ist eventuell in einem unterschiedlichen Metaboliten-Profil zu finden. Ein Vergleich der Verhältnisse von DesB30 HI zu HI in 13 Urinproben gesunder Individuen ohne Insulinbehandlung mit 3 Urinproben von Patienten, die mit rekombinatem HI behandelt worden sind und einer Probe von einem Patienten nach Levemir-Injektion, ist in Abb. 62 gezeigt. Es wird deutlich, dass die Urine mit exogener Insulinzufuhr ein verändertes Insulin-Abbauprodukt-Profil aufweisen, welches sich in einem erhöhten DesB30 HI / HI-Verhältnis zeigt.

Es ist generell anzunehmen, dass langwirksame Insulinanaloga gesteigerten metabolischen Prozessen durch eine verlängerte Exposition im Organismus unterliegen und so zu einem veränderten Abbauprodukt-Profil im Urin führen [107, 118]. Im Falle von Levemir ist dies noch zusätzlich durch die im Vergleich zu HI etwa vier- bis fünffach niedrigere biologische Aktivität beeinflusst, wodurch absolut eine höhere Insulinmenge appliziert wird und daraus entsprechend höhere Plasmainsulinspiegel resultieren. Darüber hinaus ist das subkutan injizierte Insulin nach Applikation im Unterhautgewebe zunächst anderen Enzymen

(Carboxypeptidasen u.ä.) ausgesetzt, als das im Blut zirkulierende Hormon. Ein solches unterschiedliches Abbau-Verhalten von zirkulierendem und injiziertem Insulin ist am Beispiel von Proinsulin bereits beschrieben, der Mechanismus oder die beteiligten Enzyme sind jedoch bis heute nicht vollständig geklärt [133, 134].

Insgesamt können diese Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur als vielversprechende, aber nicht endgültig validierte analytische Ansätze verstanden werden. Bei weiterführenden Studien zur Untersuchung dieser metabolischen Prozesse sollte weiterhin berücksichtigt werden, dass sich der Organismus eines Athleten im Training oder im Wettkampf unter extremen physiologischen Bedingungen befindet. Dies hat bekanntermaßen erheblichen Einfluß auf den gesamten Hormonhaushalt und auch insbesondere auf die stoffwechselaktiven Hormone [135, 136]. So haben beispielsweise die bei physischer und psychischer Belastung stark ansteigenden Plasmakonzentrationen der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin eine hemmende Wirkung auf die Insulin-Rezeptor-Bindung und es ist anzunehmen, dass das Abbauprodukt-Profil von Insulin durch die Stimulation des adrenergen-sympathischen Nervensystems ebenfalls beeinflusst wird [33].

## 4. 11 C-Peptid

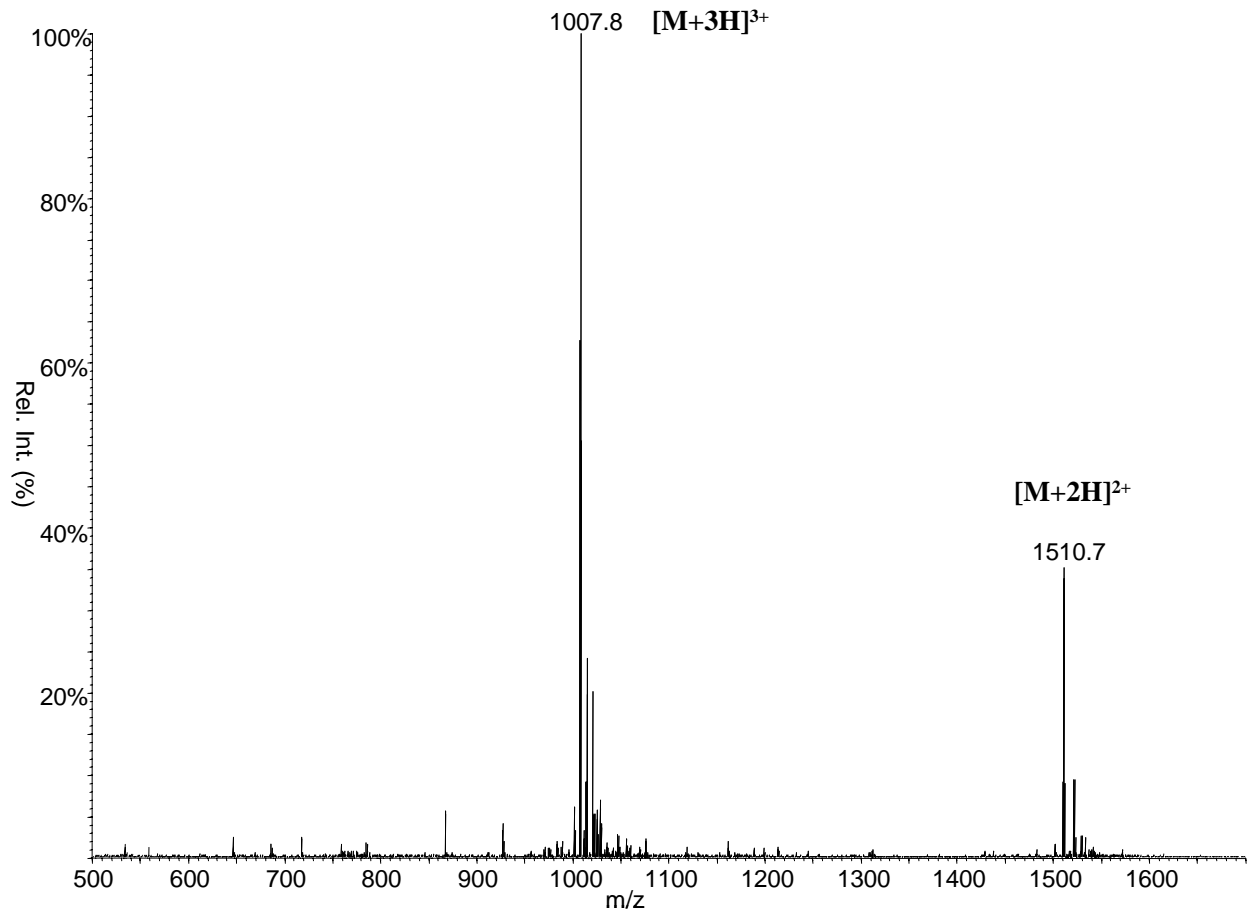
### 4.11.1 Massenspektrometrische Charakterisierung

Über die Spritzenpumpe des Massenspektrometers wird eine C-Peptid-Referenzlösung (10 pmol/ $\mu$ L) in die Ionenquelle injiziert, positiv ionisiert und ohne Fragmentierung im Fullscan-Modus im Bereich von  $m/z = 500$  bis 1700 detektiert. Dabei zeigt sich das dreifach protonierte Quasimolekülion  $[M+3H]^{3+}$  bei  $m/z = 1007,8$  als intensivstes Signal neben dem weniger intensiven  $[M+2H]^{2+}$  bei  $m/z = 1510,7$  (Abb. 63).

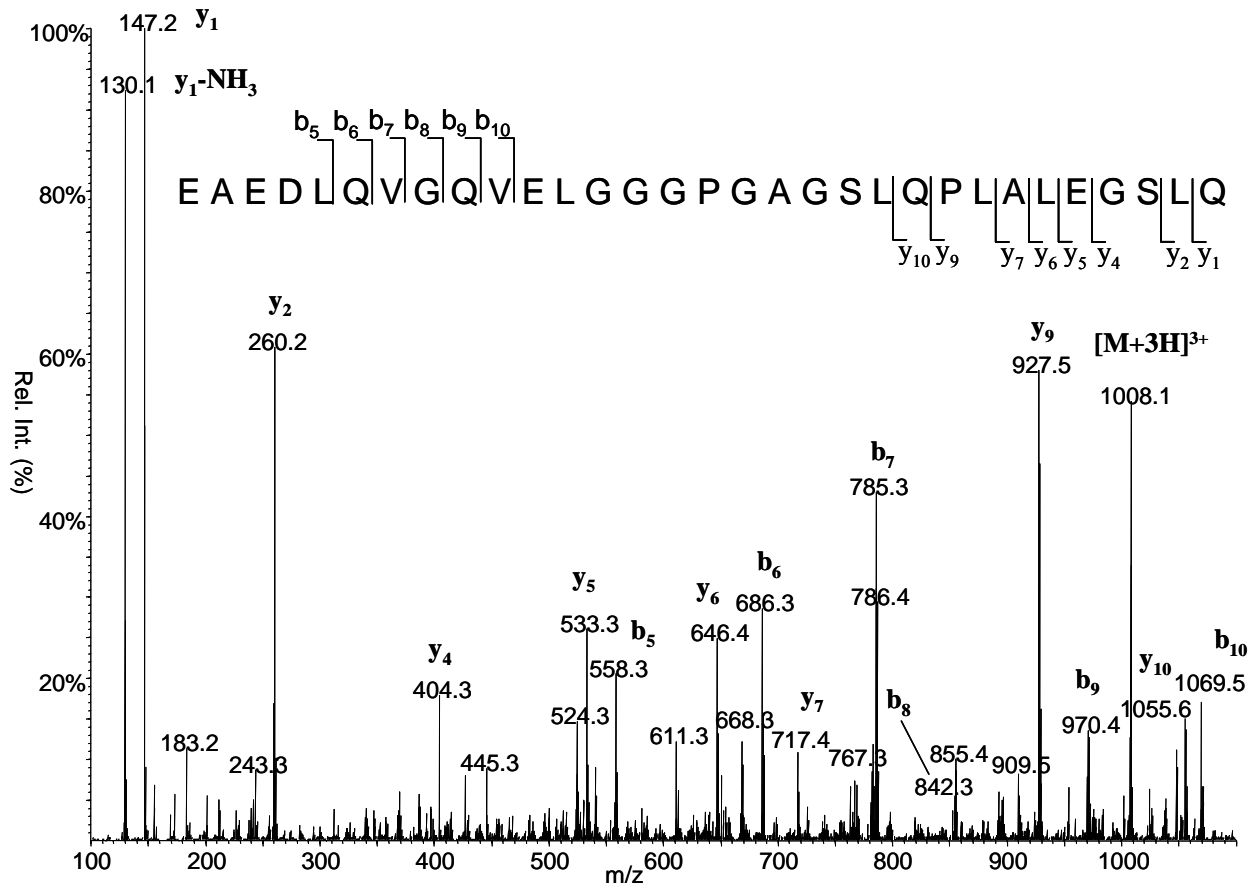
Nach Isolation des Quasimolekülions  $[M+3H]^{3+}$  bei  $m/z = 1007,8$  im Q1 und anschließender Fragmentierung in der Kollisionszelle Q2 des Massenspektrometers bei Kollisionsenergien von 35 eV lassen sich sehr aussagekräftige Produktions-Spektren erzeugen (Abb. 64).

