universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Doping im Sport

Kamber, Matthias

Magglingen, 1990

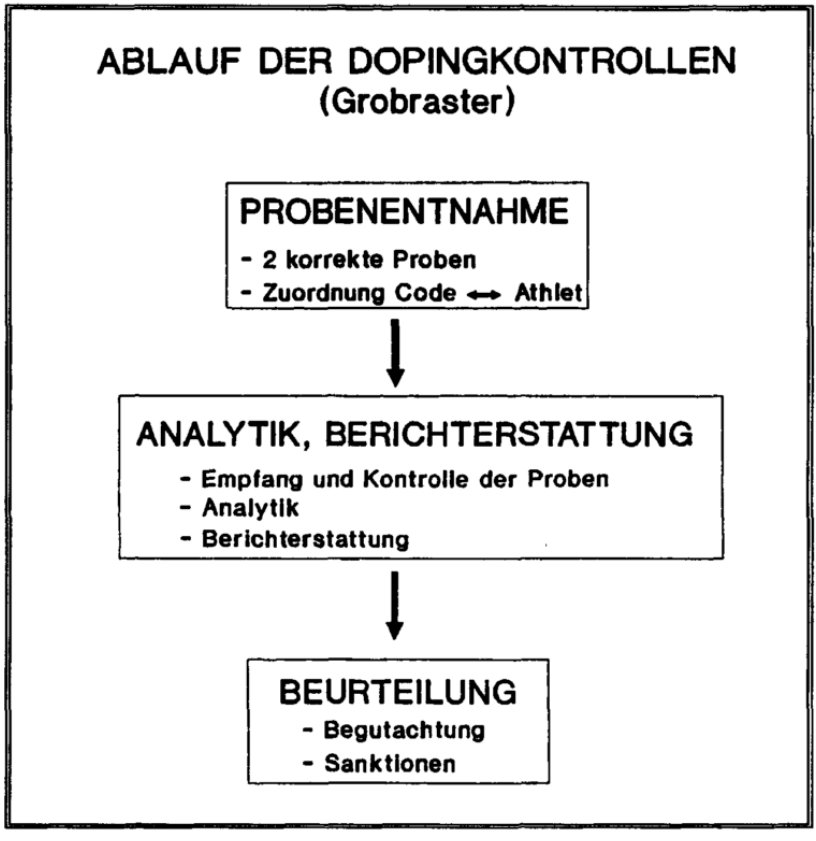
5. Analytik

urn:nbn:at:at-ubi:2-5136

5. ANALYTIK

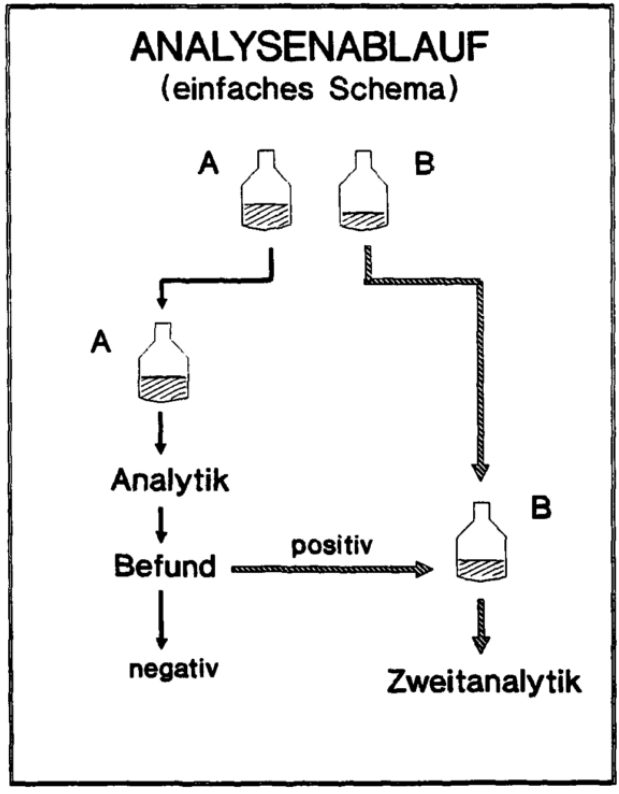
Im System der Dopingkontrollen spielt die Analytik eine wichtige Rolle. Auf Grund der Analysenresultate werden Sanktionen ergriffen oder nicht.

