

Analytik der Clenbuterolenantiomere als Beitrag zur Anti-Doping Forschung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Franz Liebetrau
aus Berlin

2015

Die vorliegende Arbeit wurde von 2012 bis 2015 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Maria Kristina Parr am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Maria Kristina Parr
2. Gutachter: Prof. Dr. Charlotte Kloft

Disputation am 11.04.2016

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Maria Kristina Parr für die Überlassung des interessanten und vielfältigen Themas, ihre Diskussionsbereitschaft und die mir gewährte Freiheit bei der Bearbeitung dieser Dissertation.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der Welt-Anti-Doping Agentur als Finanzier des Projektes (WADA 11A18SS und WADA 13D23SS), beim Kooperationspartner RIKILT Wageningen UR für die Zusammenarbeit, beim Laboratoire suisse d'analyse du dopage für die Bereitstellung der Rückstellmuster und beim Institute of Sport der Universität Warschau für die Durchführung der Applikationsstudie.

Ich bedanke mich darüber hinaus insbesondere bei Herrn Dipl.-Ing. Alexander H. Schmidt und Herrn Mijo Stanic für ihre Unterstützung und die gewährten Messzeiten bei der Analytik der Urinproben, bei Herrn Dr. Andreas Springer für die Ermöglichung der Analytik der Arzneimittel in der Core-Facility und bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Wolber für den Zugang zur HP 1100.

Bei Frau Heike Scheffler bedanke ich mich für Ihre Unterstützung bei den HPLC-Messungen. Für seine ständige Hilfsbereitschaft, wertvolle Diskussionen, Hilfe bei Problemen mit der HPLC und vor allem für die schöne Zeit im Praktikum sei Herrn Dr. Thomas Schulze an dieser Stelle mein kameradschaftlicher Dank ausgesprochen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Doping.....	4
2.2 Clenbuterol.....	6
2.2.1. Clenbuterol – Pharmakokinetik.....	7
2.2.2 Clenbuterol - Pharmakodynamik	9
2.3 Überkritische Fluidchromatographie.....	14
2.3.1 Physikalische Grundlagen und chromatographische Einordnung	14
2.3.2 Praktische Aspekte	19
2.3.3 Instrumenteller Aufbau	22
2.4 Enantiomerentrennung	24
2.4.1 Racematspaltung	24
2.4.2 Chirale Chromatographie	25
2.4.2.1 Chirale stationäre Phasen.....	26
2.4.2.1.1 Pirklephasen.....	26
2.4.2.1.2 Polysaccharidphasen.....	27
2.4.2.1.3 Cyclodextrin- und Glycopeptid-Antibiotika-Phasen	29
3 Ergebnisse und Diskussion.....	31
3.1 Methodenentwicklung zur Bestimmung der Clenbuterolenantiomere in.....	
Arzneimitteln und Schwarzmarktpräparaten	31
3.1.1 Vorversuche	31
3.1.2 Methodvalidierung	34
3.1.2.1 Richtigkeit und Präzision.....	34
3.1.2.2 Wiederfindung	36
3.1.2.3 Linearität.....	37
3.1.2.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	39
3.1.2.5 Spezifität	39
3.1.2.6 Fazit zur Methodenentwicklung für Arzneimittel.....	41
3.2 Anwendbarkeit von HPLC-Modellingssoftware zur Robustheitsprüfung chiraler Trennungen.....	42

3.3 Analyse von Arzneimitteln und Schwarzmarktprodukten	56
3.4 Bestimmung der Clenbuterolenantiomere in Humanurin.....	62
3.4.1 Vorversuche und Entwicklung einer geeigneten Extraktionsmethode.....	62
3.4.2 Methodvalidierung und Vergleich von SFC und HPLC	64
3.4.2.1 Richtigkeit und Präzision.....	65
3.4.2.2 Wiederfindung	68
3.4.2.3 Linearität.....	69
3.4.2.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze	71
3.4.2.5 Spezifität	71
3.4.2.6 Probenstabilität während der Lagerung	73
3.4.2.7 Fazit zur Methodenentwicklung für Urinproben	77
3.5 Applikationsstudien.....	78
3.5.1 Rückstellmuster einer vorausgegangenen Applikationsstudie	78
3.5.2 Applikationsstudie Warschau	81
4 Zusammenfassung und Ausblick.....	92
5 Summary and Outlook.....	94
6 Material und Methoden	96
6.1. Chemikalien	96
6.2 Geräte und Software.....	97
6.2.1 Urinanalytik	97
6.2.2 Präparateanalytik.....	98
6.2.3 Sonstige Geräte und Software.....	99
6.3 Modellierung chiraler Trennungen mittels DryLab®	100
6.4 Probenvorbereitung	101
6.4.1 Probenvorbereitung Urin mittels Extrelut® NT 3.....	101
6.4.2 Probenvorbereitung Urin mittels LLE	102
6.4.3 Probenvorbereitung Urin mittels Isolute® SLE+ 2ml Kartuschen	103
6.4.4 Probenvorbereitung Urin mittels SupelMIP® Kartuschen	103
6.4.5 Probenvorbereitung Präparate.....	103
6.5 Methoden zur Validierung der Urin- und Präparateanalytik.....	105

6.5.1 Richtigkeit und Präzision	105
6.5.1.1 Präparateanalytik	105
6.5.1.2 Urinanalytik	105
6.5.2 Wiederfindung	106
6.5.2.1 Präparateanalytik	106
6.5.2.2 Urinanalytik	106
6.5.3 Linearität	106
6.5.3.1 Präparateanalytik	106
6.5.3.2 Urinanalytik	106
6.5.4 Spezifität	107
6.5.4.1 Präparateanalytik	107
6.5.4.2 Urinanalytik	107
6.5.5. Nachweis und Bestimmungsgrenze Urin	107
6.5.6 Probenstabilität der Urinproben während der Lagerung	107
6.6 Durchführung der Applikationsstudie	109
6.7 Durchführung der Präparateanalytik	110
6.8 Formeln und statistische Auswertung	112
7 Anhang	114
7.1 Abkürzungsverzeichnis	114
7.2 Abbildungsverzeichnis	118
7.3 Tabellenverzeichnis.....	121
7.4 Literaturverzeichnis.....	123
7.5 Publikationen	130
7.6 Genehmigung, Probandeneinweisung und Sammelprotokolle.....	131
7.7 Tabellarische Übersicht zur Analyse der Rückstellmuster	147
7.8 Selbständigkeitserklärung	148
8 Lebenslauf	149

