

Dopinganalytik von Phyto- pharmaka im Pferdesport

Marc Machnik

Einleitung

Nach dem Antidopingreglement der nationalen und internationalen Verbände gilt im Pferdesport – wie auch im Humanleistungssport – bis auf wenige Ausnahmen die sogenannte Nulllösung. Das heisst, der qualitative Nachweis einer Substanz führt unabhängig von ihrer Konzentration zu einem positiven Befund. Die Antidopingregeln gelten im Pferdesport auch für Medikamente, die zu Therapiezwecken eingesetzt werden. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Substanzen synthetischen oder pflanzlichen Ursprungs sind. Aufgrund der Dynamik des pharmazeutischen Markts und der damit verbundenen Einführung neuer Medikamente unterliegt auch die Dopinganalytik einem stetigen Erweiterungs- und Verbesserungsprozess. Bezugnehmend auf die neuesten analytischen Techniken wird «das Leben einer Dopingprobe im Labor» vorgestellt, wobei auch auf die Analytik dopingrelevanter Arzneistoffe aus der Natur eingegangen wird.

Grundlagen der Doping-analytik

Die Isolierung kleinster Mengen verbotener Substanzen aus Urin und Blut erfordert eine aufwendige Probenvorbereitung, bei der nicht nur Flüssig-Flüssig- und Festphasenextraktionen, sondern auch hochspezifische Extraktionsmethoden verwendet werden können (Thevis und Schänzer 2007a). Bei der anschliessenden Detektion der gesuchten Stoffe kommen gas- und flüssigchromatografische Verfahren in Verbindung mit massenspektrometrischen und stickstoffselektiven Messmethoden zum Einsatz. Diese ermöglichen den Nachweis einer Vielzahl von verbotenen Stoffen aus unterschiedlichen Substanzklassen (Ho et

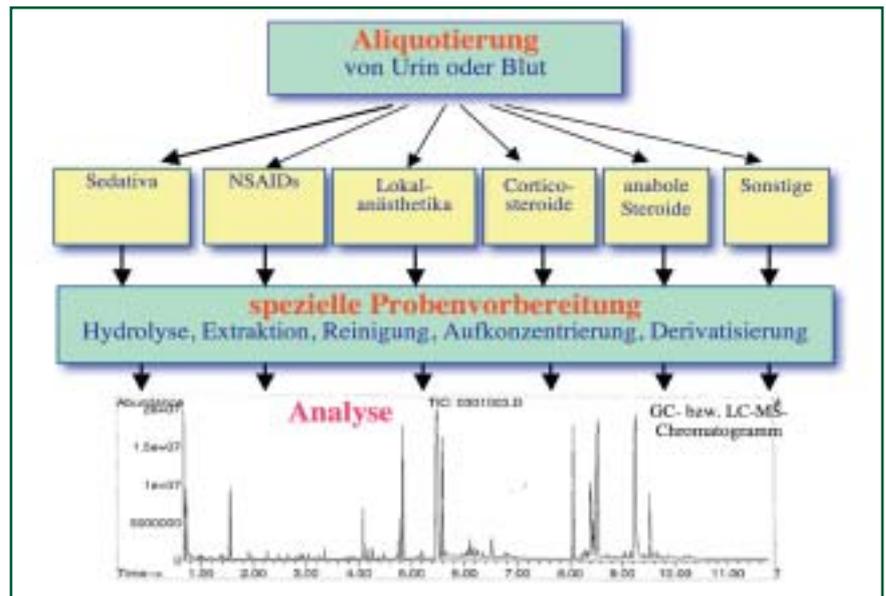


Abbildung 1: Übersicht über die Screeningverfahren in der Pferdedopinganalytik.

al. 2006, Thevis und Schänzer 2007b, siehe *Abbildung 1*).

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion lösen sich die gesuchten Substanzen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften bei einem bestimmten pH-Wert besser in einem organischen Lösungsmittel (z.B. Ether) als in der Probe.

In nachfolgenden Schritten kann die Etherphase durch Zentrifugation vom Urin beziehungsweise Blut getrennt und analysiert werden. Ein anderes Verfahren, die sogenannte Festphasenextraktion, nutzt die Wechselwirkung von Arzneistoffen zu chemisch modifizierten Oberflächen, die als Festphase in Kartuschen oder Säulen aufgebracht sind. Auch hierbei wird eine Isolierung der gesuchten Substanzen aus der Probe erreicht. Gleichzeitig werden Inhaltsstoffe entfernt, die bei einer Analyse Störsignale verursachen. Schwerpunktmässig werden zum Nachweis und zur Identifizierung von pharmazeutischen Substanzen computergestützte chromatografische Sys-

teme eingesetzt, die über eine Schnittstelle mit einem Massenspektrometer gekoppelt sind.

