

Massenspektrometrie-basierte Analytik neuer Dopingsubstanzen

Mario Thevis, Wilhelm Schänzer

Zentrum für Präventive Dopingforschung - Institut für Biochemie, Am Sportpark Müngersdorf 6, 50933 Köln

URL: www.dopinginfo.de / www.cepredo.de / www.drugtestinganalysis.com

Doping ist seit jeher ein unerwünschter Begleiter des Sports, durch den betrügerische Athleten die eigenen Leistungsgrenzen zum persönlichen Vorteil verschieben wollen, um so einen unfairen Vorsprung zu ihren Mitstreitern zu gewinnen. Historisch lassen sich Belege für Versuche der künstlichen Leistungssteigerung und Übervorteilung im Sport bis zu den antiken Olympischen Spielen zurückverfolgen, und pharmakologische Einflussnahmen, insbesondere im professionellen Radsport, sind spätestens seit 1879 dokumentiert (1).

Die Entwicklung sensitiver analytischer Verfahren, im speziellen mit Hilfe der Massenspektrometrie, hat seit Einführung systematischer Dopingkontrollen 1966/1967 zum Nachweis zahlreicher verbotener Substanzen in Sportlerproben beigetragen. So wurden beispielsweise Funde von Stimulanzien bei den Olympischen Spielen 1972 mittels gaschromatographisch-massenspektrometrischer Methoden bewiesen oder anabol-androgene Steroide 1976 bei Olympiateilnehmern in Montreal detektiert (2,3). Umfangreiche Skandale wurden u.a. durch verschiedene Steroidfunde bei den Panamerikanischen Spielen 1983 (4), Plasmavolumenexpander-Missbrauch bei den Nordischen Ski-Weltmeisterschaften 2001 in Lahti (5-7), Designersteroid-Missbrauch bei amerikanischen und europäischen Eliteathleten (8,9) sowie zahlreiche Fälle des Erythropoietin-Dopings in Ski- und Radsport sowie in der Leichtathletik ausgelöst (10-12). Neben dem Missbrauch zu Dopingzwecken hergestellter Designersubstanzen oder zugelassener Medikamente wird seit einiger Zeit die illegale Verwendung in Entwicklung und klinischen Erprobungsphasen befindlicher Präparate vermutet, wie z.B. so genannter selektive Androgenrezeptor Modulatoren (SARMs) (13-18), Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF)-Stabilisatoren (19), oder Modulatoren der Calstabin-Ryanodin-gesteuerten Kalziumkanäle (MCRs) (20-23). Aufgrund der erschwerten Zugänglichkeit auch für Dopingkontroll-Laboratorien kann der Einsatz solcher Verbindungen unentdeckt bleiben, wenn nicht im Sinne der präventiven Dopingforschung frühzeitig empfindliche und umfangreiche Analyseverfahren vorzugsweise auf Basis der Massenspektrometrie (MS) etabliert werden. In Bezug auf SARMs, HIFs und kürzlich auch MCRs sind Studien zum Fragmentierungsverhalten unter Elektronenstoß-Ionisation sowie Elektrospray Ionisation mit kollisionsinduzierter Dissoziation durchgeführt worden und bilden die Grundlage neuer/erweiterter Analyseverfahren in der Dopingbekämpfung.

Selektive Androgenrezeptor Modulatoren (SARMs)

SARMs repräsentieren eine neue Klasse anaboler Wirkstoffe, die strukturell nicht mit Steroiden verwandt sind. Aufgrund der Fähigkeit Androgenrezeptoren gewebespezifisch zu aktivieren bzw. zu inhibieren, werden zahlreiche Anwendungsgebiete erforscht, die im Besonderen die Behandlung von Muskelschwund und Osteoporose betreffen. Aufgrund der muskelaufbauenden Wirkungen liegt ein großes Missbrauchspotential dieser Verbindungen vor, wodurch Nachweisverfahren zwingend erforderlich sind.