Diese Produktionen sind charakteristische y- und b-Ionen aus der Aminosäuresequenz des C-Peptids und erlauben eine eindeutige Identifikation des Analyten. Die Produktionen bei  $m/z = 1055, 927, 717, 646, 533, 404, 260$  und 147 konnten dabei als  $y_{10}, y_9, y_7, y_6, y_5, y_4, y_2$  und  $y_1$  identifiziert werden. Als eine Reihe von einfach geladenen b-Ionen sind im Produktions-Spektrum die Ionen  $b_{10}, b_9, b_8, b_7, b_6$  und  $b_5$  bei  $m/z = 1069, 970, 842, 686$  und 558 zu erkennen. Weiterhin wurde das intensive Signal bei  $m/z = 130$  über ein  $MS^3$ -Experiment (mit  $m/z = 1007,8$  und 147) als  $y_1-NH_3$  identifiziert.

Zur Entwicklung einer hochspezifischen und empfindlichen Meßmethode, die auch quantitative Bestimmungen gut ermöglichen soll, wurden zusätzlich zu den Produktions-Experimenten auch verschiedene MRM-Experimente entwickelt. Dazu wurden die verschiedenen Parameter (*Collision energy, Declustering potential* usw.) für jeweils einzelne Ionenübergänge optimiert und es zeigte sich, dass die Übergänge bei  $m/z = 1008/130, 1008/147$  und  $1008/86$  als intensivste Produktionen detektiert werden konnten und damit als charakteristische MRM-Experimente zur Auswertung etabliert wurden.



**Abb. 63:** ESI-Massenspektrum von C-Peptid-Referenzsubstanz mit den verschiedenen Ladungszuständen der Quasimolekülonen im zwei- und dreifach protonierten Zustand bei  $m/z$  1510,7 und 1007,8.

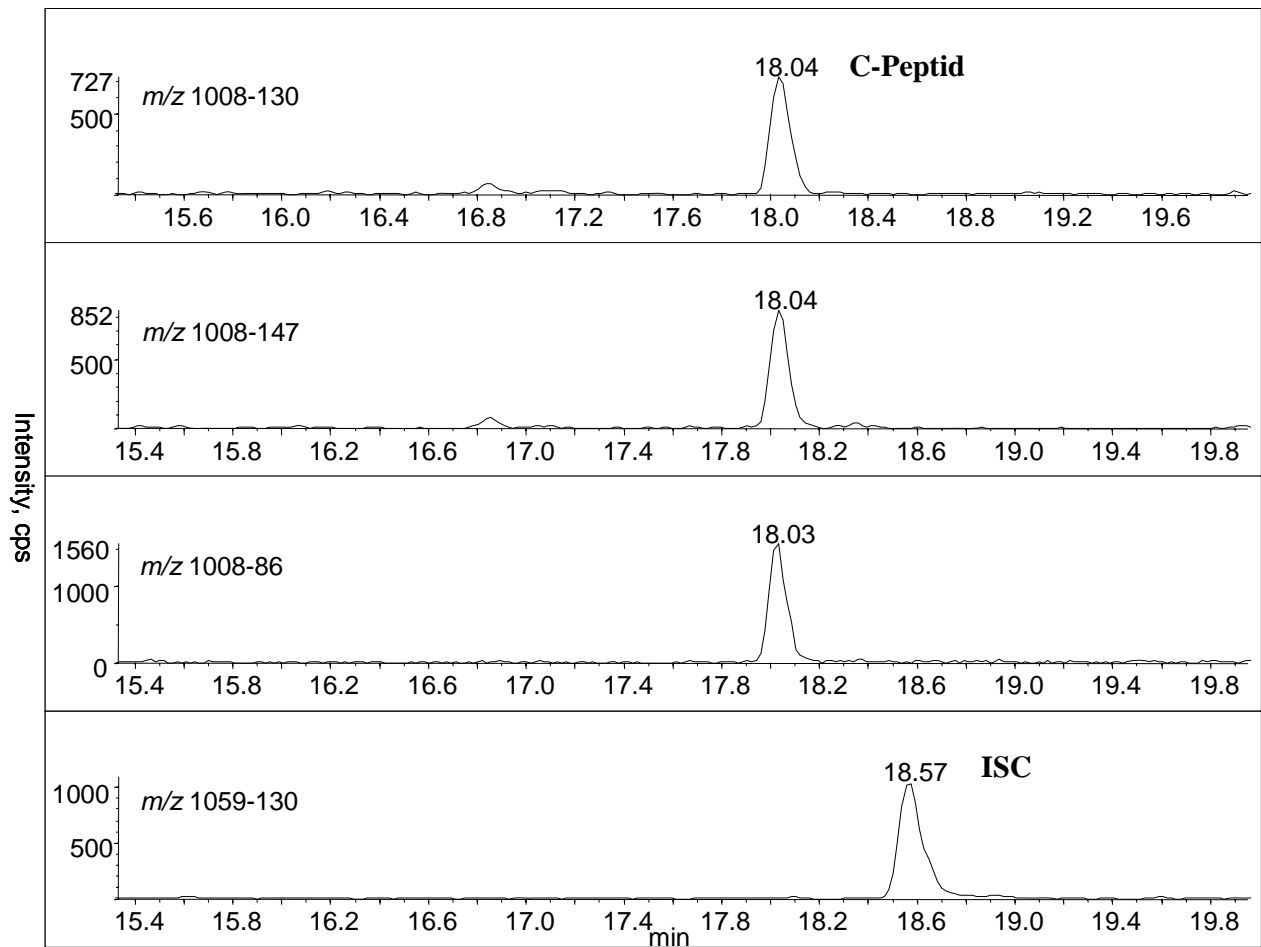


**Abb. 64:** ESI-Produktionenspektrum des dreifach geladenen Quasimoleküls  $[M+3H]^{3+}$  bei  $m/z$  1008,1 von C-Peptid-Referenzsubstanz nach CID mit den charakteristischen Produktionen des y- und b-Typs

#### 4.11.2 Flüssigkeitschromatographie

Die flüssigkeitschromatographische Methode wurde bezüglich der Laufmittel und des Säulenmaterials in Anlehnung an die bereits für die Insulinbestimmung gewählten Parameter entwickelt, um eine denkbare Kombination der Methode zu einem späteren Zeitpunkt zu ermöglichen. Neben der Abtrennung von störenden Matrixbestandteilen wurde auch auf eine symmetrische Peakform und geringe Peakbreite geachtet. Unter den gegebenen Bedingungen eluiert das C-Peptid in einem Zeitfenster von 18-19 min und der Interne Standard jeweils etwa 0,5 min später. Die Gesamtzeit für einen HPLC-Lauf beträgt 26 min bei einem Laufmittelfluß von 150  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Abb. 65 zeigt das Ergebnis der entwickelten massenspektrometrischen und flüssigkeitschromatographischen Methode anhand eines MRM-Chromatogramms, gemessen aus einem Urin von einer gesunden Person mit einem C-Peptid-Gehalt von etwa 30 ng/mL.





**Abb. 65:** ESI-MRM-Chromatogramme der dreifach geladenen Quasimolekülonen  $[M+3H]^{3+}$  mit den Ionenübergängen  $m/z$  1008-130, 1008-147 und 1008-86 für C-Peptid und dem Ionenübergang  $m/z$  1059-130 für den ISC (C-Peptid vom Hund), gemessen aus einem Urin von einem gesunden Menschen in einer Konzentration von ca. 30 ng/mL.

## 4.12 Bestimmung von C-Peptid im Urin

### 4.12.1 Methodvalidierung zur quantitativen Bestimmung von C-Peptid im Urin

#### 4.12.1.1 Spezifität

Durch stetige endogene Produktion und anschließende Spaltung von Proinsulin im Organismus selbst im Fastenzustand, gibt es für die Bestimmung von C-Peptid im Urin keine

Blank-Matrix mit der interferierende Signale im Chromatogramm ausgeschlossen werden können. Die Spezifität der Methode wurde jedoch anhand von Humanurin gezeigt, der für 24 h bei Raumtemperatur gelagert worden ist und somit durch die Instabilität des Analyten (siehe Abb. 66) kein C-Peptid mehr enthält. Es zeigten sich in den so behandelten Proben keine interferierenden Signale zur entsprechenden Retentionszeit in den zur Auswertung herangezogenen MRM-Ionenübergängen bei  $m/z = 1008/130$ ,  $1008/147$  und  $1008/86$ .