Der Ablauf einer Dopingkontrolle kann prinzipiell in drei voneinander möglichst unabhängige Bereiche unterteilt werden:



Abgrenzung der Bereiche der Dopingkontrolle

Die Aufgaben eines Labors sind klar umrissen: Empfang der Proben, Kontrollen der Siegel und der Verschlüsse, Analyse der Proben und Berichterstattung.



Prinzip des Analysenablaufes einer Dopingprobe im Labor: Von den zwei codierten Glasflaschen einer Dopingprobe wird der Inhalt der A-Flasche sofort analysiert, die B-Flasche wird tiefgefroren. Nur bei positivem Befund der A-Probe wird auf Verlangen der Inhalt der B-Flasche auch analysiert. Die Befunde der A- und B-Probe müssen übereinstimmen.

Der Nachweis erfolgt aus Urinproben von Athleten. Eine Urinprobe wird stets in zwei Glasflaschen ohne Namen, nur mit Codes gekennzeichnet, in die Labors gesandt. Die erste Flasche, die A-Probe, wird sofort analysiert, die zweite Flasche, die B-Probe, tiefgefroren. Bei negativem Analysenbefund wird die B-Probe vernichtet, bei positivem Befund der A-Probe hat der Athlet das Recht, eine Zweitanalyse mit der B-Probe zu verlangen. Zu diesem Zweck kann er zusammen mit einem Experten oder mit einer Vertrauensperson im Labor anwesend sein. Vor seinen Augen wird die B-Probe geöffnet und anschliessend der gesamte Analysengang durchgeführt. Erst wenn das Resultat der B-Probe dasjenige der A-Probe bestätigt, gilt die Probe als positiv. Ein stark vereinfachtes Ablaufschema ist in der Figur auf der vorhergehenden Seite gezeigt.

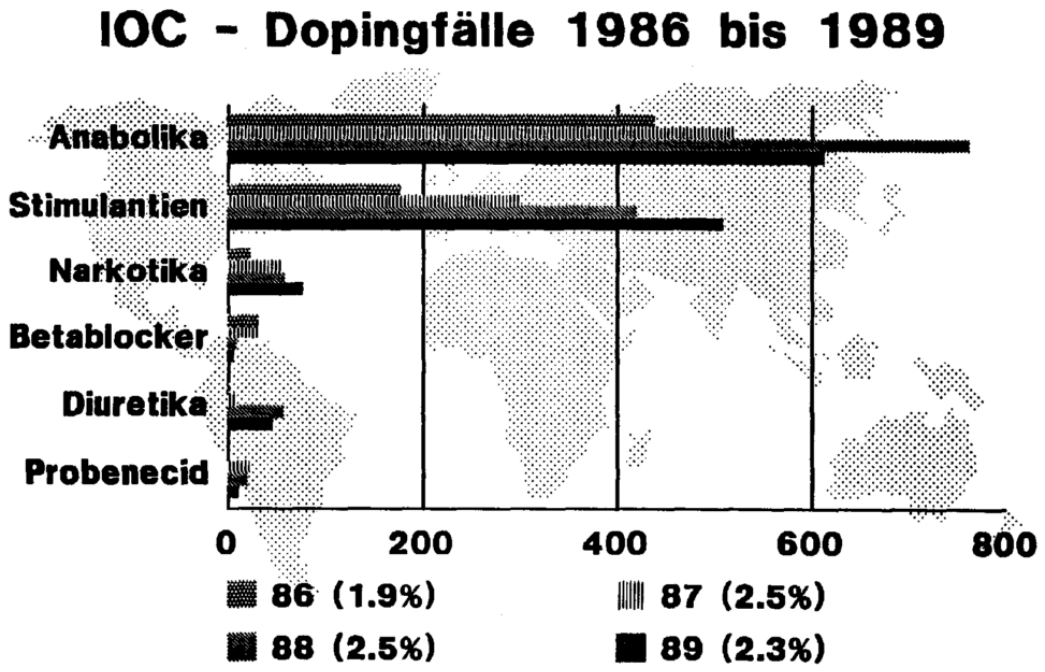
Seit den sechziger Jahren konnten, dank neuen Entwicklungen in der analytischen Chemie und speziell in der Gaschromatographie, mehr und mehr Dopingsubstanzen und ihre Metaboliten entdeckt werden. Aber nicht nur die Möglichkeit des Nachweises, sondern auch die Schnelligkeit und der maximal zu bewältigende Probendurchsatz spielen in der Dopinganalytik eine grosse Rolle. Das erste Mal, wo Dopinganalytik in grossem Massstab eingesetzt wurde, war 1972 an den Olympischen Spielen in München, wo innert zweier Wochen 2079 Proben analysiert wurden [38]. An den letzten Olympischen Sommerspielen 1988 in Seoul wurden 1601 Proben analysiert. Der Wert der dazu benötigten Ausrüstung belief sich auf über 3 Mio US$, im Einsatz standen über 30 hochqualifizierte Labormitarbeiter!