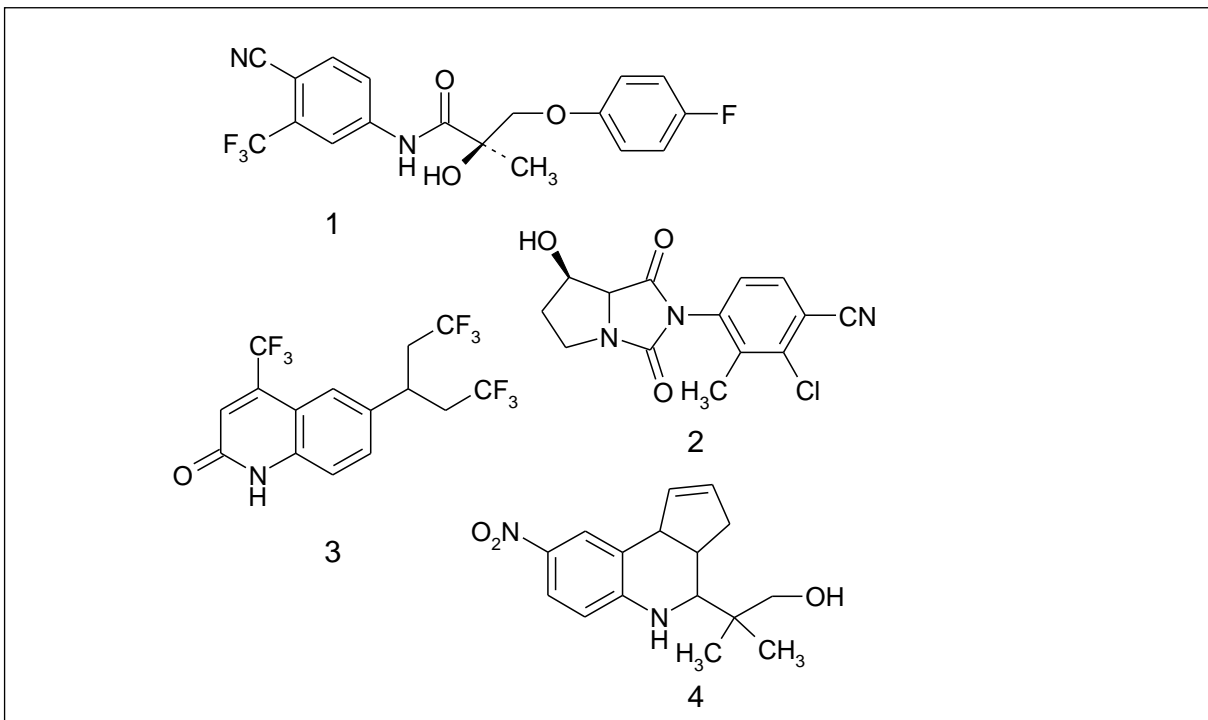


Abbildung 1: Typische Vertreter selektiver Androgenrezeptor Modulatoren:

1) Arylpropionamid-basiert, 2) bityklisches Hydantoin, 3) Chinolin-, und 4) Tetrahydrochinolin-basiert

Chemisch können Vertreter dieser Kategorie in Arylpropionamide, bityklische Hydantoin, Chinolinone und Tetrahydrochinoline eingeteilt werden (Abbildung 1), wobei die erstgenannte Gruppe die fortschrittlichste in klinischen Erprobungsphasen darstellt. Bereits 2006 wurden erste Studien zum Nachweis typischer Arylpropionamid-basierter SARMs durchgeführt und massenspektrometrisch charakterisiert. Auf der Basis der erhobenen Daten wurden Metaboliten aus *in-vitro* Versuchen identifiziert und zusammen mit den aktiven Wirkstoffen in existierende Screeningprozeduren implementiert, um trotz fehlender klinischer Zulassung Kontrollen bezüglich dieser Substanzen durchführen zu können, die seit Januar 2008 explizit auf der Verbotsliste der Welt Anti-Doping Agentur (WADA) aufgeführt sind. Weitere Untersuchungen zu SARMs mit bityklischer Hydantoinstruktur, Chinolinon- und Tetrahydrochinolin-Nukleus wurden ebenfalls für erweiterte Dopingkontrollen durchgeführt und haben das Spektrum der Nachweismöglichkeiten