1 Einleitung und Zielsetzung

Der in dieser Arbeit untersuchte Arzneistoff Clenbuterol [(RS)-1-(4-Amino-3,5-dichlorphenyl)-2-(tert-butylamino)-ethanol] ist als langwirksames β_2 -Sympathikomimetikum in der Human- und Veterinärmedizin zur Behandlung obstruktiver Atemwegserkrankungen zugelassen, in der Veterinärmedizin darüber hinaus auch als Tokolytikum. Neben seiner therapeutisch genutzten bronchodilatierenden Wirkung weist Clenbuterol allerdings auch anabole [1–3] und lipolytische Eigenschaften [4,5] auf.

Eine missbräuchliche Einnahme ist demzufolge geeignet, die sportliche Leistungsfähigkeit eines Athleten zu steigern. Die Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA) führt Clenbuterol daher in der „Prohibited List“, einer Liste im Sport verbotener Substanzen und Methoden.

Ebenfalls illegal ist in der Europäischen Union [6], den USA [7] und China [8] der Einsatz von Clenbuterol zu Zwecken der Wachstumsbeschleunigung und Fettreduktion in der Tiermast. Trotzdem sind weltweit zahlreiche Fälle beschrieben, bei denen es infolge von Fleischverzehr teilweise sogar zu Intoxikationserscheinungen gekommen ist (Tabelle 1).

Land	Jahr	Quelle	Referenz
Italien	1995	Rindersteak	[9]
	1997	Kalbsfleisch	[10]
Spanien	1990	Rinderleber	[11]
	1992	Kalbsleber	[12]
Portugal	1998	Lammfleisch	[13]
	2000	Rinderleber	[13]
	2001	Rinderleber	[13]
	2002	Rindfleisch	[13]
Frankreich	1990	Kalbsleber	[14]
Mexiko	2011	Genaue Quelle unbekannt	[15]
China	2006	Schweinefleisch	[16]
	2008	Schweinefleisch	[16]
	2009	Schweinefleisch	[16]

Tabelle 1: Fallberichte über das Auftreten clenbuterolkontaminierter Lebensmittel

Problematisch wird es, wenn eine positive Dopingkontrollprobe für Clenbuterol vom betroffenen Athleten mit dem Verzehr von verunreinigtem Fleisch erklärt wird, da momentan keine Methode zur Verfügung steht, die Rückschlüsse auf die Quelle des Clenbuterols (Arzneimittelmissbrauch oder Verzehr belasteten Fleisches) zulässt. Solch eine unbeabsichtigte Aufnahme von Clenbuterol könnte, im Gegensatz zum

Arzneimittelmissbrauch, zugunsten des Sportlers ausgelegt werden. Die Problematik clenbuterolkontaminierter Nahrungsmittel reicht inzwischen so weit, dass sich die Nationale Anti-Doping Agentur Deutschland (NADA) veranlasst sah, eine Warnung an die Athleten zu veröffentlichen, in der vor dem Verzehr von Fleisch in den Ländern China und Mexiko gewarnt wurde [17].

Für Aufsehen sorgten in den letzten Jahren u.a. die Fälle des Radprofis Alberto Contador während der Tour de France 2010, des Tischtennisspielers Dimitrij Ovtcharov während der China Open 2010 sowie insgesamt 109 positive Dopingkontrollproben auf Clenbuterol im Rahmen der U-17 Fußballweltmeisterschaft in Mexiko im Jahr 2011. Während im letztgenannten Fall Lebensmittel als ursächlich für die Flut an positiven Testergebnissen ausgemacht werden konnten, blieb die genaue Quelle des Clenbuterols in den Fällen Contador und Ovtcharov unbekannt. Sportrechtlich endeten die beiden Angelegenheiten dagegen sehr konträr: Ovtcharov wurde freigesprochen, Contador mit zweijähriger Sperre belegt. Wünschenswert wäre also eine analytische Methode, die in der Lage ist, anhand der Dopingkontrollprobe Rückschlüsse auf die Herkunft des Clenbuterols zu ziehen.

Da sich in tierischen Geweben die Enantiomerenzusammensetzung offenbar von dem in Arzneimitteln eingesetzten Racemat aus R-(-)- und S-(+)-Clenbuterol zugunsten eines der beiden Enantiomere verschiebt [18–20], beim Menschen allerdings nach Applikation racemischen Clenbuterols keine Enantiomerendiskriminierung im Urin beobachtet wurde [21], könnte die Möglichkeit bestehen, über eine Analytik des Enantiomerenverhältnisses im Urin des betroffenen Sportlers die Quelle des Clenbuterols zu identifizieren, vorausgesetzt die Enantiomere unterliegen im Menschen keiner Racemisierung.