Diese Zahlen und die Wichtigkeit eines korrekten Resultates zeigen auf, dass nur ganz speziell ausgerüstete Labors mit den entsprechend hochqualifizierten Mitarbeitern diese Aufgaben erfüllen können und dürfen.

In den siebziger Jahren wurde weltweit mit Dopingkontrollen begonnen, was eine zunehmende Anzahl von Kontrollabors voraussetzte. Diese Labors waren oft den Anforderungen nicht gewachsen und lieferten teilweise positive Resultate von ungedopten Athleten (falsch positive) oder negative von nachweislich gedopten Athleten (falsch negative). Diese unbefriedigende Situation führte dazu, dass der internationale Leichtathletikverband (IAAF) 1979 Minimalvorschriften für Dopinglaboratorien einführte. Diese "Requirements for Accreditation - Standardisation of Analytical Procedures and Quality Tests for Doping Control Laboratories" wurden 1980 von der medizinischen Kommission des IOC übernommen. Sie regeln die notwendige Laborausrüstung, die Analysenabläufe und -methoden sowie den Ablauf der Akkreditierung.

Die Weiterentwicklung der Analysentechniken, die Aufnahme von neuen verbotenen Substanzklassen und Erfahrungen mit vor Gericht angefochtenen Analysenresultaten bewogen die medizinische Kommission des IOC, die Akkreditierungsvorschriften erneut zu verschärfen und gleichzeitig Vorschriften zur guten Laborführung (Good Laboratory Practices; GLP) einzuführen. Diese Vorschriften schreiben neben einer jährlichen Fähigkeitsprüfung, bei der 8 bis 10 unbekannte Urine innert ein paar Tagen zu analysieren sind, noch ein bis zwei Zwischentests während des Jahres vor, bei denen spezielle Proben, die bei der Fähigkeitsprüfung schlecht bestimmt wurden, analysiert werden müssen. Die Vorschriften traten 1989 in Kraft und hatten zur Folge, dass bei der Akkreditierung 5 von 20 Labors nur bedingt zugelassen wurden und im Verlaufe des Jahres 1989 spezielle Anstrengungen zur Wiedererlangung der Akkreditierung unternehmen mussten. Heute darf kein Labor ohne Akkreditierung des IOC Dopinganalysen im internationalen Bereich vornehmen. Liste der IOC-akkreditierten Laboratorien siehe Seite 7; Stand 1.6.1990.

In der folgenden Darstellung und in den Tabellen auf Seite 49 und 50 werden einige Informationen zu den Dopinganalysen der letzten Jahre gegeben.