Bei der Chromatografie wird zwischen Flüssigkeits- und Gaschromatografie unterschieden. Beide Verfahren dienen der Trennung von Substanzen.

Im Gaschromatografen werden die Substanzen bei Temperaturen von zirka 300° C verdampft und mithilfe eines Gasstroms durch eine Kapillarsäule befördert. Durch unterschiedliche molekulare Wechselwirkung mit der stationären Schicht der Innenwand verbleiben die Substanzen unterschiedlich lang in der Säule und können entsprechend ihrer Verweildauer (Retentionszeit) voneinander getrennt werden. Bei der Flüssigkeitschromatografie werden die Substanzen nicht in die Gasphase überführt, sondern in einem geeigneten Lösungsmittel (Laufmittel) durch eine gepackte Säule befördert. Auch bei der Flüssigkeitschromatografie werden die Substanzen durch die Wechselwirkung zur

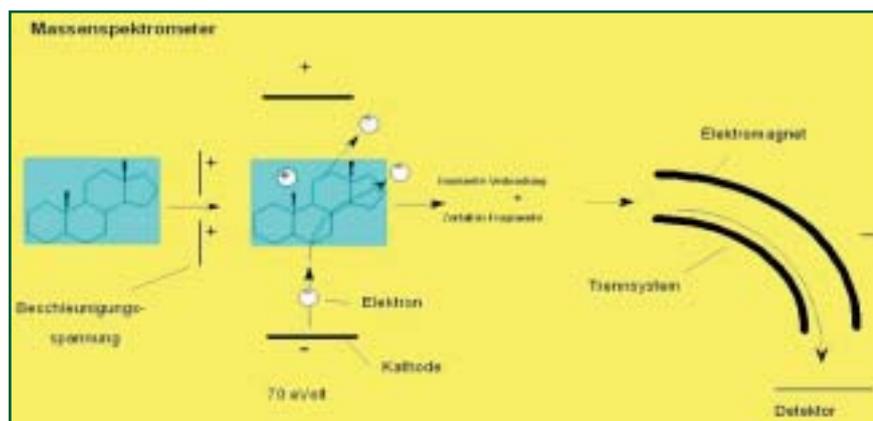


Abbildung 2: Prinzip der Elektronenstoßionisation in einem Massenspektrometer

chemisch modifizierten, stationären Phase in der Säule voneinander getrennt.

Im Detektor, dem Massenspektrometer, werden durch elektrische Ladungsübertragungen oder Elektronenbeschuss Molekülbruchstücke mit negativer oder positiver Ladung erzeugt, die sich in einem magnetischen oder elektrischen Feld sammeln und anschliessend registrieren lassen. Die Aufzeichnung solcher Molekülbruchstücke einer Verbindung heisst Massenspektrum. Jede Substanz erzeugt ihr eigenes charakteristisches Fragmentierungsmuster – einmalig wie ein Fingerabdruck – sodass sich jede Substanz eindeutig identifizieren lässt.

Abbildung 2 zeigt schematisch die Entstehung von Molekülfragmenten bei der Elektronenstoßionisation (engl. Electron Impact EI), und in Abbildung 3 wird das EI-Massenspektrum des Xanthins Coffein dargestellt.

Für die Analyse von «natürlichen Dopingsubstanzen» werden die gleichen Techniken eingesetzt, die zum Nachweis von synthetischen Pharmaka verwendet werden. Pflanzliche Bestandteile oder Extrakte gelten als dopingrelevant, wenn sie als leistungsfördernd oder therapeutisch wirksam eingestuft werden. Sobald die pharmakologische Wirksamkeit eines Pflanzenstoffs erwiesen ist, muss eine analytische Methode zu ihrer Identifizierung in Pferdeblut und -urin entwickelt werden. Als Analyt kann die applizierte Substanz (pflanzliche Leitsubstanz) oder deren Abbauprodukt (Metabolit) dienen.

Die Verwendung von Kräutern und Heilpflanzen findet bei der Herstellung von Futterergänzungs- und Arzneimitteln weite Verbreitung. Beispiele für dopingrelevante Arzneistoffe aus der Natur sowie deren Quelle und Wirkung sind in Tabelle 1 aufgeführt. Der Grossteil der in der Tabelle genannten Stoffe hat in der Vergangenheit zu Dopingfällen im internationalen Pferdesport geführt.