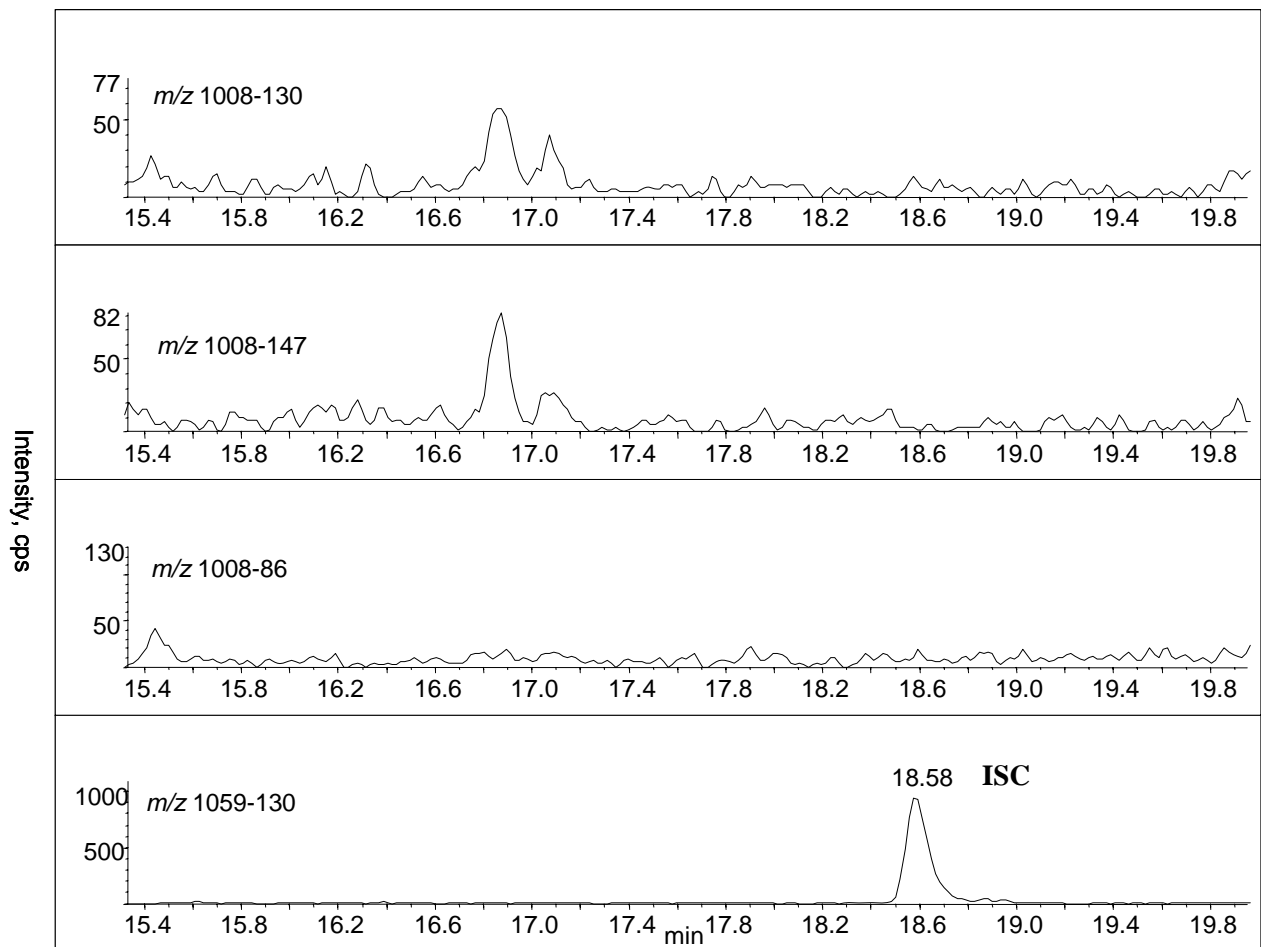
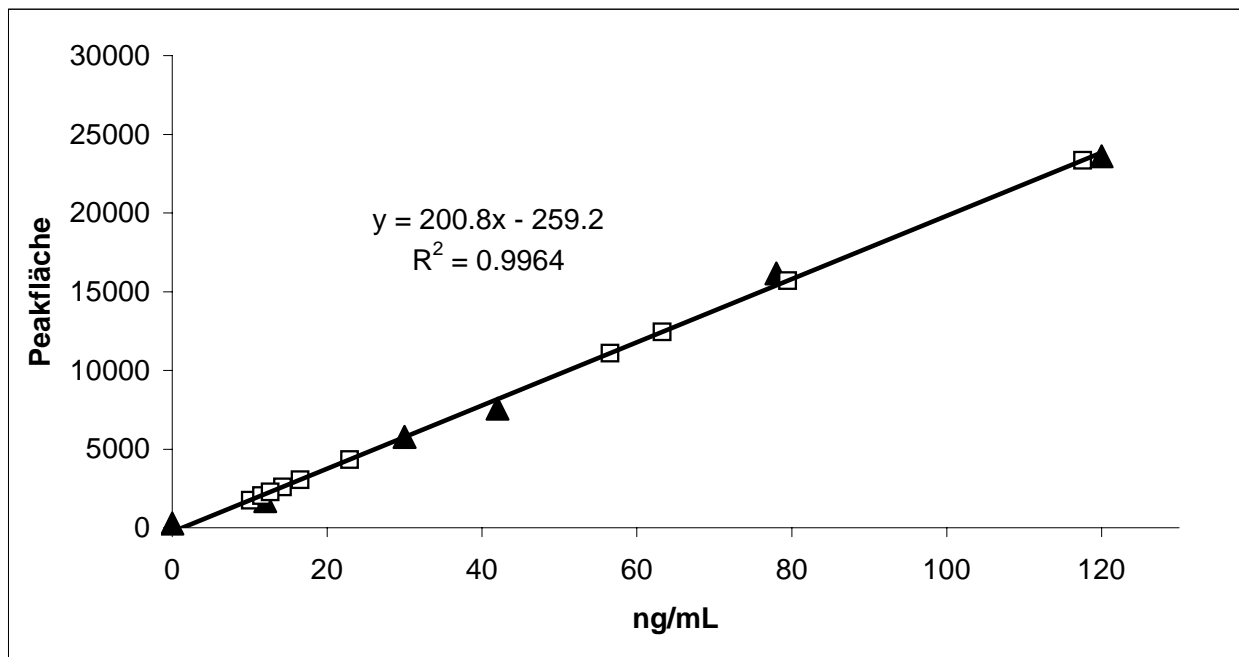


Abb. 66: ESI-MRM-Chromatogramme der dreifach geladenen Quasimolekülonen  $[M+3H]^{3+}$  mit den Ionenübergängen  $m/z$  1008-130, 1008-147 und 1008-86 für C-Peptid und dem Ionenübergang  $m/z$  1059-130 für den ISC (C-Peptid vom Hund), gemessen aus einem „Blank“-Urin von einem gesunden Menschen, der 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurde.

#### 4.12.1.2 Arbeitsbereich

Zur Ermittlung des zu erwartenden Arbeitsbereiches der Methode wurde der Gehalt an C-Peptid in zehn Urinproben von gesunden Menschen in unterschiedlichen Fastenzuständen bestimmt. Wie Abb. 67 zeigt, liegen die Werte in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten zwischen 10 und 120 ng/mL [89]. Um jedoch auch den Gehalt in Urinen von Typ II-Diabetikern bestimmen zu können, die teilweise sehr hohe C-Peptid-Urinkonzentrationen aufweisen, wird der obere Arbeitsbereich bis auf 300 ng/mL ausgedehnt (siehe auch Kap. 4.12.1.9).



**Abb. 67:** Graphische Darstellung der C-Peptid-Gehaltsbestimmung von zehn Urinproben von gesunden Probanden (□) mit Hilfe einer externen Kalibriergeraden (▲) unter Angabe der Kalibriergeradengleichung und des Bestimmtheitsmaßes ( $R^2$ ).

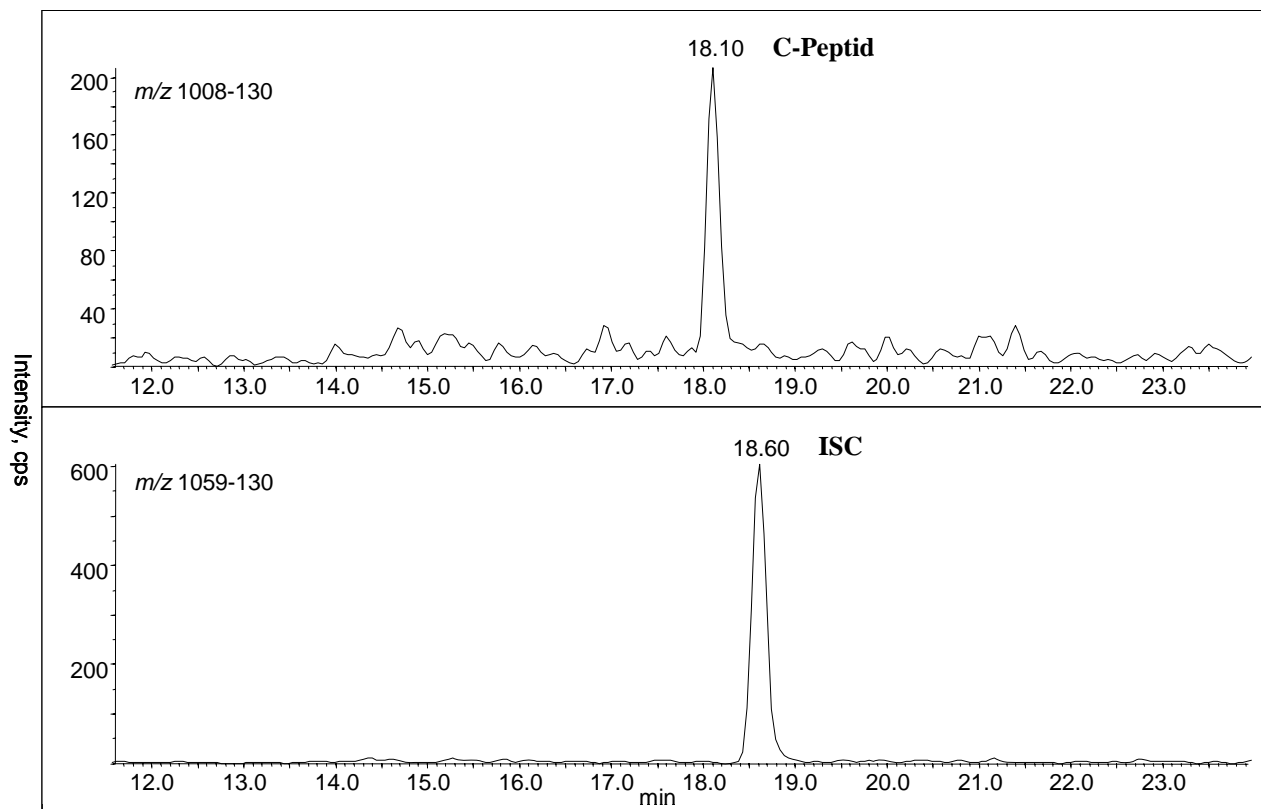
#### 4.12.1.3 Nachweisgrenze (LOD)

Die Nachweisgrenze wird über ein S/N-Verhältnis von mindestens 3 im MRM-Chromatogramm bei  $m/z = 1008/130$  zur entsprechenden Retentionszeit abgeschätzt und beträgt etwa 3 ng/mL. Die in der Literatur beschriebenen und auch experimentell bestätigten

Konzentrationen im unteren endogenen Niveau liegen bei etwa 20 ng/mL [36, 89, 90]. Damit kann die Nachweisgrenze der Methode als ausreichend angesehen werden.