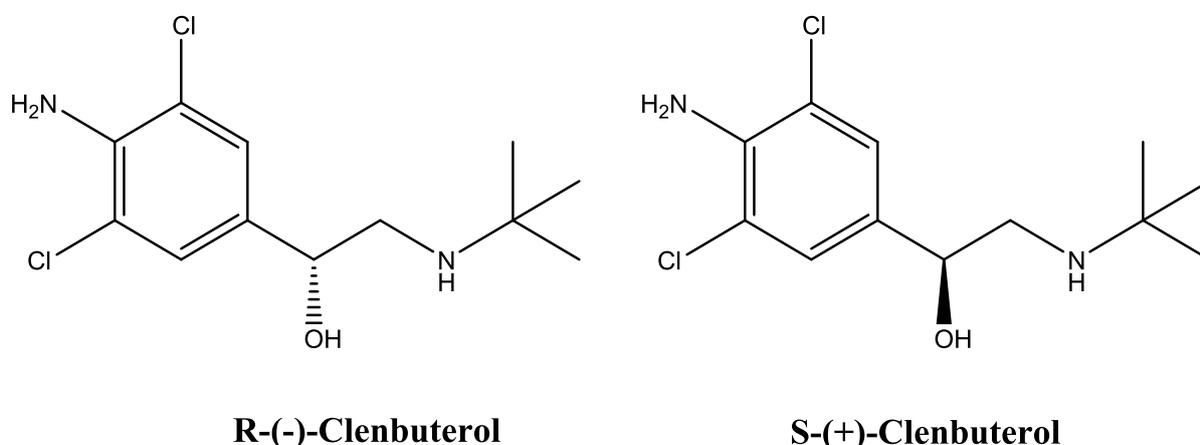


Abbildung 1: Strukturformeln der Clenbuterolenantiomere

Vor diesem Hintergrund war es Zielsetzung dieser Arbeit, Methoden zur Bestimmung der Verhältnisse der beiden Clenbuterolenantiomere (Abbildung 1) einerseits in Fertigarzneimitteln bzw. clenbuterolhaltigen Schwarzmarktpräparaten (zur Bestätigung ihrer racemischen Zusammensetzung) und andererseits im menschlichen Urin zu entwickeln und die Möglichkeit einer Diskriminierung zwischen den genannten Clenbuterolquellen über eine Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse im Urin zu untersuchen (Abbildung 2). Dazu sollte der Anteil des S-Enantiomers an der Gesamtmenge Clenbuterol bestimmt werden.

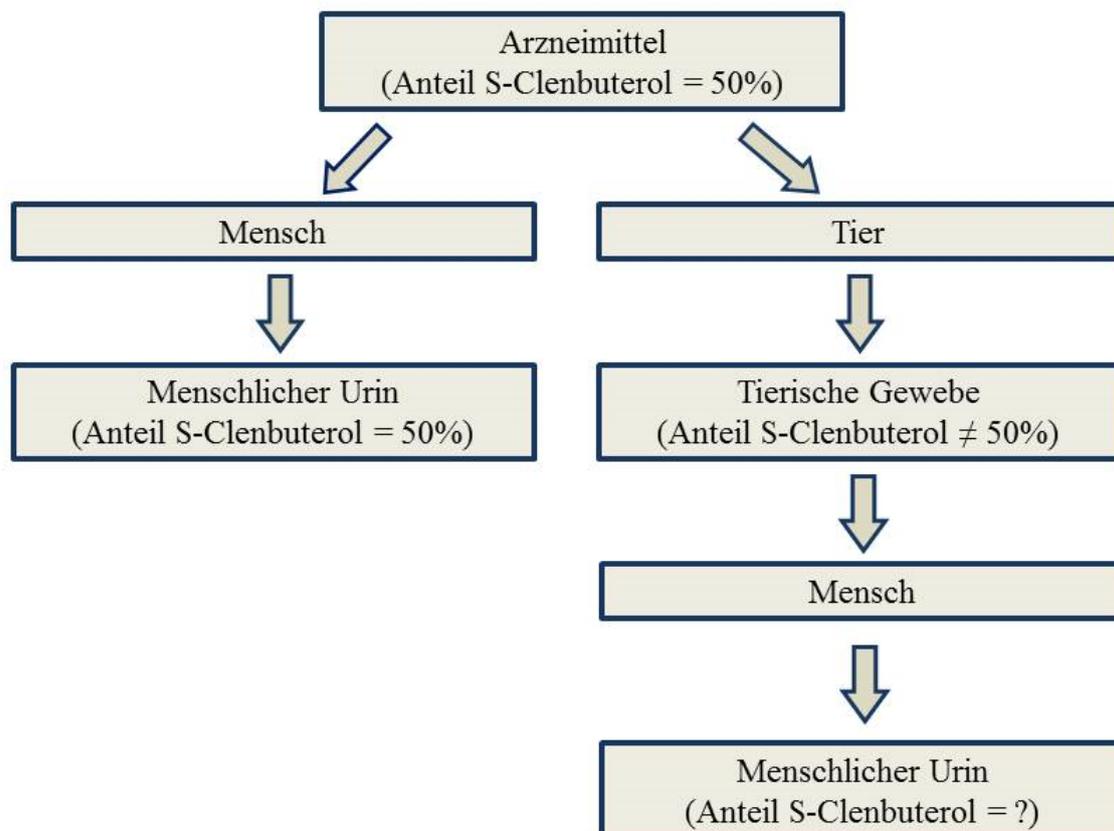


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Fragestellung dieser Arbeit

In diesem Zusammenhang sollten auch die Möglichkeiten einer neu verfügbaren Generation analytischer Superkritischer Fluidchromatographischer Systeme (SFC) im Vergleich zu etablierten Verfahren (HPLC) eruiert werden. Eine Analytik der Enantiomerenverhältnisse in tierischen Geweben wurde vom Kooperationspartner RIKILT Wageningen UR (Niederlande) durchgeführt und ist daher nicht Gegenstand der vorliegenden und von der Welt-Anti-Doping Agentur im Rahmen der Projekte WADA 11A18SS und WADA 13D23SS finanzierten Arbeit.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Doping

Der Begriff „Doping“ stammt ursprünglich aus dem Afrikaans und leitet sich von einem als „Dop“ bezeichneten alkoholhaltigen Getränk ab, das von der einheimischen Bevölkerung Südafrikas anlässlich verschiedener Feierlichkeiten konsumiert wurde. Von den Kolonialisten als Sammelbezeichnung für alle Getränke mit stimulierender Wirkung verallgemeinert, taucht das Wort zum ersten Mal 1889 in einem englischen Wörterbuch auf und bezeichnet die Verabreichung von Betäubungsmitteln an Rennpferde [22].