Aufteilung der von 1986 bis 1989 weltweit identifizierten Substanzen auf die einzelnen Substanzklassen. Der Anteil der Anabolika beträgt jeweils zwischen 50% bis 65%.

Dopingkontrollen von 1986 bis 1989

	1986	1987	1988	1989
Labors	18	21	20	20
Kontrollen	32'982	37'882	47'069	52'371
davon im Training	6'505	5'870	10'140	14'684
positive	623	854	1'153	1'206
(%)	(1.9)	(2.3)	(2.5)	(2.3)

Die Anzahl identifizierter verbotener Substanzen ist höher als die Anzahl positiver Proben, da in einigen Proben mehr als eine verbotene Substanz gefunden wurde.

Zusammenstellung der weltweit in den Jahren 1986 bis 1989 von den akkreditierten Labors in Training und Wettkampf durchgeführten Analysen, mit der Anzahl der positiven Resultate.

IDENTIFIZIERTE SUBSTANZEN 1989 [40]

A) Stimulantien: total 508

Pseudoephedrin	196	Amphetamin	21
Phenylpropanolamin	128	Heptaminol	14
Ephedrin	50	Coffein	13
Kokain	30	Übrige (15 verschiedene)	56

B) Narkotika: total 76

Codein	34	Übrige (6 verschiedene)	22
Morphin	20		

C) Anabole Steroide: total 611

Nandrolon	224	Metenolon	22
Testosteron	166	Dehydrochlormethyltest.	13
Stanozolol	77	Boldenon (vet. !)	11
Methandrostenolon	37	Oxymetholon	11
Methyltestosteron	25	Übrige (10 verschiedene)	25

D) Betablocker: total 6

Propranolol	3	Übrige (2 verschiedene)	3

E) Diuretika: total 45

Furosemid	15	Canrenon	7
Hydrochlorthiazid	14	Übrige (3 verschiedene)	9

Urinmanipulationen mit Probenecid: total 10

Total identifizifierte Substanzen: 1'256

Weltweit identifizierte Substanzen 1989

Als wichtigste Bestimmungen für ein Dopinglabor seien die Vorschriften zur Beweisführung kurz erläutert: Tritt nach der Analyse der A-Probe ein Verdacht auf eine verbotene Substanz auf, so muss mit der A-Probe nochmals die Analytik durchgeführt werden. Bei dieser erneuten Durchführung müssen zwingend verschiedene bekannte Laborstandards zum Nachweis der korrekten Analyse, eine normale Urinprobe sowie ein unter kontrollierten Bedingungen durchgeführter Ausscheidungsversuch mit der verdächtigen Substanz mitanalysiert werden. Erst der direkte Vergleich zwischen der verdächtigen A-Probe und dem bekannten Ausscheidungsversuch gilt als Beweis für die Einnahme einer verbotenen Substanz. Verglichen werden wenn möglich nicht nur die ursprüngliche Substanz, sondern auch ein bis mehrere Metaboliten zum Beweis der Körperpassage. Der Strukturbeweis der Substanz mittels Massenspektroskopie ist zwingend vorgeschrieben. Nach erfolgter Berichterstattung gelten für die eventuell noch durchzuführende Analytik mit der B-Probe dieselben strengen Vorschriften. Das Resultat der B-Probe muss dasjenige der A-Probe bestätigen, ansonsten die Probe als negativ beurteilt wird. Die Erfahrungen zeigen, dass bei korrekter Anwendung dieser Bestimmungen die Dopinganalytik ausserordentlich zuverlässig ist. Schwierigkeiten bieten aber, wie bei allen analytischen Bestimmungen, die Grenzbereiche der Nachweisbarkeit. Eine neue Arbeit, in der die Dopinganalytik nach statistischen Gesichtspunkten untersucht wird, bestätigt deren Zuverlässigkeit [39].