#### 4.12.1.4 Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die Bestimmungsgrenze ist die Grenze, bei der quantitative Aussagen möglich sind. Sie wird über ein  $S/N > 9$  im MRM-Chromatogramm bei  $m/z = 1008/130$  zur entsprechenden Retentionszeit abgeschätzt und beträgt etwa 9 ng/mL. Es ist somit möglich, den Gehalt an C-Peptid im Urin von gesunden Menschen auch im unteren Bereich quantitativ zu bestimmen (siehe auch Abb. 68).



**Abb. 68:** ESI-MRM-Chromatogramme mit den Ionenübergängen 1008-130 für C-Peptid und 1059-130 für den ISC einer Blank-Urinprobe, die mit 10 ng/mL C-Peptid dotiert worden ist. Das Signal bei 18,1 min illustriert das  $S/N > 9$  am ermittelten LOQ.

#### 4.12.1.5 Präzision

Die Präzision der Methode beträgt 9.1 % und ist berechnet als relative Standardabweichung der Peakflächen einer Sechsfach-Bestimmung ( $n = 6$ ) einer Urinprobe mit 60 ng/mL. Die

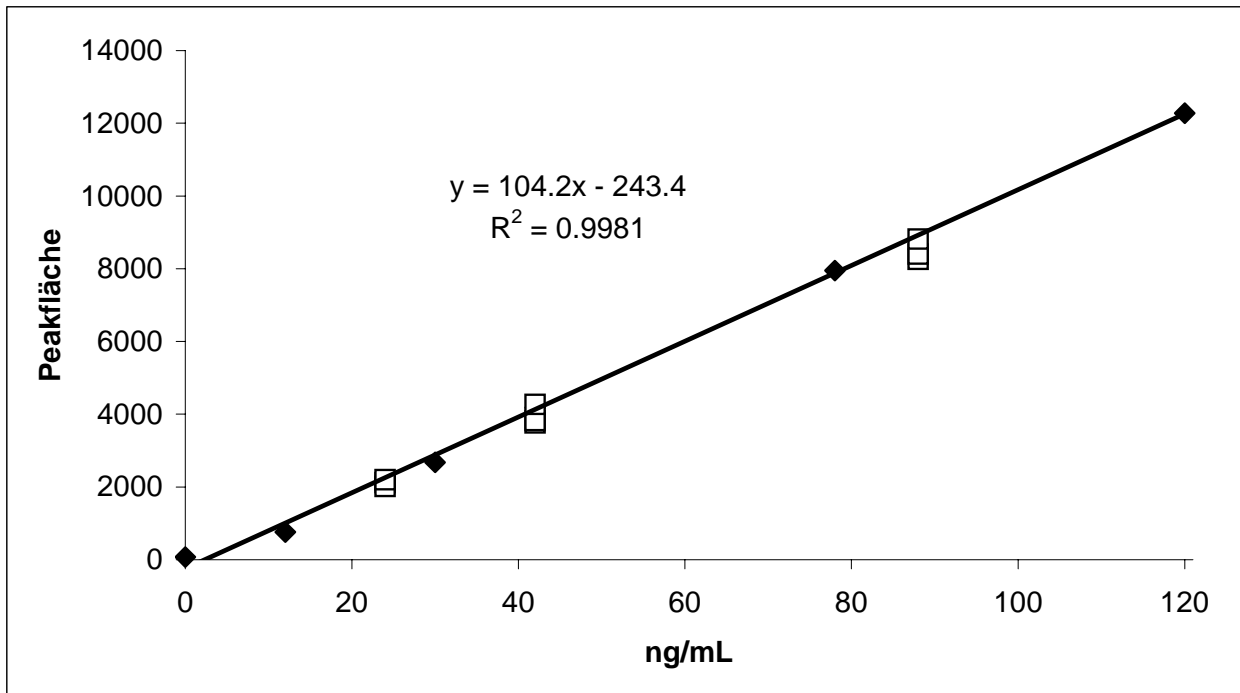
Reihe der dabei ermittelten Werte wurde mit Hilfe eines *Dixon*-Test auf Ausreißer überprüft und war ausreißerfrei.

#### **4.12.1.6 Vergleichspräzision**

Auch die einen Tag später bestimmte Vergleichspräzision, die durch wiederholte Aufarbeitung und Messung der Urinprobe (60 ng/mL), die zur Präzisionsbestimmung herangezogen worden ist ( $n = 6+6$ ), errechnet wurde, ergab eine relative Standardabweichung von 9,4 %. Die ausreißerfreien Meßreihen konnten vereinigt werden, weil sie statistisch um denselben Mittelwert schwanken (f-Test).

#### **4.12.1.7 Richtigkeit**

Da es sich um eine quantitative Bestimmung handelt, ist es sinnvoll die Abweichung des analytisch bestimmten Wertes zum theoretisch erwarteten Wert zu ermitteln (Soll/Ist-Wert). Dieser Soll-Ist-Wert-Vergleich auf drei Konzentrationsniveaus (24, 42 und 92 ng/mL) führte insgesamt zu einer Richtigkeit von 95 % bei einer relativen Standardabweichung von 4,1 %, wobei die Werte auf allen drei Niveaus ausreißerfrei um diesen Wert schwanken. Abb. 69 zeigt graphisch dargestellt die Bestimmung der Richtigkeit mit Hilfe einer externen Kalibriergeraden.



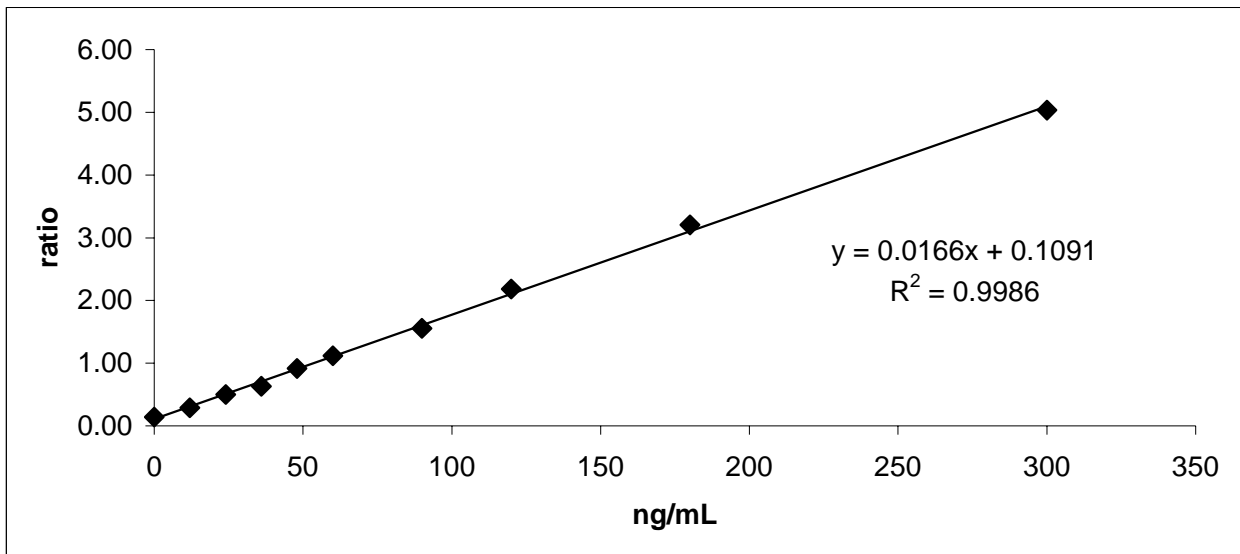
**Abb. 69:** Graphische Darstellung zur Bestimmung der Richtigkeit der Methode mit Hilfe von Urinproben, die mit 24, 42 und 96 ng/mL dotiert worden sind (□). Die Quantifizierung erfolgt mit einer externen Kalibriergeraden (♦) unter Angabe der Kalibriergeradengleichung und des Bestimmtheitsmaßes ( $R^2$ ).

#### 4.12.1.8 Wiederfindung

Der Verlust an C-Peptid während der Aufarbeitung wurde über die Wiederfindung bestimmt. Diese Wiederfindung beträgt 84 %, d.h. der Verlust ergibt sich mit 16 %. Diese und auch höhere Verluste sind gut tolerierbar, wenn die Probenaufarbeitung dafür sehr reine Extrakte ohne störende Matrixeinflüsse liefert.