Der Versuch, die sportliche Leistungsfähigkeit mit Xenobiotika zu steigern, lässt sich dagegen bis ins Altertum zurückverfolgen. Galen und Philostratos beschreiben den Einsatz pflanzlicher Zubereitungen während der olympischen Spiele im alten Griechenland [23]. Plinius der Jüngere erwähnt im selben Zusammenhang eine Schachtelhalmzubereitung, die vor allem von Langstreckenläufern genutzt worden sein soll [24].

Erste Berichte über Doping in der Neuzeit lassen sich in die zweite Hälfte des 19. Jahrhunderts datieren. Vor allem in Ausdauersportarten, wie dem Schwimm- oder Radsport, war der Gebrauch von Stimulanzien offensichtlich weit verbreitet. Zum Einsatz kamen unter anderem Ethanol, Coffein, Kokain und Strychnin [23,25]. So wurde z.B. der Olympiasieg im Marathon 1904 in St. Louis durch den Briten Thomas Hicks unter Zuhilfenahme von Strychnin und Brandy erlaufen, mit allerdings beinahe tödlichem Ausgang [22]. Aufgrund der mit dem Arzneimittelmisbrauch verbundenen Gesundheitsrisiken und dem Wunsch nach fairen Wettkampfbedingungen kam es Anfang des 20. Jahrhunderts zu ersten Verbotsmaßnahmen bezüglich bestimmter Substanzklassen seitens einiger Sportverbände. So ergingen beispielsweise 1903 ein allgemeines Dopingverbot für Pferde durch den English Jockey Club und 1928 ein Verbot des Stimulanziengebrauchs durch die International Amateur Athletics Federation (IAAF, heute International Association of Athletics Federations) [25].

Traurige Berühmtheit erlangten während der 1960er Jahre die Todesfälle der Radrennfahrer Knud Jensen und Tom Simpson, die während laufender Wettkämpfe vor Erschöpfung kollabierten und verstarben. Als ursächlich erwies sich in beiden Fällen Amphetaminmissbrauch.

Als Reaktion berief das Internationale Olympische Komitee (IOC) 1967 eine Medizinische Kommission, die eine Liste von im Sport verbotenen Substanzen erarbeitete. Ein Jahr später

wurden in Mexico City zum ersten Mal Dopingkontrollen innerhalb Olympischer Spiele durchgeführt [26].

Das IOC definierte „Doping“ seinerzeit folgendermaßen: „Doping ist die Verwendung von Substanzen aus den verbotenen Wirkstoffgruppen und die Anwendung verbotener Methoden.“ Zusätzlich zur IOC-Definition existierten weitere Definitionen, z.B. vom Europarat oder vom Deutschen Sportbund, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll. Die verschiedenen Definitionen unterlagen im Laufe der Zeit z.T. auch Ergänzungen und Anpassungen, sodass eine globale Harmonisierung der Definition und vor allem auch des Kontrollsystems notwendig wurde. Zu diesem Zweck organisierte das IOC 1999 die erste Welt-Anti-Doping Konferenz, in deren Verlauf sich die Teilnehmer auf die Gründung einer Welt-Anti-Doping Agentur (WADA) verständigten. Die Zielsetzung der WADA geht aus dem von ihr erstellten Welt-Anti-Doping Code hervor, der die Grundlage des Welt-Anti-Doping Programms bildet. Der Code beinhaltet Maßnahmen gegen Doping zu koordinieren, zu harmonisieren und zu fördern, Dopingprävention zu betreiben und den Athleten eine Teilnahme an dopingfreiem Sport zu ermöglichen.

Im Welt-Anti-Doping Code ist auch die heute maßgebliche Definition des Begriffs „Doping“ enthalten. Da eine detaillierte Wiedergabe an dieser Stelle zu weit führen würde, sei auf den Welt-Anti-Doping Code in der jeweils gültigen Fassung verwiesen, der auf der Homepage der WADA (<http://www.wada-ama.org/>) eingesehen werden kann.

Für den in dieser Arbeit untersuchten Arzneistoff Clenbuterol kann ab dem Jahr 2009 ein deutlicher Anstieg der positiven Befunde, bei gleichzeitig rückläufigem Aufkommen an untersuchten A-Proben, konstatiert werden (Abbildung 3; Werte sind den Jahrestestberichten der WADA entnommen: <https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/anti-doping-testing-figures>; Zugriff am 15.9.2015). Da Clenbuterol analytisch leicht zugänglich und aufgrund seiner Eliminationshalbwertszeit von 34 Stunden auch sehr lange nach Applikation nachweisbar ist, bietet es sich eigentlich nicht als Dopingmittel der Wahl an. Dieser Sachverhalt mag ein Indiz für eine Zunahme der in der Einleitung geschilderten Problematik clenbuterolverunreinigter Lebensmittel sein.