deutlich vergrößert. In Abbildung 2a ist ein Chromatogramm mit spezifischen Vorläufer-/Produkt-Ionenpaaren einer Analyse Arylpropionamid-verwandter SARMs gezeigt, wobei ein Urin mit je 1 ng/mL der gesuchten Substanzen angereichert wurde. Ein Produkt-Ionenspektrum einer dieser Verbindungen ist in Abbildung 2b dargestellt. Erste Prävalenzstudien mit mehr als 8000 Dopingkontrollproben aus dem Jahre 2008 bezüglich der intakten Verbindungen aber auch eines elektrochemisch synthetisierten Metaboliten (24) haben bisher keine positiven Befunde ergeben.

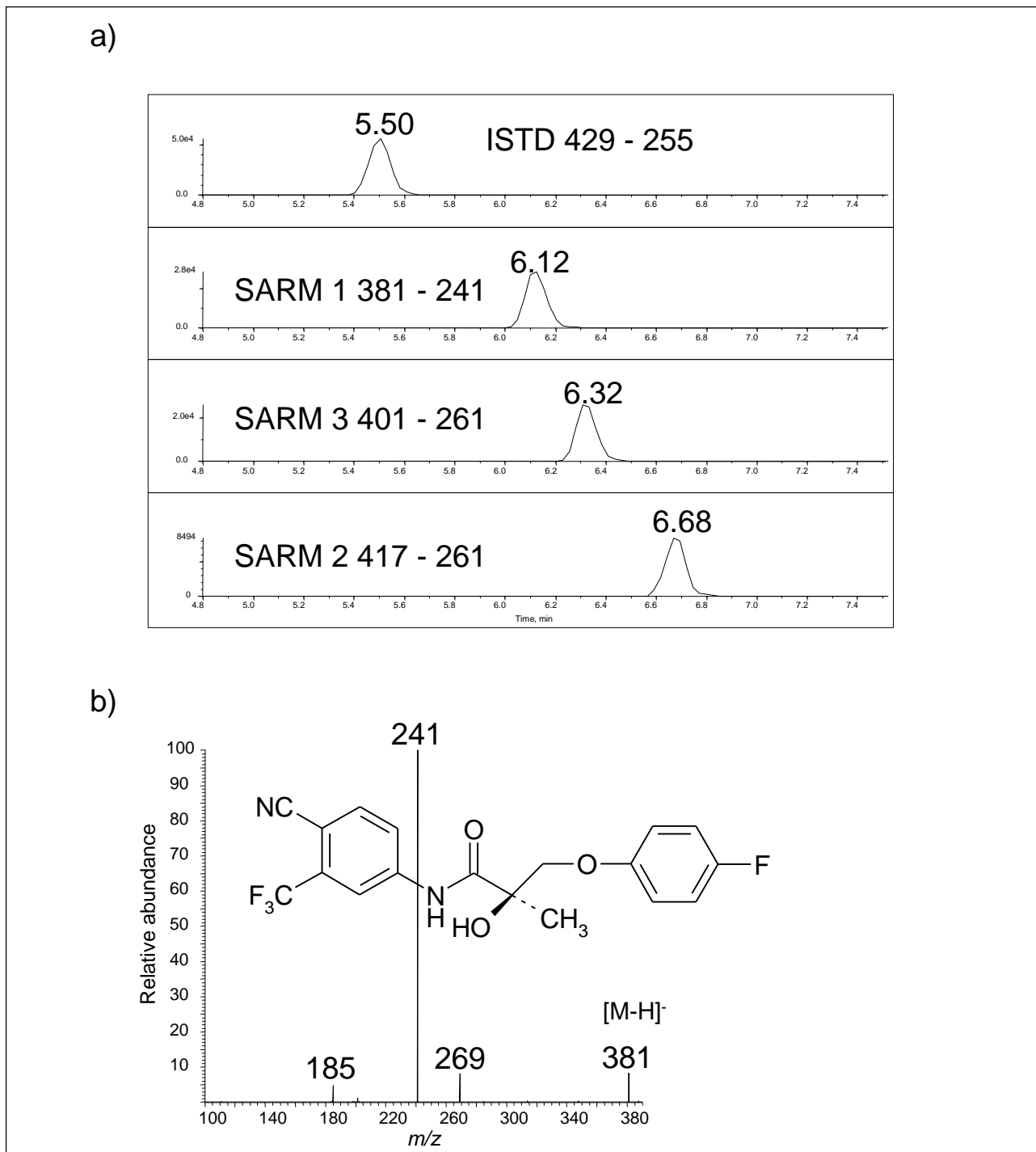


Abbildung 2:

- a) Extrahierte Ionenpaar-Chromatogramme für Vertreter der Arylpropionamid-basierten SARMs eines Urins, der mit 1ng/mL angereichert wurde;
- b) ESI-Produkt-Ionenspektrum einer repräsentativen SARM-Verbindung

HIF-Stabilisatoren

Während Therapien zur Behandlung von Anämien üblicherweise Gaben rekombinant hergestellten Erythropoietins (EPO) bedürfen, basiert ein neuartiger Ansatz auf der pharmakologischen Simulation einer sauerstoffarmen Atmosphäre. Im Falle normaler (normoxischer) Zustände ist die körpereigene EPO-Produktion reduziert und somit auch die daraus resultierende Syntheserate neuer Erythrozyten. Dies wird durch eine Sauerstoffsensitivität gesteuert, die auf der Hydroxylierung von HIF-1 α mit Hilfe so genannter Prolylhydroxylasen und den daraus folgenden Abbau des HIF-1 α basiert. Unter Sauerstoffmangelbedingungen kann die Degradierung des HIF-1 α nicht erfolgen, und durch Komplexbildung mit HIF-1 