#### 4.12.1.9 Linearität

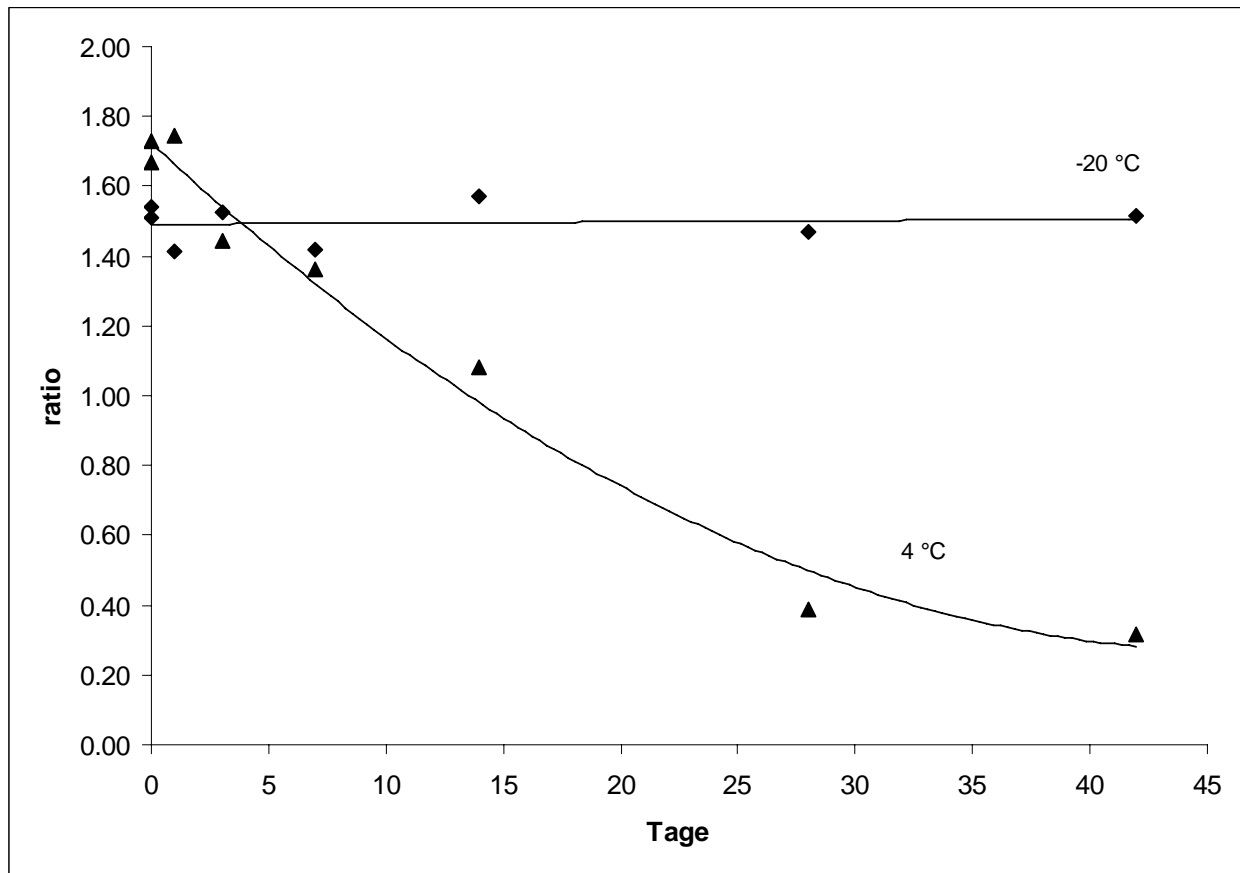
Die Linearität im Arbeitsbereich, berechnet zwischen 12 und 300 ng/mL, wird, korrigiert über das Verhältnis zur Peakfläche des ISTD, durch die Geradengleichung  $y=0,0166x+0,1091$  beschrieben und besitzt ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9986$ . Der Linearitätstest nach *Mandel* erlaubt ein Modell der linearen Annäherung (Abb. 70).



**Abb. 70:** Graphische Darstellung zur Bestimmung der Linearität der Methode mit Hilfe von dotierten Urinproben im Bereich von 12 bis 300 ng/mL unter Angabe der Kalibriergeradengleichung und des Bestimmtheitsmaßes ( $R^2$ ) korrigiert über die Peakfläche des IS.

#### 4.12.1.10 Stabilität

Bezüglich der Stabilität des Analyten im Urin zeigte sich während der Validierung, dass es sich hier um einen problematischen Parameter der Methode handelt, denn die Stabilität bei Temperaturen von 2-8°C ist nicht gegeben. Dies gilt sowohl für die Referenzsubstanz in Lösung als auch für den Analyten in Urin. Schon nach 5 Tagen Lagerung bei 2-8°C kommt es zu einer deutlichen Abnahme des C-Peptidgehaltes in den dotierten Urinproben. Lediglich bei -20°C ist eine Stabilität über 40 Tage gesichert (Abb. 71).



**Abb. 71:** Graphische Darstellung der Stabilität von C-Peptid in Urin bei 4° (▲) und -20 °C (◆) über 6 Wochen bestimmt aus dem Peakflächenverhältnis (ratio) von C-Peptid zum IS.

#### 4.12.2 Untersuchung von Urinproben zu Dopingkontrollzwecken

Die Kenntnis über die Stabilität des C-Peptids in Urin macht deutlich, dass die Bestimmung des Verhältnisses von Insulin zu C-Peptid nur in richtig gelagerten Proben sinnvoll ist. Da eine Lagerung von Dopingproben routinemäßig jedoch nicht bei -18 °C erfolgt, kann dieses Verhältnis daher in der Regel nicht zur Bestimmung einer möglichen Applikation von HI herangezogen werden, weil es durch die unterschiedliche Lagerstabilität der Analyten bei 4 °C kein geeigneter Indikator sein kann. Valide Ergebnisse bezüglich des C-Peptid-Gehaltes in Urin können also nur erzielt werden, wenn der Urin unmittelbar nach Probennahme bei geeigneten Temperaturen gelagert wird.



## 4.13 Validierungsergebnisse

Tab. 6: Zusammenfassung der Validierungsergebnisse

Analyt	Mol. Gewicht [Da]	Matrix	LOD (S/N) [fmol/mL]	Wiederfindung [%]	Präzision [%]	Linearität		Stabilität 4 °C	LOQ* [fmol/mL]	Richtigkeit* [%]	Vergleichspräzision* [%]
						Anpassung	R				
<b>Qualitative Bestimmung</b>											
<b>Humaninsulin</b>	5807	Plasma	< 100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Humalog</b>	5807	Plasma	< 100	94	13	linear	0.993	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Novolog</b>	5826	Plasma	< 100	98	15	linear	0.992	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Lantus</b>	6063	Plasma	< 100	91	14	linear	0.990	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Humaninsulin</b>	5807	Urin	< 10	n.a.	15	linear	0.991	8 Wochen	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Humalog</b>	5807	Urin	< 10	78	9	linear	0.992	8 Wochen	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Novolog</b>	5826	Urin	< 10	72	11	linear	0.980	8 Wochen	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Apidra</b>	5823	Urin	< 10	80	16	linear	0.992	8 Wochen	n.a.	n.a.	n.a.
<b>DesB30 HI</b>	5707	Urin	< 10	109	12	linear	0.980	8 Wochen	n.a.	n.a.	n.a.
<b>DesB30-32 LAN</b>	5650	Urin	< 10	97	14	linear	0.995	8 Wochen	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Quantitative Bestimmung</b>											
<b>C-Peptid</b>	3020	Urin	~ 1000	84	9	linear	0.999	< 5 Tage	~ 3000	95	9

\* nur für quantitative Bestimmung

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel und Zweck dieser Arbeit war es, eine analytische Methode zum Nachweis von Humaninsulin und den synthetischen Analogen Humalog, Novolog, Apidra, Lantus bzw. Detemir zu Dopingkontrollzwecken mit Hilfe der Massenspektrometrie zu entwickeln. Dies wurde durch eine Kombination von Festphasenextraktion, IAC und Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht und erlaubt die Bestimmung der Analyten sowohl in Plasmaproben als auch in Urin. Dabei können im Plasma die intakten, d.h. nicht durch metabolische Prozesse abgebauten Insuline, eindeutig durch charakteristische Produktionen identifiziert und auf einem physiologisch relevanten Level nachgewiesen werden.

Weiterhin gelang es erstmalig, eine Methode zur massenspektrometrischen Bestimmung von endogenem Insulin in Urin zu etablieren und auch auf die Insulinanalogen zu übertragen. Es stellte sich dabei heraus, dass neben Humaninsulin nur die schnell wirkenden Insulinanalogen Humalog, Novolog und Apidra intakt im Urin nachgewiesen werden können. Die langwirkenden synthetischen Insuline Lantus und Detemir werden nach Applikation lediglich als Abbauprodukte über die Niere ausgeschieden. So konnten in Urinproben von Diabetikern nach entsprechender Insulintherapie, die bis dato teilweise unbekannten Abbauprodukte DesB30, DesB25 und DesB24 des jeweiligen Insulins (bzw. zusätzlich DesB31-32 für Lantus) durch Produktionenexperimente identifiziert werden. Die Identität der Hauptabbauprodukte DesB30 HI und DesB30-32 LAN wurde durch vergleichende Analyse der Referenzsubstanzen noch zusätzlich bestätigt. Der qualitative Nachweis der Analyten Humalog, Novolog, Apidra und aller Abbauprodukte von Lantus stellt dabei einen direkten Beweis für die entsprechende Applikation dar, denn es konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen massenspektrometrisch eindeutig von Humaninsulin und dessen Abbauprodukten unterscheidbar sind [137].

Der Missbrauch von rekombinantem Humaninsulin und von Detemir, welches nur als Metabolit ausgeschieden wird, ist leider nicht auf diesem direkten Wege nachweisbar, da die Herkunft des Humaninsulins und der metabolischen Abbauprodukte nicht von dem endogen produzierten Hormon unterschieden werden können. Um auch einen Ansatz zum Nachweis eines solchen Missbrauchs zu erlangen, ist weiterhin eine Methode zur quantitativen Bestimmung von C-Peptid in Urin entwickelt worden. C-Peptid wird zusammen mit Insulin über einen gemeinsamen Vorläufer (Proinsulin) in equimolaren Mengen in der Bauchspeicheldrüse produziert und das Verhältnis von Insulin zu C-Peptid sollte bei der

Befundung einer exogenen Insulinapplikation genutzt werden. Leider wird dies durch das extrem unterschiedliche metabolische Verhalten der Analyten erschwert, denn Insulin wird nur zu etwa 0,1 % intakt ausgeschieden und C-Peptid wird nahezu ohne Abbau aus dem Blutkreislauf eliminiert [36, 89, 90, 138]. Zusätzlich behindert die unterschiedliche Stabilität der Analyten in der Matrix die aussagekräftige Deutung der Insulin- und C-Peptid-Konzentrationen.

Ungeachtet dieser Schwierigkeiten können weiterführende Experimente zur Bestimmung dieses Verhältnisses im Plasma mittels eines kombinierten Insulin- und C-Peptid-Assays (z. B. ELISA) durchaus die exogene Zufuhr von Insulin anzeigen, wie dies in verschiedenen forensischen Verfahren bereits Anwendung gefunden hat [93, 94, 139, 140].

Ein anderer Ansatz zur Lösung dieses Problems ist in Teilen in dieser Arbeit schon angedeutet und befasst sich mit dem möglicherweise geänderten Abbauverhalten von endogen produziertem zu subkutan injiziertem Insulin. Eine detaillierte Aufklärung solcher Metabolitenprofile mit einer statistisch aussagekräftigen Probenzahl stellt einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Erkennung eines Missbrauches von Detemir und auch rekombinantem Humaninsulin dar.