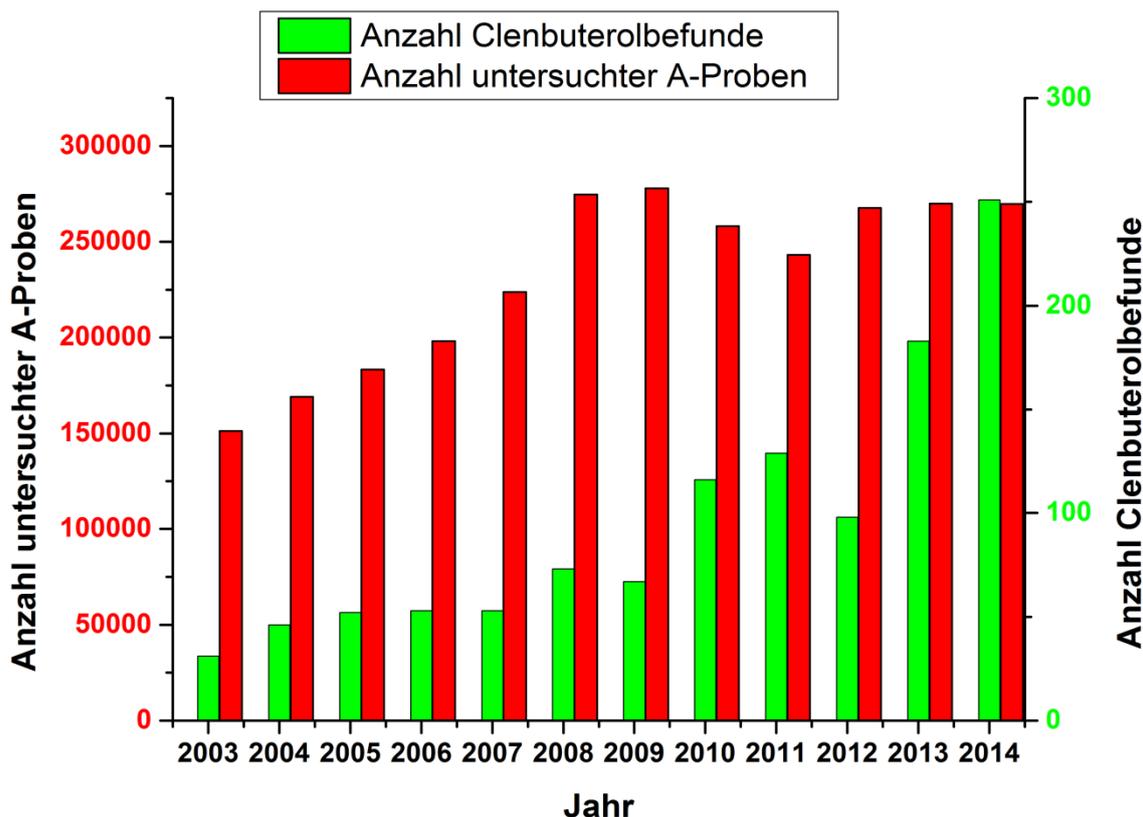


Abbildung 3: Jährliches Aufkommen untersuchter A-Proben und Clenbuterolbefunde

2.2 Clenbuterol

Der Wirkstoff Clenbuterol (in Arzneimitteln als Hydrochlorid vorliegend) gehört therapeutisch zur Gruppe der langwirksamen β_2 -Sympathikomimetika. Als solcher ist er in der Humanmedizin zur symptomatischen Behandlung chronisch entzündlicher bzw. obstruktiver Atemwegserkrankungen (z.B. Asthma bronchiale, obstruktive Bronchitis) zugelassen. Es befinden sich in Deutschland sowohl Monopräparate (Spiropent[®] Tabletten), als auch Kombinationspräparate mit dem Expektorans Ambroxolhydrochlorid (Spasmo-Mucosolvan[®] Tabletten und Spasmo-Mucosolvan[®] Saft) zur Behandlung o.g. Atemwegserkrankungen einhergehend mit Sekretstau im Handel.

Die Standarddosierung beträgt für Kinder ab 12 Jahren und Erwachsene dreimal täglich 20 μg Clenbuterolhydrochlorid in Form von Tabletten bzw. Saft, wobei die Dosis während der Behandlung auf zweimal täglich 10 μg Clenbuterolhydrochlorid gesenkt werden kann. Eine Tagesgesamtdosis von 100 μg Clenbuterolhydrochlorid sollte beim Erwachsenen nicht überschritten werden [27].

Darüber hinaus werden zahlreiche clenbuterolhaltige Zubereitungen unterschiedlicher Dosierungen zu Dopingzwecken auf dem Schwarzmarkt angeboten.

In der Veterinärmedizin findet Clenbuterol Verwendung zur Behandlung von Atemwegserkrankungen bei Pferden (Ventipulmin[®] Gel, Ventipulmin[®] Granulat und Venti Plus[®]) und als Tokolytikum für Rinder (Planipart[®] Injektionslösung). Hierbei handelt es sich, mit Ausnahme von Venti Plus[®], das zusätzlich das Expektorans Dembrexinhydrochlorid enthält, um Monopräparate, deren zu applizierende Einzeldosen beim Pferd üblicherweise 0,8 µg Clenbuterolhydrochlorid pro Kilogramm Körpergewicht zweimal täglich [28] und bei Rindern einheitlich, einmalig 300 µg betragen [29].

2.2.1. Clenbuterol – Pharmakokinetik

Clenbuterol zeichnet sich durch eine sehr hohe Bioverfügbarkeit aus. Beim Menschen wird es nach peroraler Applikation rasch und nahezu vollständig resorbiert, es ist kein nennenswerter First-Pass Effekt zu beobachten [27,30].

Nach peroraler Einmaldosis von 20 µg bzw. 40 µg Clenbuterolhydrochlorid werden nach ca. zweieinhalb Stunden maximale Plasmakonzentrationen von 0,1 ng/ml respektive 0,2 ng/ml erreicht. Die Steady State Konzentration wird nach vier Tagen Behandlungsdauer erreicht und beträgt für dreimal täglich 20 µg Einzeldosis 0,2-0,3 ng/ml Plasma [31].

Die Elimination erfolgt mit einer Halbwertszeit von 34 Stunden größtenteils in unveränderter Form (zu 87 %) über den Urin [27].

Beim Pferd wird Clenbuterol zu 80 % als Muttersubstanz renal eliminiert [32], die Eliminationshalbwertszeit ist mit ca. 13 Stunden allerdings wesentlich kürzer als beim Menschen [33].

Für die Spezies Hund sind zahlreiche Metaboliten identifiziert worden [34], die in Abbildung 4 dargestellt sind.