β wird die EPO-Genexpression stimuliert, so dass vermehrt neue rote Blutkörperchen produziert werden. Der Katalysator des Abbaus von HIF-1 α , die Prolylhydroxylase, kann durch niedermolekulare Verbindungen wie FG-2216 inhibiert werden und so dem Organismus eine Sauerstoffmangelsituation simuliert werden, die eine erhöhte Erythrozytenproduktion zur Folge hat.

Diesen Effekt könnten betrügerische Athleten nutzen, um ihre Ausdauerleistungsfähigkeit illegal zu steigern, so dass auch hier frühzeitige Entwicklungen von Nachweisverfahren notwendig sind. Die genaue Struktur des in der klinischen Erprobungsphase II befindlichen Produkts FG-2216 ist bislang nicht bekannt gegeben worden, aber die grundsätzliche Kernstruktur ist in Abbildung 3 dargestellt. Es handelt sich um ein Isochinolin-Derivat, welches aufgrund seiner körperfremden Natur analytisch gut zu erfassen sein sollte. Erste Studien mit Modell-Substanzen dieser Reihe haben gezeigt, dass insbesondere die Flüssigkeitschromatographie-Elektrospray Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) geeignet ist. Ein typisches Produkt-Ionenspektrum eines Modell-Analyten zeigte zudem interessante Dissoziationsmuster nach Stoßanregung, die zu einem nominellen Verlust von 11 Da führten, zusammengesetzt aus einer Elimination von HCN (-27 Da) und einer Addition von Sauerstoff (+16 Da).

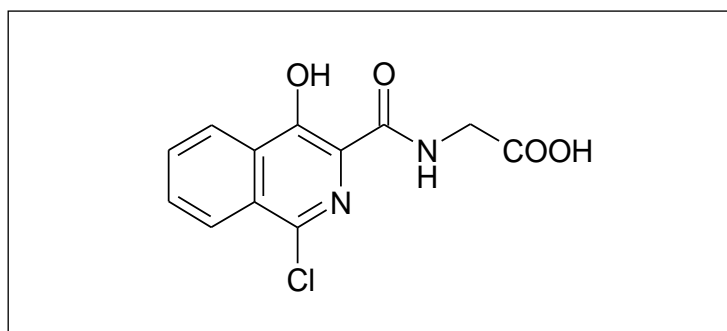


Abbildung 3: Typische Kernstruktur neuer HIF-Stabilisatoren

Modulatoren der Calstabin-Ryanodin-gesteuerten Kalziumkanäle (MCRs)