An der Eidgenössischen Sportschule Magglingen (ESSM) wurde seit den frühen siebziger Jahren zusammen mit dem Schweizerischen Landesverband für Sport (SLS) ein Dopinglabor betrieben. Dieses Labor erhielt seine Akkreditierung erstmals 1980. Die Zahl der verbotenen Substanzklassen wuchs aber in den Jahren 1984 bis 1988 von 3 auf 6 mit über 150 üblichen Wirkstoffen an. Zudem müssen heute verschiedenste Techniken der Spurenanalytik bei der Probenaufbereitung und -bestimmung beherrscht werden.

Die grosse Anzahl und Vielfalt der nachzuweisenden Substanzen setzt Kenntnisse voraus über deren

- Struktur
- Verweildauer im Organismus
- Wirkungsweise und Metabolismus
- Chemismus (Wechselwirkung mit der biologischen Matrix, Folgereaktionen, eventuelle Schutz- und Derivatisierungsmassnahmen)
- Chromatographisches und spektroskopisches Verhalten.

Diese gesteigerten Anforderungen sollten am Forschungsinstitut der ESSM erfüllt werden, ohne dass die entsprechenden personellen, finanziellen und instrumentellen Konsequenzen gezogen werden konnten. Die zusätzliche Einführung der GLP auf Januar 1989 veranlasste den Laborverantwortlichen in Absprache mit der ESSM und dem SLS, die Akkreditierung für das Jahr 1989 nicht mehr zu erneuern.

Im Interesse der Athleten wurde zusammen mit dem SLS, der die Analysenkosten trägt, eine Lösung mit dem renommierten Labor von Prof. M. Donike in Köln gefunden. Die schweizerischen Proben werden wie bisher nach Magglingen geliefert, von wo die A-Proben mittles Kurierdienst innert 24 Stunden ins Kölner Labor zur Analyse gesandt werden. Die B-Proben werden in Magglingen tiefgefroren und nur bei Bedarf nach Köln geliefert.

Das Labor in Köln hat die notwendigen Mittel, um neben der reinen Routineanalytik entsprechende Forschung auf dem Gebiet der Biochemie von Dopingsubstanzen durchzuführen. So wurden viele der heute in Dopinglabors verwendeten Analysenmethoden in Köln entwickelt [38]. Prof. Donike und seine Mitarbeiter konnten auch mittels Gaschromatographie-Massenspektroskopie zeigen, dass die Einnahme von Anabolika die Produktion von körpereigenen Steroidhormonen erniedrigt. Viele dieser Arbeiten wurden anhand von Proben bei Body-Buildern durchgeführt.

In der folgenden Abbildungen auf Seite 54 und 55 sind die gaschromatographisch-massenspektroskopischen Daten von zwei Proben aufgeführt, die im Rahmen der Schweizermeisterschaften 1988 von Body-Buildern in Magglingen analysiert wurden. Einerseits sind die Daten eines normalen Urins, andererseits diejenigen eines Body-Builders aufgeführt.
Es lassen sich dazu folgende Feststellungen machen:

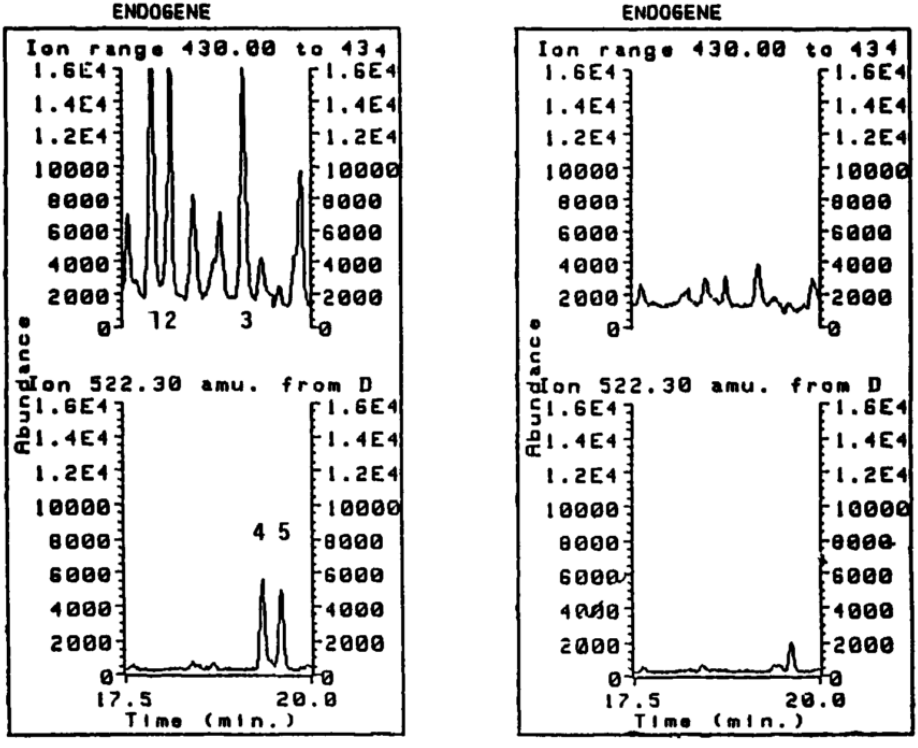
1. Der interne Standard (ISTD) ist bei beiden Proben gleich (Fläche, Retentionszeit), was auf eine fehlerfreie Analytik hinweist.

2. Die körpereigenen Steroidhormone Testosteron und Epitestosteron sind im normalen Urin unauffällig (Intensitätsskala links vom Chromatogramm und Signal zu Rauschverhältnis) und im Verhältnis von ungefähr 1:1 vorhanden. Beim Urin des Body-Builders sind nur noch Spuren zu sehen (Intensitätsskala, Signal zu Rauschverhältnis) und das Verhältnis von Testosteron zu Epitestosteron ist knapp 6:1.

3. Die körpereigenen anderen Steroidhormone sind bei der normalen Probe deutlich erkennbar, bei derjenigen des Body-Builders verschwinden die Signale fast im Untergrund.

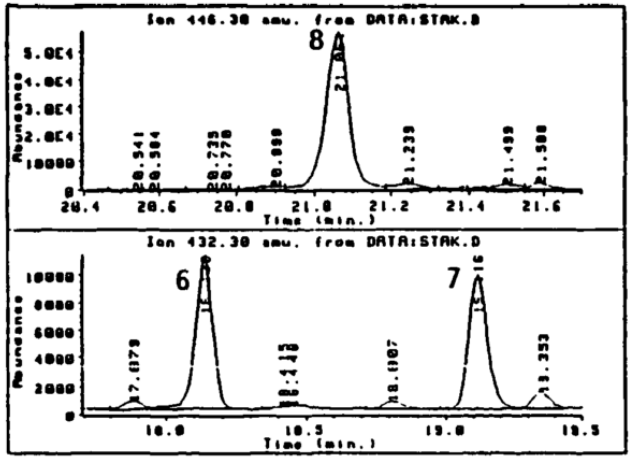
Es muss betont werden, dass bei dieser Body-Builder Probe keine verbotenen Substanzen nachgewiesen werden konnten. Das Verhältnis von Testosteron zu Epitestosteron war nur knapp 6 (in derartigen Fällen muss die Probe mehrmals aufgearbeitet und analysiert werden, um statistische Aussagen über den Vertrauensbereich der Analytik zu erhalten) und wegen des kleinen Signal zu Rauschverhältnisses mit zu grossen Schwankungen behaftet. So musste die Probe als negativ gegeben werden, obwohl mit Sicherheit gesagt werden konnte, dass hier Anabolika angewendet, aber rechtzeitig vor dem Wettkampf abgesetzt wurden. Beobachtbar waren lediglich noch die Auswirkungen auf das körpereigene Hormonsystem.