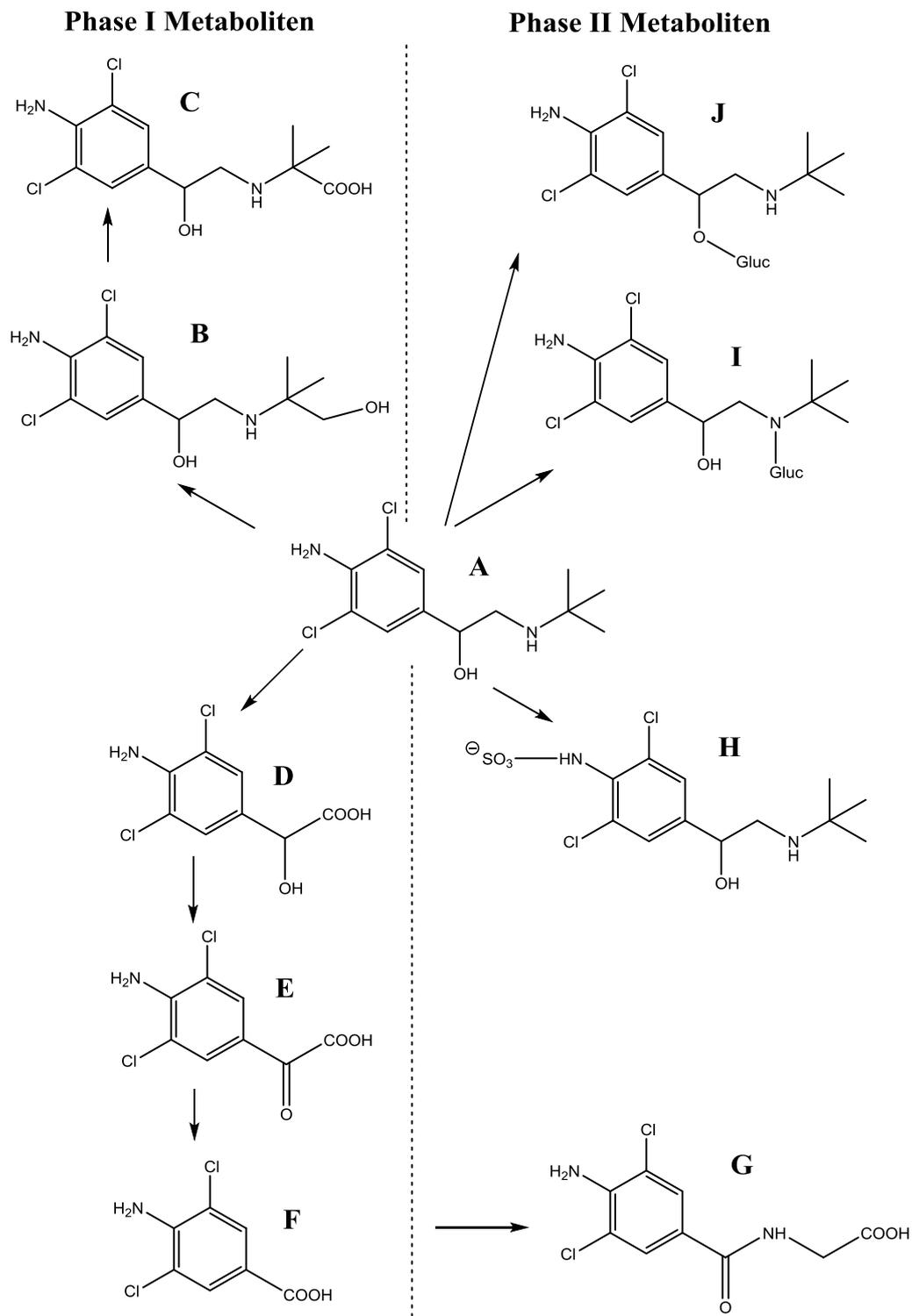


Abbildung 4: Metabolismus des Clenbuterols (A) beim Hund

Rinder scheiden die Hälfte des über die Nieren eliminierten Dosisanteils (80 %) in Form von Metaboliten aus. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 20 Stunden [29]. In Rinderurin konnten die Metaboliten **F**, **G** und **B** aus Abbildung 4 ausgemacht werden, wobei das Metabolitenprofil qualitativ dem des Menschen entspricht [34]. Untersuchungen mit

radiomarkiertem Clenbuterol legen nahe, dass die Geweberückstände im Rind hauptsächlich (90 %) aus unmetabolisiertem Clenbuterol bestehen [35].

In tierischen Geweben ist eine Anreicherung des S-Clenbuterols beschrieben. In der Literatur finden sich Angaben zu einem S-Clenbuterolanteil von ca. 73 % in Hühnerleber nach Verabreichung unterschiedlicher Clenbuterolmengen (racemisch) über einen Zeitraum von zwei Wochen ohne Auswaschphase vor der Schlachtung [20]. Bei Schweinen liegen Daten in Abhängigkeit der Gewebeart und der Länge der Auswaschphase nach Verabreichung einer festgesetzten Clenbuterolmenge (racemisch) über eine Woche vor. Dabei zeigten sich in Schweinelunge S-Clenbuterolanteile von 56 % bis 84 %, in Schweineniere von 57 % bis 84 % und in Schweineleber von 60 % bis 84 %. Für das Muskelfleisch von Schweinen ist ohne Auswaschphase ein S-Clenbuterolanteil von 55 % beschreiben [18].

Über die Enantiomerenzusammensetzung möglicher Clenbuterolrückstände in anderen tierischen Lebensmitteln (z.B. Milch oder Käse) liegen derzeit keine Erkenntnisse vor.

2.2.2 Clenbuterol - Pharmakodynamik

Es soll in dieser Arbeit näher auf die Pharmakodynamik des Clenbuterols, insbesondere auf die anabolen und lipolytischen Wirkmechanismen eingegangen werden, die maßgeblich seine eingangs erwähnte missbräuchliche Verwendung im Sport, zur Gewichtsreduktion und in der Tiermast bedingen.