Neue Erkenntnisse bezüglich Arrhythmien der Herzmuskulatur und gleichzeitig der Ermüdung der Skelettmuskulatur haben die Bedeutung der Calstabin-Ryanodin-gesteuerten Kalziumkanäle in diesem Zusammenhang untermauert, und erste Verbindungen für Therapeutika werden untersucht (25,26). Zu diesen zählen JTV-519 sowie S-107, deren ausdauerleistungssteigerndes Potential im Tierversuch belegt wurde. Durch Ausdauerbelastung sinkt die Affinität des Calstabins zum Ryanodin, wodurch das vollständige Schließen der Kalziumkanäle nicht mehr gewährleistet wird und dadurch die Depolarisations-induzierte Aktivität gestört ist.

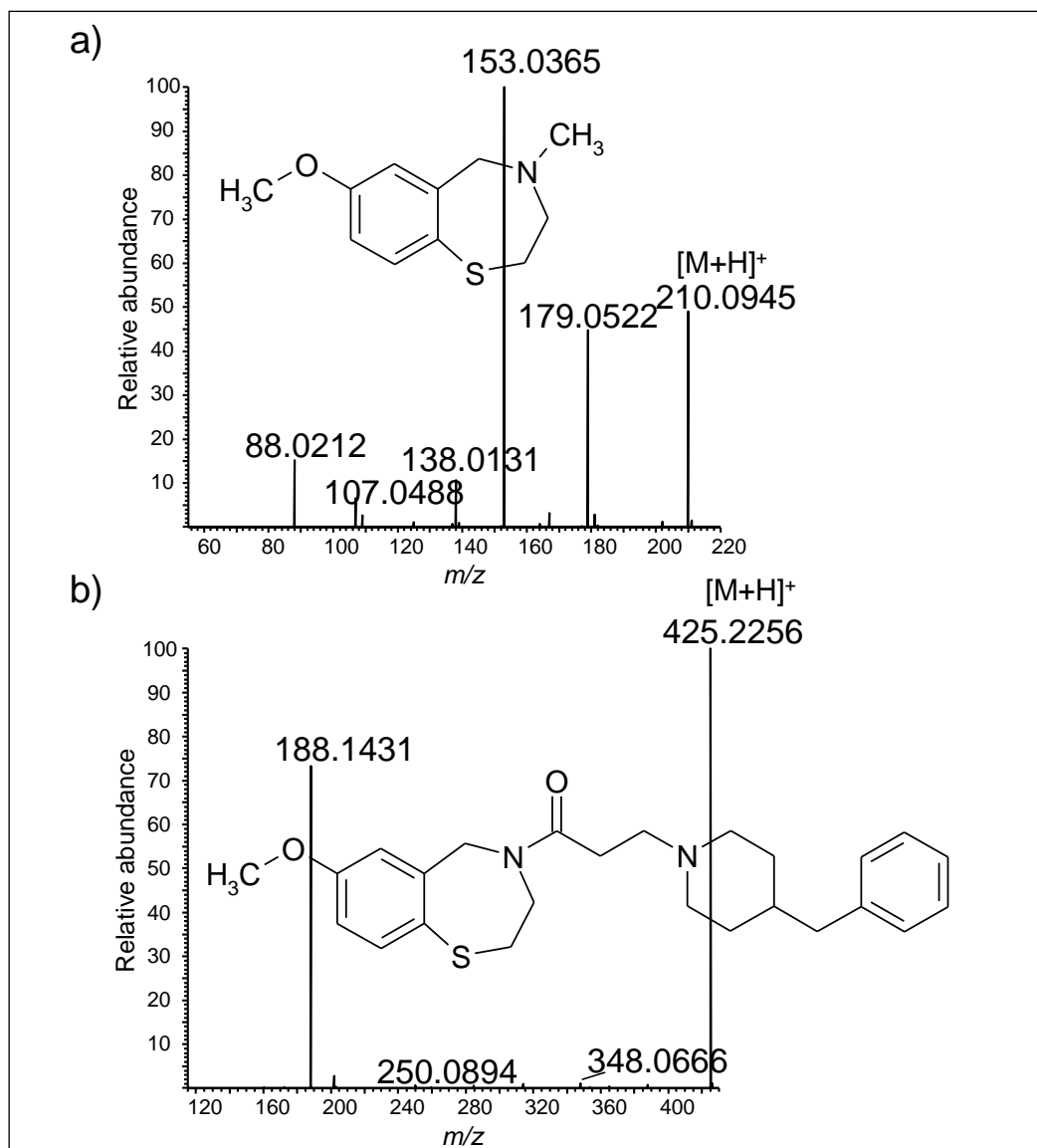


Abbildung 4: ESI-Produkt-Ionenspektren von a) S-107 und b) JTV-519

Aufgrund der Tatsache, dass belastungsinduzierte Veränderungen (u.a. Hyperphosphorylierungen) des Calstabin-Ryanodin Zusammenspiels in der Muskulatur trainierter Radfahrer und Mäuse vergleichbar waren, haben die Autoren eines kürzlich erschienenen Artikels auf das Missbrauchs-

potential der Substanz S-107 im Leistungssport hingewiesen. Erste Studien zur Nachweisbarkeit in der Dopinganalytik wurden durchgeführt und belegen die Eignung konventioneller Analyseverfahren mittels LC-ESI-MS/MS, um empfindlich und spezifisch S-107, JTV-519 sowie potentielle Metaboliten zu erfassen. In Abbildung 4 sind Produkt-Ionenscans nach Protonierung und kollisions-induzierter Dissoziation der Analyten dargestellt. Um möglichst umfangreich diese und artverwandte Verbindungen zu bestimmen, werden nicht nur zielgerichtete Messungen durchgeführt (d.h. auf bestimmte Analyten ausgerichtet mittels Vorläufer-/Produkt-Ionenpaare), sondern zudem Vorläufer-Ionenscans mit Hilfe der für den Nukleus charakteristischen Produkt-Ionen gemessen (23). Auf diese Weise können bisher unbekannte Stoffwechselprodukte und mögliche Derivate der Substanzen erfasst und gegebenenfalls identifiziert werden.