"Normalperson" Body-Builder

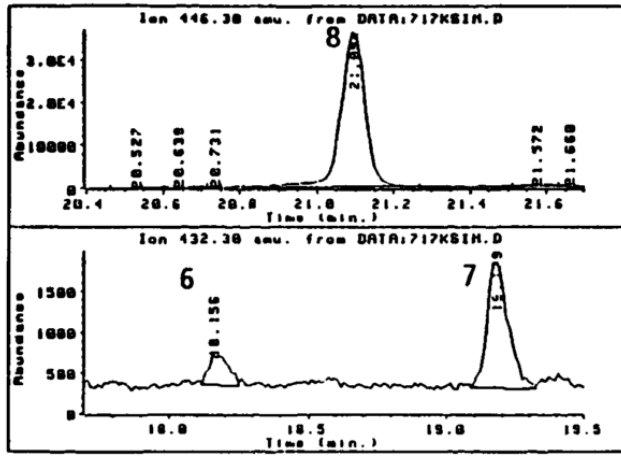


1: cis-Androsteron 2: Etiocholanolon 3: Dehydroepiandrosteron
4: 11b-Hydroxiandrosteron 5: 11b-Hydroxietiocholanolon

Beispiel einer gaschromatographisch-massenspektroskopischen Bestimmung von Steroidhormonen im Urin. Auf der linken Seite sind die Resultate eines "Normalurins", rechts diejenigen eines Body-Builders aufgezeigt. Die Ausschnitte zeigen jeweils einige endogene Hormone. Der Urin des Body-Builders zeigt deutlich erniedrigte Konzentrationen an endogenen Hormonen.



"Normal-person"



Body-builder

6: Epitestosteron 7: Testosteron

8: interner Standard (ISTD)

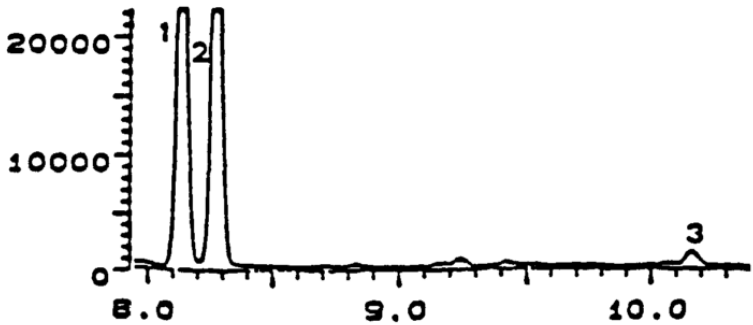
Diese Abbildung zeigt die Bereiche des internen Standards sowie von Epitestosteron und Testosteron derselben Urine wie auf Seite 54 ("Normalurin" oben, Urin des Body-Builders unten). Der Urin des Body-Builders weist eindeutig erniedrigte Konzentrationen an Testosteron und Epitestosteron auf.

Nach Arbeiten von Prof. Donike [16, 40] sind insbesondere die Konzentrationsverhältnisse von körpereigenen Steroidhormonen untereinander gute Hinweise, ob ein Anabolikamissbrauch vorliegt. So ist zum Beispiel das Verhältnis von cis-Androsteron zu Etiocholanolon normalerweise um eins. Bei Anabolikamissbrauch sinken nicht nur die Konzentrationen, sondern nach Absetzen der Anabolika erholt sich die Produktion von Etiocholanolon rascher als diejenige von cis-Androsteron, was eine Art "Dacheffekt" ergibt. Dieser kann teilweise bis 5 Monate nach Absetzen von Anabolika noch nachgewiesen werden.