Clenbuterol wirkt als Agonist am β_2 -Adrenorezeptor und wurde therapeutisch als langwirksames β_2 -Symphatomimetikum zur Behandlung obstruktiver Atemwegserkrankungen, v.a. des Asthma bronchiale, entwickelt. Nach peroraler Einnahme setzt die bronchodilatierende Wirkung nach ca. 5-20 Minuten ein und hält bis zu 14 Stunden an [27]. Verwendung in Arzneimitteln findet das Racemat aus R(-)- und S(+)-Clenbuterol, wobei es sich beim R(-)-Enantiomer um das Eutomer handelt [36].

Wie bei allen Adrenorezeptoren handelt es sich auch beim β_2 -Rezeptor um einen G-Protein (guaninnukleotidbindende Proteine) gekoppelten Rezeptor, der über sieben α -Helices in die Zellmembran eingebettet ist und je drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen aufweist [37]. Heterotrimere G-Proteine sind die Umschaltstelle zwischen membranständigen Rezeptoren und ihrem jeweiligen second messenger, einer spezifischen intrazellulären Substanz, deren Cytoplasmakonzentration sich infolge der Aktivierung des Rezeptors verändert.

Funktionell besteht ein heterotrimeres G-Protein als Komplex aus je einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit (UE), wobei die α -Untereinheit eine Bindungstasche für Guanosindiphosphat (GDP) bzw. Guanosintriphosphat (GTP) aufweist und die beiden anderen Untereinheiten ein Dimer bilden. Mittlerweile sind von jeder Untereinheit zahlreiche Isoformen bekannt, sodass sich unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten aus α -, β - und γ -Untereinheiten ergeben und somit eine Diversität in der Signaltransduktion sichergestellt ist [38,39].

Bei Rezeptoraktivierung kommt es infolge einer Konformationsänderung des Rezeptors zu einer Wechselwirkung zwischen G-Protein und Rezeptor, in deren Verlauf das von der α -Untereinheit gebundene GDP gegen GTP ausgetauscht wird und sich die α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Dimer löst. Sowohl die α -Untereinheit als auch das $\beta\gamma$ -Dimer sind in der Lage, weitere intrazelluläre Signalkaskaden auszulösen. Die α -Untereinheiten können in vier Unterfamilien eingeteilt werden: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12}$.

Neben der schon länger bekannten $G\alpha_s$ -Kopplung des β_2 -Rezeptors hat sich mittlerweile die Erkenntnis durchgesetzt, dass in einigen Geweben auch eine Kopplung mit $G\alpha_i$ -Proteinen existiert [40–42].

Der Second Messenger für die $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ vermittelte Signaltransduktion ist cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), das aus Adenosintriphosphat (ATP) durch Katalyse von Adenylatzyklasen gebildet wird. Derzeit sind beim Menschen zehn Isoformen der Adenylatzyklase identifiziert, die sich in ihrem Vorkommen in verschiedenen Geweben und im Ansprechverhalten auf weitere koregulatorische Faktoren unterscheiden. Generell trifft aber zu, dass die Tätigkeit der Adenylatzyklasen durch $G\alpha_s$ -Proteine stimuliert und durch $G\alpha_i$ -Proteine inhibiert wird, entsprechend steigt bzw. fällt intrazellulär die cAMP Konzentration.

cAMP wiederum aktiviert Proteinkinasen vom Typ A (PKA), die ihrerseits weitere Zielproteine durch Phosphorylierung regulieren. Die Tatsache, dass es sich bei Typ A Proteinkinasen um Heterotetramere aus je zwei R- und zwei C-Untereinheiten, von denen ebenfalls verschiedene Isoformen bzw. Typen beschrieben sind, handelt, lässt die ganze Komplexität bzw. Diversität der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion erahnen. Die nun folgenden Ausführungen zu den Wirkmechanismen des Clenbuterols in diversen Geweben verstehen sich in diesem Kontext als Zusammenfassung des gegenwärtigen Forschungsstands. Zum Verständnis dieser molekularen Wirkmechanismen sind vor allem zwei Dinge ausschlaggebend: Erstens das Ausmaß der Exprimierung des β_2 -Rezeptors in verschiedenen Geweben und zweitens die gewebespezifische Kopplung des Rezeptors an unterschiedliche G-Proteine.

β_2 -Rezeptoren befinden sich in hohem Maß in der glatten Muskulatur von Darm, Uterus, Gefäßen und Bronchien. In der glatten Muskulatur führt eine Aktivierung von β_2 -Rezeptoren über G_{α_s} und PKA zu einer Aktivierung weiterer Zielproteine (Abbildung 5), infolgedessen es u.a. zu einem Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und zu einer Hemmung der Myosin-light-chain-kinase (MLCK) über Aktivierung der PKA kommt [43,44]. Beides führt zu einem Abfall des Muskeltonus. Dieser Mechanismus bedingt die therapeutische Verwendung von Clenbuterol zur Behandlung obstruktiver Lungenerkrankungen und zusätzlich als Tokolytikum in der Veterinärmedizin (Planipart®). Für diese Indikation ist in der Humanmedizin nur der β_2 -Agonist Fenoterol (Partusisten®) zugelassen.