Statistik in der Pferdedopinganalytik

Die statistische Auswertung aller Wirkstoffgruppen, die in den letzten zehn Jahren im Institut für Biochemie zu positiven Befunden geführt haben, ist in Abbildung 4 dargestellt. Fast ein Drittel aller positiven Befunde geht auf die Gruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistika, NSAID, zurück. Die Entwicklung über die letzten zehn

Tabelle 1: Dopingrelevante Arzneistoffe aus der Natur

Substanz	Quelle	Wirkung
Hordein*	Malzkeim, Gerste	stimulierend
Methylxanthine (Coffein, Theobromin*, Theophyllin)	Kakao-, Kaffee-, Teepflanze	stimulierend, broncho- und vasodilatatorisch
Menthol	Pfefferminze	durchblutungsfördernd, schleimlösend
Kampfer	Lorbeer, Kampferbaum, Koriander	stimulierend, antiseptisch, durchblutungsfördernd
Atropin/Scopolamin	Tollkirsche, Engelstropfete	halluzinogen, stimulierend/sedierend
Arsen*	Erz, Gestein	tonisch
Salicin (Salicylsäure*)	Weidenrinde, Luzerne (Alfalfaheu)	analgetisch, antiphlogistisch
Dimethylsulfoxid* (DMSO)	Luzerne (Alfalfaheu)	analgetisch, antiphlogistisch
Bufotenin	Anadenanthera	halluzinogen
Dimethyltryptamin (DMT)	z.B. Akazie	halluzinogen
Lupanin	Besenginster	schwach halluzinogen
Valerensäure	Baldriangewächs	sedativ
Ephedrin/Norephedrin	Ephedragewächs	stimulierend, bronchodilatatorisch
Nikotin	Tabakpflanze	stimulierend
Cocain/Benzoylcegonin	Cocapflanze	stimulierend
Oryzanol	Reis	anabol
Cannabinoide	Hanfpflanze	halluzinogen, sedierend
Chinin/Chinidin	Chinarindenbaum	analgetisch, antipyretisch/antiarrhythmisch
Reserpin	Rauwolfiagewächs	sedierend, anxiolytisch
Morphin/Codein	Schlafmohn	analgetisch, sedativ
Capsaicin	Paprika, Chili	durchblutungsfördernd
Octopamin, Synephrin	Bitterorange	stimulierend
Methylhexanamin	Geraniumgewächs	stimulierend
Gingerol	Ingwer	antiphlogistisch, antiemetisch
Ginsenosid	Ginseng	tonisch
Eugenol	Gewürznelke	analgetisch, antiphlogistisch
Tyramin*	Milchprodukte nach Fermentation	stimulierend
Harpagosid	Teufelskralle	analgetisch, antiphlogistisch