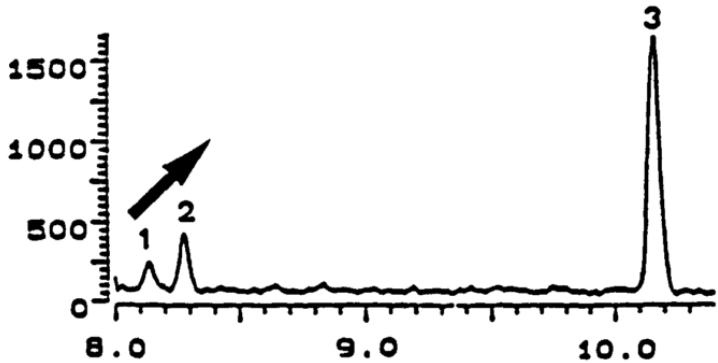
Derartige Überlegungen spielten in Seoul 1988 bei der Probe von Ben Johnson eine Rolle, da dank dem erniedrigten Steroidprofil und der charakteristischen Konzentrationsverhältnisse ausgesagt werden konnte, dass er über längere Zeit grössere Dosen Anabolika verwendet hatte. Die anschliessenden Untersuchungen und Aussagen in Kanada belegten diesen analytischen Befund. Zudem konnten Verdächtigungen und Sabotagegerüchte damit widerlegt werden.

In der Abbildung auf Seite 57 ist ein derartiger "Dacheffekt" aufgezeigt, wobei es sich oben um einen "Normalurin" und unten um einen Urin eines Body-Builders handelt [nach 16]. Zu beachten ist, dass der interne Standard (ISTD) in beiden Proben die gleiche Konzentration aufweist, die Intensitätsskala aber aus Demonstrationsgründen unten verstärkt wurde.
In der Tabelle auf Seite 58 sind die Konzentrationen und Quotienten von körpereigenen Steroidhormonen für eine "Normalprobe" (standardisierter Referenzurin nach Donike), einen Athleten nach rechtzeitigem Absetzen von Stanozolol (negativ in der Dopingkontrolle) und einen Body-Builder, der nach Injektion von hohen Dosen zweier Veterinärprodukte (Boldenon und Trenbolon) in ärztliche Behandlung musste, aufgeführt. Es ist deutlich erkennbar, dass neben der Erniedrigung der Hormonkonzentration auch eine Veränderung der Konzentrationsverhältnisse auftritt.

"Normalperson"



Body-Builder



Gaschromatographisch-massenspektroskopische Bestimmung von endogenem cis-Androsteron (1) und Etiocholanolon (2). Oben ein "Normalurin", unten derjenige eines Body-Builders nach Absetzen von Anabolika. Die Konzentration des internen Standards (3) ist in beiden Proben gleich. Deutlich sichtbar sind einerseit die erniedrigten Konzentrationen, sowie der "Dacheffekt" zwischen cis-Androsteron und Etiocholanolon bei der Body-Builder Probe (nach Donike [16]).

Endogene Steroide	Konzentrationen in ng/ml Urin		
	A	B	C
Methyltestosteron (ISTD)	100.0	100.0	100.0
cis-Androsteron	2000.0	333.2	171.0
Etiocholanolon	2000.0	1398.6	98.3
3α-5α-Androstandiol	80.0	14.2	5.0
3α-5ß-Androstandiol	120.0	44.2	8.1
Dehydroepiandrosteron	800.0	20.8	16.1
Epitestosteron	40.0	17.4	1.8
Testosteron	40.0	13.1	4.4
11ß-Hydroxiandrosteron	1000.0	50.5	75.6
11ß-Hydroxietiocholanolon	400.0	166.5	12.1
Quotienten	**A**	**B**	**C**
cis-Androst./Etiochol.	1.00	0.24	1.74
3α-5α-/3α-5ß-Androstandiol	0.67	0.32	0.62
Testosteron/Epitestosteron	1.00	0.75	2.44
11ß-Hydroxiandrosteron/ 11ß-Hydroxietiocholanolon	2.50	0.30	6.25

A) Eingewogene Referenzsubstanzen (entsprechen den Konzentrationen eines "Normalurins")
B) Sportler nach rechtzeitigem Absetzen von Stanozolol (negatives Dopingresultat)
C) Body-Builder nach erstmaligem Verwenden von Anabolika (Injektion von Boldenon und Trenbolon, beides Veterinärpräparate)

Einfluss von Anabolikamissbrauch auf die endogene Hormonproduktion (die Messungen wurden 1988 im Labor von Prof. M. Donike, Köln, durchgeführt).