Die Vielfalt neuer Pharmaka, deren Einflussnahme auf die körperliche Leistungsfähigkeit und das damit zusammenhängende Missbrauchspotential im Sport, erfordern kontinuierliche Verbesserungen und Erweiterungen der Dopinganalysen. Die Kenntnis der genauen Struktur, des massenspektrometrischen Verhaltens des Wirkstoffes sowie seiner Metaboliten ist ein wesentlicher Bestandteil der Methodenentwicklung im Antidopingkampf. Die hier dargestellten Verbindungen sind repräsentativ für neue Therapeutika, die möglicherweise in einigen Jahren die klinischen Erprobungsphasen beenden werden, aber bereits gegenwärtig im Sport missbraucht werden können. Da solche Szenarien bereits in der Vergangenheit aufgetreten sind, muss die präventive Dopingforschung frühzeitig die Bestimmung neuer Präparate aufnehmen, um einen Vorsprung dopender Sportler so weit wie möglich zu minimieren.

Literatur

1. Prokop L. The Struggle against Doping and its History. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 1970;10: 45-48.
2. Thevis M, Schänzer W. Mass Spectrometry in Doping Control Analysis. *Current Organic Chemistry* 2005;9: 825-848.
3. Thevis M, Schänzer W. Mass spectrometry in sports drug testing: Structure characterization and analytical assays. *Mass Spectrometry Reviews* 2007;26: 79-107.
4. Neff C. Caracas: A Scandal And A Warning. *Sports Illustrated* 1983;59: 18-23
5. Thevis M, Opfermann G, Schänzer W. Nachweis des Plasmavolumenexpanders Hydroxyethylstärke in Humanurin. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 2001;52: 316-320.
6. Thevis M, Opfermann G, Schänzer W. Mass Spectrometry of Partially Methylated Alditol Acetates Derived from Hydroxyethyl Starch. *Journal of Mass Spectrometry* 2000;35: 77-84.
7. Thevis M, Opfermann G, Schänzer W. Detection of the plasma volume expander hydroxyethyl starch in human urine. *Journal of chromatography. B* 2000;744: 345-350.
8. Catlin DH, Ahrens BD, Kucherova Y. Detection of norbolethone, an anabolic steroid never marketed, in athletes' urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002;16: 1273-1275.
9. Catlin DH, Sekera MH, Ahrens BD, Starcevic B, Chang Y-C, Hatton CK. Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2004;18: 1245-1249.
10. Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 2000;405: 635.

11. Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Analytical Biochemistry* 2002;311: 119-126.
12. Breidbach A, Catlin D, Green G, Tregub I, Truong H, Gorzek J. Detection of recombinant human erythropoietin in urine by isoelectric focusing. *Clinical Chemistry* 2003;49: 901-907.
13. Thevis M, Kamber M, Schänzer W. Screening for metabolically stable aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006;20: 870-876.
14. Thevis M, Kohler M, Maurer J, Schlörer N, Kamber M, Schänzer W. Screening for 2-quinolinone-derived selective androgen receptor agonists in doping control analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007;21: 3477-3486.
15. Thevis M, Kohler M, Schlörer N, Fusshöller G, Schänzer W. Screening for two selective androgen receptor modulators using gas chromatography-mass spectrometry in doping control analysis. *European journal of mass spectrometry* 2008;14: 153-161.
16. Thevis M, Kohler M, Schlörer N, Kamber M, Kuhn A, Linscheid MW, Schänzer W. Mass spectrometry of hydantoin-derived selective androgen receptor modulators. *Journal of Mass Spectrometry* 2008;43: 639-650.
17. Thevis M, Kohler M, Thomas A, Maurer J, Schlörer N, Kamber M, Schänzer W. Determination of benzimidazole- and bicyclic hydantoin-derived selective androgen receptor antagonists and agonists in human urine using LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008;391: 251-261.
18. Thevis M, Schänzer W. Mass spectrometry of selective androgen receptor modulators. *Journal of Mass Spectrometry* 2008;43: 865-876.
19. Thevis M, Kohler M, Schlörer N, Schänzer W. Gas Phase Reaction of Substituted Isoquinolines to Carboxylic Acids in Ion Trap and Triple Quadrupole Mass Spectrometers after Electrospray Ionization and Collision-Induced Dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2008;19: 151-158.
20. Thevis M, Kohler M, Schänzer W. New drugs and methods of doping and manipulation. *Drug Discovery Today* 2008;13: 59-66.
21. Thevis M, Schänzer W. Emerging Drugs - Potential for misuse in sport and doping control detection strategies. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2007;7: 533-539.
22. Thevis M, Schänzer W. Illicit Organogenesis - Methods and Substances of Doping and Manipulation. *Organogenesis* 2008;4: in press.
23. Thevis M, Beuck S, Thomas A, Kohler M, Schlörer N, Vajjala I, Schänzer W. Screening for the Calstabin-Ryanodine-Receptor Complex Stabilizers JTV-519 and S-107 in Doping Control Analysis. *Drug Testing and Analysis* 2009;1: in press.
24. Thevis M, Lohmann W, Schrader Y, Kohler M, Bornatsch W, Karst U, Schänzer W. Use of an electrochemically synthesised metabolite of a selective androgen receptor modulator for mass spectrometry-based sports drug testing. *European journal of mass spectrometry* 2008;14: 163-170.
25. Bellinger AM, Reiken S, Dura M, Murphy PW, Deng SX, Landry DW, Nieman D, Lehnart SE, Samaru M, LaCampagne A, Marks AR. Remodeling of ryanodine receptor complex causes "leaky" channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105: 2198-2202.
26. Bellinger AM, Mongillo M, Marks AR. Stressed out: the skeletal muscle ryanodine receptor as a target of stress. *Journal of Clinical Investigation* 2008;118: 445-453.