Alle entwickelten Methoden sind unter Berücksichtigung von qualitativen bzw. quantitativen (für C-Peptid) Bestimmungskriterien validiert worden, wobei jeweils auf die Parameter Spezifität, Linearität, Präzision, Nachweisgrenze (LOD), Stabilität und Wiederfindung getestet worden ist. Bei der quantitativen C-Peptidbestimmung wurden zusätzlich die Parameter Richtigkeit, Bestimmungsgrenze (LOQ) und Vergleichspräzision überprüft. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tab. 6 gezeigt.

Darüberhinaus können die Ergebnisse auch für diesbezügliche forensische oder pharmakologische Studien genutzt werden, denn eine eindeutige Unterscheidung von endogenem bzw. exogenem Insulin und die Kenntnis über bisher unbekannte Metaboliten, die die noch vollständige biologische Aktivität besitzen, liefern auch abseits der Dopinganalytik wichtige Hinweise für die Aufklärung von pharmakokinetischen Vorgängen und das Verständnis metabolischer Abbauprozesse von Insulin.

## 6. Anhang

### 6.1 Statistische Kenngrößen

#### Standardabweichung:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum x^2 - N \cdot \bar{x}^2}{N - 1}}$$

$s_x$  = Standardabweichung

$N$  = Stichprobenumfang

$\bar{x}$  = Mittelwert der Datenreihe

#### Relative Standardabweichung:

$$V = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \%$$

$V$  = relative Standardabweichung

#### Ausreißertest nach *Dixon*:

Ein Ausreißertest nach *Dixon* wird von der DIN-Norm 53804 für Datenreihen mit einer Stichprobenanzahl von  $N < 30$  empfohlen. Die zu prüfenden Meßwerte werden nach ihrer Größe geordnet und die errechneten Prüfwerte  $P_o$  und  $P_u$  mit Tabellenwerten verglichen [128].

$$P_u = \frac{x_2 - x_1}{x_{(N-1)} - x_1}$$

$$P_o = \frac{x_N - x_{(N-1)}}{x_N - x_2}$$

$P_u$  = Prüfwert nach unten;  $P_o$  = Prüfwert nach oben

$x_1$  = kleinster Wert;  $x_2$  = zweitkleinster Wert

$x_N$  = größter Wert;  $x_{N-1}$  = zweitgrößter Wert

Wenn die betreffende Signifikanzschranke (P=95%) für beide Prüfwerte nicht überschritten wird, gilt die Datenreihe als ausreißerfrei.

### **Linearitätstest nach Mandel:**

Für den Anpassungstest nach *Mandel* werden die Streuung der Signalwerte ( $y$ ) um die Ausgleichsgerade (Reststandardabweichungen) einer linearen und quadratischen Regression miteinander verglichen und hinsichtlich einer signifikanten Varianzeninhomogenität untersucht. Dazu werden zunächst die Reststandardabweichungen errechnet:

$$s_{yl} = \sqrt{\frac{\sum [y_i - (m \cdot x_i + b)]^2}{N - 2}}$$

$$s_{yq} = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - b \cdot \sum y_i - m \cdot \sum (x_i \cdot y_i) - n \cdot \sum (x_i^2 \cdot y_i)}{N - 3}}$$

$s_{yl}$  = Reststandardabweichung der linearen Regression

$s_{yq}$  = Reststandardabweichung der quadratischen Regression

$y_i$  = Signalwert,  $x_i$  = Konzentrationswert

$m, n$  = Steigung der Ausgleichsgeraden,  $b$  = Ordinatenabschnitt

$N$  = Stichprobenumfang

Aus den Reststandardabweichungen wird die Varianzdifferenz gebildet:

$$\Delta s^2 = [(N_L - 2) \cdot s_{yl}^2] - [(N_Q - 3) \cdot s_{yq}^2]$$

$\Delta s^2$  = Varianzdifferenz

$N_L, N_Q$  = Stichprobenumfang (linear, quadratisch)

Daraus ergibt sich die Prüfgröße mit:

$$PG = \frac{\Delta s^2}{s_{yq}^2}$$

PG = Prüfgröße

Diese Prüfgröße PG mit dem F-Wert aus einer F-Tabelle verglichen [128]. Die dazugehörigen Freiheitsgrade ergeben sich mit  $f_1 = 1$  und  $f_2 = N-3$ . Wenn die so errechnete Prüfgröße kleiner als der entsprechende Tabellenwert ist, so ist eine lineare Anpassung nach *Mandel* erlaubt.

## 6.2 Chemikalien und Referenzsubstanzen

Humaninsulin	# 40D708, Aventis Pharma (Frankfurt, Deutschland)
Humalog	# 5MY51N, Eli Lilly and company (Indianapolis, USA)
Novolog	# MW50490, Novo Nordisk (Bagsveard, Dänemark)
Apidra	# 41D020, Aventis Pharma (Frankfurt, Deutschland)
Lantus	# A120, Aventis Pharma (Frankfurt, Deutschland)
Levemir	# RW50053, Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dänemark)
DesB30 Humaninsulin	Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dänemark)
Rinderinsulin	# 462644-282, Fluka (Buchs, Schweiz)
C-Peptid	# 045K1156, Sigma (St Louis, USA)

---

C-Peptid (Hund)	# H2912, Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Acetonitril	HPLC Grade, Merck (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	p.a., Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trifluoressigsäure	99+ %, Sigma (St Louis, USA)
TCEP-HCl	Sigma (St Louis, USA)
Natrium-tri-phosphat	p.a., Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	p.a., Merck (Darmstadt, Deutschland)
Salzsäure	rauchend, Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumazid	p.a., Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wasser	reinst, Milli-Q (Schwalbach, Deutschland)
Endoproteinase (Lys-C)	Sigma (St Louis, USA)

## 7. Literaturverzeichnis

1. Rosenfeld L Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem* **2002**;48:2270-88.
2. Sonksen PH. Insulin, growth hormone and sport. *J Endocrinol* **2001**;170:13-25.
3. Rich JD, Dickinson BP, Merriman NA, Thule PM. Insulin use by bodybuilders. *Jama* **1998**;279:1613.
4. Reverter JL, Tural C, Rosell A, Dominguez M, Sanmarti A. Self-induced insulin hypoglycemia in a bodybuilder. *Arch Intern Med* **1994**;154:225-6.
5. Elkin SL, Brady S, Williams IP. Bodybuilders find it easy to obtain insulin to help them in training. *Bmj* **1997**;314:1280.
6. Sturmi JE, Diorio DJ. Anabolic agents. *Clin Sports Med* **1998**;17:261-82.
7. Dencausse Y, Zimmer J, Kuteifan K. [Dangers of body building]. *Presse Med* **1994**;23:1136-7.
8. Evans PJ, Lynch RM. Insulin as a drug of abuse in body building. *Br J Sports Med* **2003**;37:356-7.
9. Chevenne D, Trivin F, Porquet D. Insulin assays and reference values. *Diabetes Metab* **1999**;25:459-76.
10. Owen WE, Roberts WL. Cross-reactivity of three recombinant insulin analogs with five commercial insulin immunoassays. *Clin Chem* **2004**;50:257-9.
11. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* **1998**;19:608-24.
12. Bliss M. Banting's, Best's, and Collip's accounts of the discovery of insulin. *Bull Hist Med* **1982**;56:554-68.
13. Goldfine ID, Youngren JF. Contributions of the American Journal of Physiology to the discovery of insulin. *Am J Physiol* **1998**;274:E207-9.
14. Ionescu-Tirgoviste C. Insulin, the molecule of the century. *Arch Physiol Biochem* **1996**;104:807-13.
15. Leickert KH. [Insulin precursors--a historical synopsis. First diabetes treatment trials using pancreas extracts]. *Arzneimittelforschung* **1975**;25:439-42.
16. Schafer E. The Endocrine Organs - An Introduction of the Study of Internal Secretions. London: Longmans, Green and Co, 1916.
17. Meyer d. *Arch. di fisiol.* **1909**;vii.



18. Shaffer P, Hartmann A. The iodometric determination of copper and its use in sugar analysis. II. methods for the determination of reducing sugars in blood, urine, milk and other solutions. *J Biol Chem* **1921**;45:365-390.
19. Sanger F, Thompson EO. The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J* **1953**;53:353-66.
20. Brown H, Sanger F, Kitai R. The structure of pig and sheep insulins. *Biochem J* **1955**;60:556-65.
21. Stretton AO. The first sequence. Fred Sanger and insulin. *Genetics* **2002**;162:527-32.
22. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. 1960. *Obes Res* **1996**;4:583-600.
23. Harding MM, Hodgkin DC, Kennedy AF, O'Connor A, Weitzmann PD. The crystal structure of insulin. II. An investigation of rhombohedral zinc insulin crystals and a report of other crystalline forms. *J Mol Biol* **1966**;16:212-26.
24. Zahn H. Structure and synthesis of insulin. *Med Klin* **1966**;61:876.
25. Morihara K, Oka T, Tsuzuki H. Semi-synthesis of human insulin by trypsin-catalysed replacement of Ala-B30 by Thr in porcine insulin. *Nature* **1979**;280:412-3.
26. Villa-Komaroff L, Broome S, Naber SP, Efstratiadis A, Lomedico P, Tizard R, et al. The synthesis of insulin in bacteria: a model for the production of medically useful proteins in prokaryotic cells. *Birth Defects Orig Artic Ser* **1980**;16:53-68.
27. Miller WL, Baxter JD. Recombinant DNA--a new source of insulin. *Diabetologia* **1980**;18:431-6.
28. Gilbert W, Villa-Komaroff L. Useful proteins from recombinant bacteria. *Sci Am* **1980**;242:74-94.
29. Howey DC, Bowsher RR, Brunelle RL, Woodworth JR. [Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin. A rapidly absorbed analogue of human insulin. *Diabetes* **1994**;43:396-402.
30. Heise T, Heinemann L. Rapid and long-acting analogues as an approach to improve insulin therapy: an evidence-based medicine assessment. *Curr Pharm Des* **2001**;7:1303-25.
31. Nicol DS, Smith LF. Amino-acid sequence of human insulin. *Nature* **1960**;187:483-5.
32. Yang SZH, Y. D.; Jie, X. F.; Feng Y. M.; Niu J. Y. Relationship between insulin A chain regions and insulin biological activities. *World J Gastroentero* **2000**;6(3):371-373.
33. Loeffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. 5 ed. Berlin, 1997.