*abgesichert durch spezifischen Grenzwert

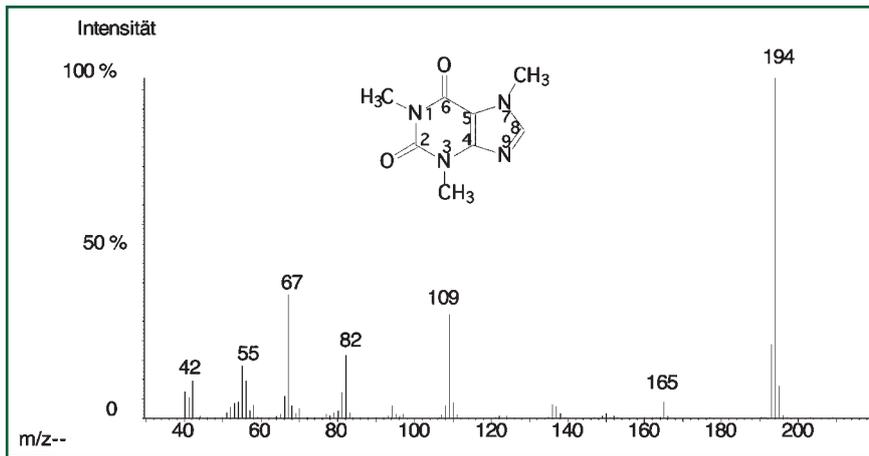


Abbildung 3: Struktur und EI-Massenspektrum von Coffein

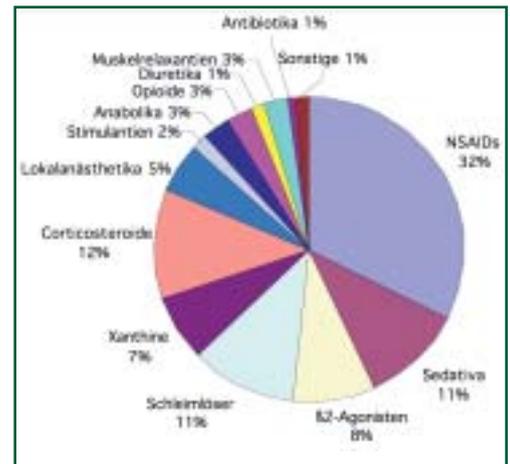


Abbildung 4: Prozentualer Anteil der verschiedenen Wirkstoffgruppen an der Gesamtheit aller positiven Proben der letzten 10 Jahre (n = 318) (Quelle: Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln)

Tabelle 2:

Positive Dopingbefunde der letzten fünf Jahre mit natürlichen Pharmaka in Deutschland

Jahr	Substanz	Disziplin	Gesamtzahl aller Positive
2005	Benzoyllecgonin (Cocain)	Galopprennen	24
	Coffein	Reitsport	
	Hordenin	Galopprennen	
	Morphin (2)	Galopprennen	
	Theophyllin	Galopprennen	
	Σ 6		
2006	Coffein	Galopprennen	36
	Coffein	Trabrennen	
	Theophyllin	Galopprennen	
	Σ 3		
2007	Kampfer	Trabrennen	33
	Menthol	Trabrennen	
	Menthol	Galopprennen	
	Theobromin	Reitsport	
	Σ 4		
2008	Coffein (2)	Reitsport	62
	Coffein	Trabrennen	
	Menthol (3)	Galopprennen	
	Σ 6		
2009 (Jan–Okt)	Benzoyllecgonin (Cocain)	Galopprennen	53
	Coffein (2)	Galopprennen	
	Coffein (2)	Trabrennen	
	Theobromin	Reitsport	
	Theophyllin	Galopprennen	
	Theophyllin	Trabrennen	
	Σ 8		

Jahre zeigt nach der Einführung der selektiven COX2-Inhibitoren wieder eine Zunahme der positiven Proben mit NSAID in den Jahren 2005 und 2006.

Abbildung 4 beinhaltet auch Substanzklassen, deren Vertreter natürlichen Ursprungs sein können, wie zum Beispiel die Xan-

thine. Darunter werden Substanzen wie Coffein, Theobromin und Theophyllin und so weiter zusammengefasst. Typische Sedativa aus der Natur sind im Baldrian enthalten, dessen Valerensäure als eine der Wirkkomponenten identifiziert wurde. Der wichtigste Vertreter der natürlichen Opiode

ist Morphin. Hordenin aus Malzkeimen und Bierhefe wirkt stimulierend, während Harpagophytum aus der Teufelskralle eine schmerzlindernde und entzündungshemmende Wirkung hat. So lassen sich zu fast jeder Gruppe der in *Abbildung 4* aufgeführten Substanzen natürliche Vertreter mit entsprechendem Wirkpotenzial benennen. *Tabelle 2* zeigt die positiven Fälle im deutschen Pferdesport der letzten 5 Jahre mit Dopingsubstanzen aus der Natur. Seit 2007 ist wieder eine Zunahme (absolut) von Dopingfällen durch Phytopharmaka zu verzeichnen. ◆

Anschrift des Referenten:
Dr. Marc Machnik
 Institut für Biochemie
 Deutsche Sporthochschule Köln
 m.machnik@biochem.dshs-koeln.de

Der Referent möchte auch folgende Personen erwähnen:

Prof. Dr. Wilhelm Schänzer
 Leiter des Institutes für Biochemie
Dr. Ina Schenk
 Mitarbeiterin am Institut für Biochemie

Literaturreferenzen:

1. Ho ENM, Leung DKK, Wan TSM, Yu NH (2006): Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids, and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1120: 38–53.
2. Thevis M, Schänzer W (2007a): Current role of LC-MS(/MS) in doping control. *Anal. Bioanal. Chem.* 388: 1351–1358.
3. Thevis M, Schänzer W (2007b): Mass spectrometry in sports drug testing: structure characterization and analytical assays. *Mass Spectrometry Reviews* 26: 79–107.