34. Sherwin RS, Kramer KJ, Tobin JD, Insel PA, Liljenquist JE, Berman M, et al. A model of the kinetics of insulin in man. *J Clin Invest* **1974**;53:1481-92.
35. Ammon HPT. Wirkungen des Insulins. *Pharmazie in unserer Zeit* **2001**;30:21-26.
36. Rodriguez-Cabaleiro D, Stockl D, Thienpont LM. Improvement of sample pretreatment prior to analysis of C-peptide in serum by isotope-dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2005**;19:3600-2.
37. Rebsomen L, Pitel S, Boubred F, Buffat C, Feuerstein JM, Raccach D, et al. C-peptide replacement improves weight gain and renal function in diabetic rats. *Diabetes Metab* **2006**;32:223-8.
38. Wahren J, Ekberg K, Johansson J, Henriksson M, Pramanik A, Johansson BL, et al. Role of C-peptide in human physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2000**;278:E759-68.
39. Forst T, Kunt T, Pfutzner A, Beyer J, Wahren J. New aspects on biological activity of C-peptide in IDDM patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **1998**;106:270-6.
40. Rosak C. [Insulin analogs: structure, properties and therapeutic indications. Part 1: rapid-acting insulin analogs]. *Internist (Berl)* **2001**;42:1523-35.
41. Zündorf I, Dingermann T. Vom Rinder-, Schweine-, Pferde-Insulin zum Humaninsulin: Die biotechnische und gentechnische Insulin-Herstellung. *Pharmazie in unserer Zeit* **2001**;30:27-32.
42. Howey DC, Bowsher RR, Brunelle RL, Rowe HM, Santa PF, Downing-Shelton J, et al. [Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin: effect of injection time on postprandial glycemia. *Clin Pharmacol Ther* **1995**;58:459-69.
43. Betz JL. Fast-acting human insulin analogs: a promising innovation in diabetes care. *Diabetes Educ* **1995**;21:195, 197-8, 200.
44. Burge MR, Waters DL, Holcombe JH, Schade DS. Prolonged efficacy of short acting insulin Lispro in combination with human ultralente in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **1997**;82:920-4.
45. Garg SK, Ellis SL, Ulrich H. Insulin glulisine: a new rapid-acting insulin analogue for the treatment of diabetes. *Expert Opin Pharmacother* **2005**;6:643-51.
46. Dailey G, Rosenstock J, Moses RG, Ways K. Insulin glulisine provides improved glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2004**;27:2363-8.
47. Rosenstock J, Park G, Zimmerman J. Basal insulin glargine (HOE 901) versus NPH insulin in patients with type 1 diabetes on multiple daily insulin regimens. U.S. Insulin

- Glargine (HOE 901) Type 1 Diabetes Investigator Group. *Diabetes Care* **2000**;23:1137-42.
48. Rosak C. [Insulin analogs: structure, properties and therapeutic indication. Part 2. Long-acting insulin analogs]. *Internist (Berl)* **2001**;42:1692-9.
49. Kudva YC, Basu A, Jenkins GD, Pons GM, Quandt LL, Gebel JA, et al. Randomized controlled clinical trial of glargine versus ultralente insulin in the treatment of type 1 diabetes. *Diabetes Care* **2005**;28:10-4.
50. Owens DR, Coates PA, Luzio SD, Tinbergen JP, Kurzhals R. Pharmacokinetics of 125I-labeled insulin glargine (HOE 901) in healthy men: comparison with NPH insulin and the influence of different subcutaneous injection sites. *Diabetes Care* **2000**;23:813-9.
51. Kuerzel GU, Shukla U, Scholtz HE, Pretorius SG, Wessels DH, Venter C, et al. Biotransformation of insulin glargine after subcutaneous injection in healthy subjects. *Curr Med Res Opin* **2003**;19:34-40.
52. Danne T, Lupke K, Walte K, Von Schuetz W, Gall MA. Insulin detemir is characterized by a consistent pharmacokinetic profile across age-groups in children, adolescents, and adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **2003**;26:3087-92.
53. Lehnert H, Klose S, Kerner W. [Short-acting and depot insulin analogs. Advantages and disadvantages in comparison with current insulin types]. *Internist (Berl)* **2001**;42 Suppl 1:S29-42.
54. Havelund S, Plum A, Ribel U, Jonassen I, Volund A, Markussen J, et al. The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin. *Pharm Res* **2004**;21:1498-504.
55. Heise T, Nosek L, Ronn BB, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C, et al. Lower within-subject variability of insulin detemir in comparison to NPH insulin and insulin glargine in people with type 1 diabetes. *Diabetes* **2004**;53:1614-20.
56. Hermansen K, Fontaine P, Kukulja KK, Peterkova V, Leth G, Gall MA. Insulin analogues (insulin detemir and insulin aspart) versus traditional human insulins (NPH insulin and regular human insulin) in basal-bolus therapy for patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* **2004**;47:622-9.
57. Hermansen K, Madsbad S, Perrild H, Kristensen A, Axelsen M. Comparison of the soluble basal insulin analog insulin detemir with NPH insulin: a randomized open crossover trial in type 1 diabetic subjects on basal-bolus therapy. *Diabetes Care* **2001**;24:296-301.

58. Dawson RT, Harrison MW. Use of insulin as an anabolic agent. *Br J Sports Med* **1997**;31:259.
59. Petrou MJ. Re: Kuipers H, Ruijsch van Dugteren G. Letter to the editors - the prohibited list and cheating in sport. *Int J Sports Med* 2006; 27: 80 - 82. *Int J Sports Med* **2006**;27:83-4.
60. Kuipers H, Ruijsch van Dugteren G. The prohibited list and cheating in sport. *Int J Sports Med* **2006**;27:80-2.
61. Laurent DH, R. S.; Dresner, A.; Price, T. B.; Vogel, S. M.; Falk Petersen, K.; Shulmann, G. I. Mechanism of muscle glycogen autoregulation in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **1987**;278:E663-E668.
62. Ebeling PB, R.; Koranyi, L.; Tuominen, J. A.; Groop, L. C.; Hendriksson, J.; Mueckler, M. Sovijarvi, A.; Koivisto, V. A. J. Mechanism of Enhanced Insulin Sensitivity in Athletes. *Clin. Invest.* **1993**;92:1623-1631.
63. Rodnik KJH, W. L.; Swislocki, A. L. M.; Foley, J. E.; Reaven, G. M. Improved insulin action in muscle, liver, and adipose tissue in physically trained human subjects. *Am. J. Physiol.* 253 (*Endocrinol Metab* 16) **1987**:E489-E495.
64. Takala TON, P.; Knuuti, J.; Luotolathu, M.; Yki-Jarvinen, H. Insulin action on heart and skeletal muscle glucose uptake in weight lifters and endurance athletes. *Am. J. Physiol.* 276 (*Endocrinol Metab* 39) **1999**:E706-711.
65. Campioni M, Toffolo G, Shuster LT, Service FJ, Rizza RA, Cobelli C. Incretin effect potentiates beta-cell responsivity to glucose as well as to its rate of change: OGTT and matched intravenous study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2007**;292:E54-60.
66. Hawley JA, Palmer GS, Noakes TD. Effects of 3 days of carbohydrate supplementation on muscle glycogen content and utilisation during a 1-h cycling performance. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **1997**;75:407-12.
67. Carter JM, Jeukendrup AE, Mann CH, Jones DA. The effect of glucose infusion on glucose kinetics during a 1-h time trial. *Med Sci Sports Exerc* **2004**;36:1543-50.
68. Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK. Immobilized Affinity Ligand Techniques. 1 ed. London: Academic Press, 1992.
69. Hage DS. Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clin Chem* **1999**;45:593-615.
70. Weller MG. Immunochromatographic techniques--a critical review. *Fresenius J Anal Chem* **2000**;366:635-45.

71. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* **1960**;39:1157-75.
72. Yalow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* **1959**;184 (Suppl 21):1648-9.
73. Sobey WJ, Beer SF, Carrington CA, Clark PM, Frank BH, Gray IP, et al. Sensitive and specific two-site immunoradiometric assays for human insulin, proinsulin, 65-66 split and 32-33 split proinsulins. *Biochem J* **1989**;260:535-41.
74. Clark PM, Hales CN. How to measure plasma insulin. *Diabetes Metab Rev* **1994**;10:79-90.
75. Bowsher RR, Lynch RA, Brown-Augsburger P, Santa PF, Legan WE, Woodworth JR, et al. Sensitive RIA for the specific determination of insulin lispro. *Clin Chem* **1999**;45:104-10.
76. Andersen L, Jorgensen PN, Jensen LB, Walsh D. A new insulin immunoassay specific for the rapid-acting insulin analog, insulin aspart, suitable for bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Clin Biochem* **2000**;33:627-33.
77. Moriyama M, Hayashi N, Ohyabu C, Mukai M, Kawano S, Kumagai S. Performance evaluation and cross-reactivity from insulin analogs with the ARCHITECT insulin assay. *Clin Chem* **2006**;52:1423-6.
78. Eriksson JH, Mol R, Somsen GW, Hinrichs WL, Frijlink HW, de Jong GJ. Feasibility of nonvolatile buffers in capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of proteins. *Electrophoresis* **2004**;25:43-9.
79. Moslemi P, Najafabadi AR, Tajerzadeh H. A rapid and sensitive method for simultaneous determination of insulin and A21-desamido insulin by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* **2003**;33:45-51.
80. Visser NF, Lingeman H, Irth H. On-line SPE-RP-LC for the determination of insulin derivatives in biological matrices. *J Pharm Biomed Anal* **2003**;32:295-309.
81. Hoyer GL, Nolan PE, Jr., LeDoux JH, Moore LA. Selective stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay for recombinant human regular insulin. *J Chromatogr A* **1995**;699:383-8.
82. Shen H, Aspinwall CA, Kennedy RT. Dual microcolumn immunoassay applied to determination of insulin secretion from single islets of Langerhans and insulin in serum. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **1997**;689:295-303.
83. Khaksa G, Nalini K, Bhat M, Udupa N. High-performance liquid chromatographic determination of insulin in rat and human plasma. *Anal Biochem* **1998**;260:92-5.

84. Kippen AD, Cerini F, Vadas L, Stocklin R, Vu L, Offord RE, et al. Development of an isotope dilution assay for precise determination of insulin, C-peptide, and proinsulin levels in non-diabetic and type II diabetic individuals with comparison to immunoassay. *J Biol Chem* **1997**;272:12513-22.
85. Darby SM, Miller ML, Allen RO, LeBeau M. A mass spectrometric method for quantitation of intact insulin in blood samples. *J Anal Toxicol* **2001**;25:8-14.
86. Stocklin R, Vu L, Vadas L, Cerini F, Kippen AD, Offord RE, et al. A stable isotope dilution assay for the in vivo determination of insulin levels in humans by mass spectrometry. *Diabetes* **1997**;46:44-50.
87. Melani F, Rubenstein AH, Oyer PE, Steiner DF. Identification of proinsulin and C-peptide in human serum by a specific immunoassay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1970**;67:148-55.
88. Fierens C, Stockl D, Baetens D, De Leenheer AP, Thienpont LM. Application of a C-peptide electrospray ionization-isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement procedure for the evaluation of five C-peptide immunoassays for urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2003**;792:249-59.
89. Rogatsky E, Tomuta V, Cruikshank G, Vele L, Jayatillake H, Stein D. Direct sensitive quantitative LC/MS analysis of C-peptide from human urine by two dimensional reverse phase/reverse phase high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci* **2006**;29:529-37.
90. Rogatsky E, Balent B, Goswami G, Tomuta V, Jayatillake H, Cruikshank G, et al. Sensitive quantitative analysis of C-peptide in human plasma by 2-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry isotope-dilution assay. *Clin Chem* **2006**;52:872-9.
91. Stockl D, Cabaleiro DR, Thienpont LM. Collision-induced dissociation of the [M-2H]<sup>2+</sup>- ion of C-peptide. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**;18:3140-1.
92. Cabaleiro DR, Stockl D, Kaufman JM, Fiers T, Thienpont LM. Feasibility of standardization of serum C-peptide immunoassays with isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* **2006**;52:1193-6.
93. Lebowitz MR, Blumenthal SA. The molar ratio of insulin to C-peptide. An aid to the diagnosis of hypoglycemia due to surreptitious (or inadvertent) insulin administration. *Arch Intern Med* **1993**;153:650-5.

94. Iwase H, Kobayashi M, Nakajima M, Takatori T. The ratio of insulin to C-peptide can be used to make a forensic diagnosis of exogenous insulin overdose. *Forensic Sci Int* **2001**;115:123-7.
95. Haibach H, Dix JD, Shah JH. Homicide by insulin administration. *J Forensic Sci* **1987**;32:208-16.
96. Koskinen PJ, Nuutinen HM, Laaksonen H, Klossner JA, Irjala KM, Kalimo H, et al. Importance of storing emergency serum samples for uncovering murder with insulin. *Forensic Sci Int* **1999**;105:61-6.
97. Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed Environ Mass Spectrom* **1988**;16:99-111.
98. Budzikiewicz H. Massenspektrometrie. Weinheim: Wiley-VCH, 1998.
99. Fierens C, Stockl D, Thienpont LM, De Leenheer AP. Strategies for determination of insulin with tandem electrospray mass spectrometry: implications for other analyte proteins? *Rapid Commun Mass Spectrom* **2001**;15:1433-41.
100. Tamvakopoulos C. Mass spectrometry for the quantification of bioactive peptides in biological fluids. *Mass Spectrom Rev* **2007**;26:389-402.
101. Guerrero IC, Kleiner O. Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci Rep* **2005**;25:71-93.
102. Bilati U, Pasquarello C, Corthals GL, Hochstrasser DF, Allemann E, Doelker E. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for quantitation and molecular stability assessment of insulin entrapped within PLGA nanoparticles. *J Pharm Sci* **2005**;94:688-94.
103. Fenn JB. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**;42:3871-94.
104. Olsen JV, Mann M. Improved peptide identification in proteomics by two consecutive stages of mass spectrometric fragmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**;101:13417-22.
105. Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **1984**;11:601.
106. Savoy LA, Jones RM, Pochon S, Davies JG, Muir AV, Offord RE, et al. Identification by fast atom bombardment mass spectrometry of insulin fragments produced by insulin proteinase. *Biochem J* **1988**;249:215-22.

107. Stentz FB, Kitabchi AE, Schilling JW, Schronk LR, Seyer JM. Identification of insulin intermediates and sites of cleavage of native insulin by insulin protease from human fibroblasts. *J Biol Chem* **1989**;264:20275-82.
108. Fierens C, Thienpont LM, Stockl D, Willekens E, De Leenheer AP. Quantitative analysis of urinary C-peptide by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a stable isotopically labelled internal standard. *J Chromatogr A* **2000**;896:275-8.
109. Hopfgartner G, Varesio E, Tschappat V, Grivet C, Bourgogne E, Leuthold LA. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *J Mass Spectrom* **2004**;39:845-55.
110. Hager JW. A new linear ion trap massspectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2002**;16:512-526.
111. Douglas DJ, Frank AJ, Mao D. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **2005**;24:1-29.
112. Hager JW. Recent trends in mass spectrometer development. *Anal Bioanal Chem* **2004**;378:845-50.
113. Katz AI, Rubenstein AH. Metabolism of proinsulin, insulin, and C-peptide in the rat. *J Clin Invest* **1973**;52:1113-21.
114. Duckworth WC, Hamel FG, Liepnieks J, Peavy D, Frank B, Rabkin R. Insulin degradation products from perfused rat kidney. *Am J Physiol* **1989**;256:E208-14.
115. Benzi L, Cecchetti P, Ciccarone AM, Di Cianni G, Iozzi LC, Caricato F, et al. Insulin degradation in vivo: a high-performance liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr* **1990**;534:37-46.
116. Authier F, Danielsen GM, Kouach M, Briand G, Chauvet G. Identification of insulin domains important for binding to and degradation by endosomal acidic insulinase. *Endocrinology* **2001**;142:276-89.
117. Fawcett J, Rabkin R. Sequential processing of insulin by cultured kidney cells. *Endocrinology* **1995**;136:39-45.
118. Seabright PJ, Smith GD. The characterization of endosomal insulin degradation intermediates and their sequence of production. *Biochem J* **1996**;320 ( Pt 3):947-56.
119. Guest PC, Pipeleers D, Rossier J, Rhodes CJ, Hutton JC. Co-secretion of carboxypeptidase H and insulin from isolated rat islets of Langerhans. *Biochem J* **1989**;264:503-8.



120. Davidson HW, Hutton JC. The insulin-secretory-granule carboxypeptidase H. Purification and demonstration of involvement in proinsulin processing. *Biochem J* **1987**;245:575-82.
121. Deberg M, Houssa P, Frank BH, Sodoyez-Goffaux F, Sodoyez JC. Highly specific radioimmunoassay for human insulin based on immune exclusion of all insulin precursors. *Clin Chem* **1998**;44:1504-13.
122. Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosseloir A, Schänzer W. Qualitative determination of synthetic analogues of insulin in human plasma by immunoaffinity purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for doping control purposes. *Anal Chem* **2005**;77:3579-85.
123. Falick AM, Hines W, Medzihradzky K, Baldwin M, Gibson B. Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**;4:882 - 893.
124. Papayannopoulos IA. The Interpretation of Collision-Induced Dissociation Tandem Mass-Spectra of Peptides. *Mass Spectrometry Reviews* **1995**;14:49-73.
125. Wilm M, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* **1996**;68:1-8.
126. Juraschek R, Dulcks T, Karas M. Nanoelectrospray--more than just a minimized-flow electrospray ionization source. *J Am Soc Mass Spectrom* **1999**;10:300-8.
127. Young J, Anwar A. Strong Diabetes. *Br J Sports Med* **2007**.
128. Gottwald W. Statistik für Anwender. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.
129. Mandel J. The statistical Analyses of experimental data. New York: John Wiley & Sons, 1964.
130. Thomas A, Geyer H, Mester HJ, Schänzer W, Zimmermann E, Thevis M. Quantitative Determination of Adrenaline And Noradrenaline in Urine Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia* **2006**;64:587-591.
131. Nordisk N. Novolog Insulin Aspart - Information for the patient. 2002.
132. Lilly E. Humalog Insulin Lispro Injection - Description. 2002.
133. Given BD, Cohen RM, Shoelson SE, Frank BH, Rubenstein AH, Tager HS. Biochemical and clinical implications of proinsulin conversion intermediates. *J Clin Invest* **1985**;76:1398-405.

134. Soudan B, Girardot C, Fermon C, Verlet E, Pattou F, Vantyghem MC. Extreme subcutaneous insulin resistance: a misunderstood syndrome. *Diabetes Metab* **2003**;29:539-46.
135. Birkeland KI, Donike M, Ljungqvist A, Fagerhol M, Jensen J, Hemmersbach P, et al. Blood sampling in doping control. First experiences from regular testing in athletics. *Int J Sports Med* **1997**;18:8-12.
136. Urhausen A, Gabriel H, Kindermann W. Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med* **1995**;20:251-76.
137. Thevis M, Loo JA, Loo RR, Schänzer W. Recommended criteria for the mass spectrometric identification of target peptides and proteins (<8 kDa) in sports drug testing. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**;21:297-304.
138. De Palo EF, Gatti R, Lancerin F, Cappellin E, Solda G, De Palo CB, et al. Urinary insulin-like growth factor I in athletes, before and after physical exercise, and in sedentary subjects. *Clin Chim Acta* **2002**;322:51-7.
139. Polonsky K, Frank B, Pugh W, Addis A, Karrison T, Meier P, et al. The limitations to and valid use of C-peptide as a marker of the secretion of insulin. *Diabetes* **1986**;35:379-86.
140. Kubasik NP, Ricotta M, Hunter T, Sine HE. Effect of duration and temperature of storage on serum analyte stability: examination of 14 selected radioimmunoassay procedures. *Clin Chem* **1982**;28:164-5.