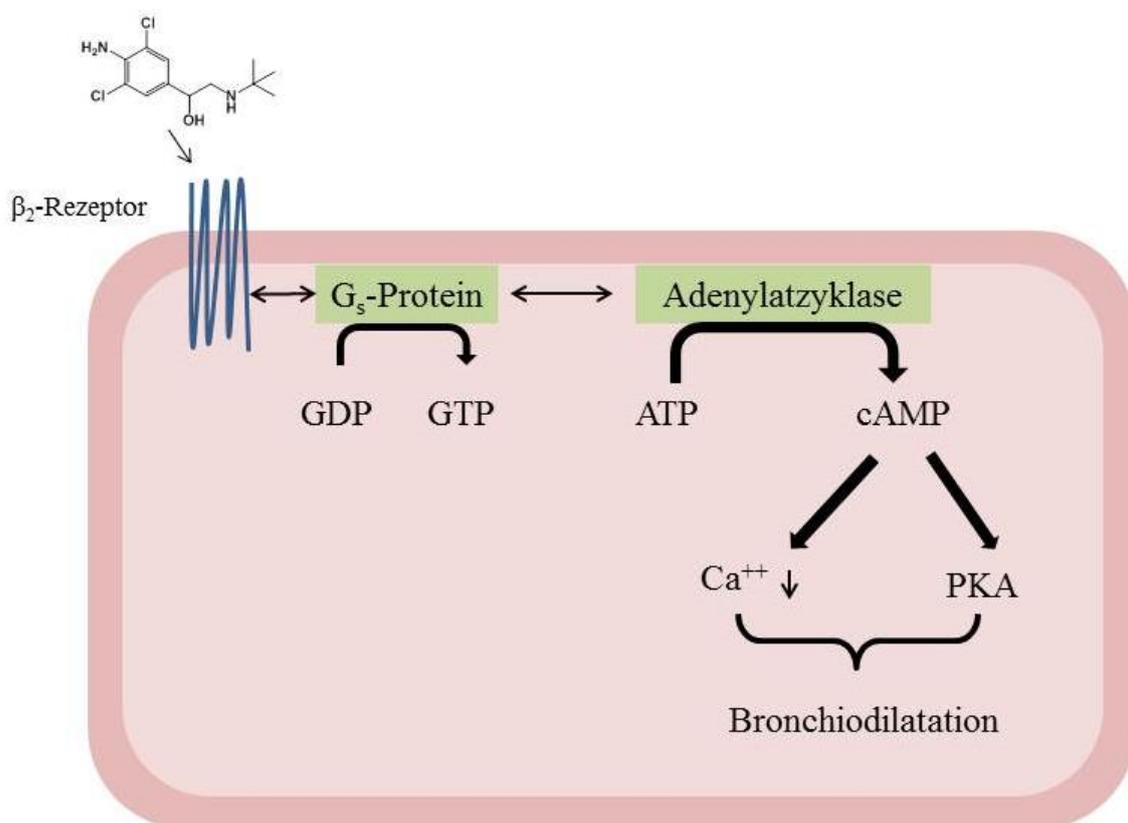


Abbildung 5: G_{α_s} -vermittelte Bronchodilatation, ausgelöst durch Clenbuterol

Im Skelettmuskel dominiert mit einem Anteil von ca. 90 % ebenfalls der β_2 -Subtyp gegenüber dem β_1 -Rezeptor [45].

Lange Zeit war über die Gründe für die anabole Wirkung der β_2 -Sympathikomimetika nur sehr wenig bekannt und auch heute noch besteht hier weiter Aufklärungsbedarf. Mittlerweile kann aber davon ausgegangen werden, dass die anabolen Effekte auf unterschiedlichen Wegen auch β_2 -rezeptorvermittelt sind. Zum einen lässt sich die clenbuterolinduzierte

Muskelhypertrophie mit dem β_2 -Antagonisten ICI 118551 unterbinden [46], zum anderen bleibt die anabole Wirkung bei β_2 -Rezeptor-knock-out-Mäusen aus [47].

Die $G\alpha_s$ -induzierte Aktivierung der PKA führt zur Phosphorylierung weiterer Zielproteine. Als eines dieser Proteine wurde das cAMP response element binding protein (CREB) identifiziert, ein Transkriptionsfaktor, der an definierte DNA-Sequenzen (cAMP response elements, CRE) bindet und somit die Transkription diverser Gene beeinflusst [48]. Unter anderem wird die Expression des neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) gesteigert [49]. Die Hemmung der NOR1-mRNA mittels siRNA wiederum führte *in vitro* zu einem drastischen Anstieg der Myostatin mRNA [50]. Myostatin ist ein Vertreter der transforming growth factor β (TGF- β)-Familie und hemmt das Muskelwachstum [51,52]. Clenbuterol nimmt wahrscheinlich indirekt über NOR1 Einfluss auf den Myostatin Spiegel und somit auch auf das Muskelwachstum.

Darüber hinaus scheint im Skelettmuskel zum Teil auch eine $G\alpha_i$ -Kopplung des β_2 -Rezeptors zu bestehen [40–42], wobei in diesem Fall auch dem $G_{\beta\gamma}$ -Dimer eine tragende Rolle für die anabole Wirkung des Clenbuterols zukommt. Untersuchungen haben gezeigt, dass das $G\alpha_i$ -assoziierte $G_{\beta\gamma}$ -Dimer in der Lage ist, via Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), den AKT/m-Tor Signalweg (Abbildung 6) zu aktivieren [53,54]. Dieser mündet durch Anregung der p70 ribosomal protein S6 kinase (p70^{S6K}) in gesteigerter Expression ribosomaler Proteine [55,56]. Gleichzeitig hemmt m-Tor das eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1 (4E-BP1), selbst ein Inhibitor der Proteintranslation [57]. Untersuchungen an clenbuterolbehandelten Ratten zeigten gesteigerte p70^{S6K} und reduzierte 4E-BP1 Aktivität [58].

Da der AKT/m-Tor Signalweg eine Rolle in der Regulation des Muskelwachstums spielt [59], war es auch möglich die anabolen Effekte des Clenbuterols mittels Rapamycin, einem m-Tor-Hemmstoff, zu antagonisieren (Abbildung 6) [60].

Neben der Aktivierung von m-Tor ist AKT auch in der Lage direkt einige forkhead box O transcription factors (FOXO) zu inhibieren [61,62]. FOXO ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription der Gene MuRF1 (Muscle RING finger 1) und MAFbx (muscle atrophy F-box) fördert. MuRF1 und MAFbx codieren für Ubiquitinligasen, deren Expression bei Muskelatrophie gesteigert ist [59,63]. Somit kann bei einer β_2 -Aktivierung am Skelettmuskel auch von einem muskelprotektiven Effekt ausgegangen werden.

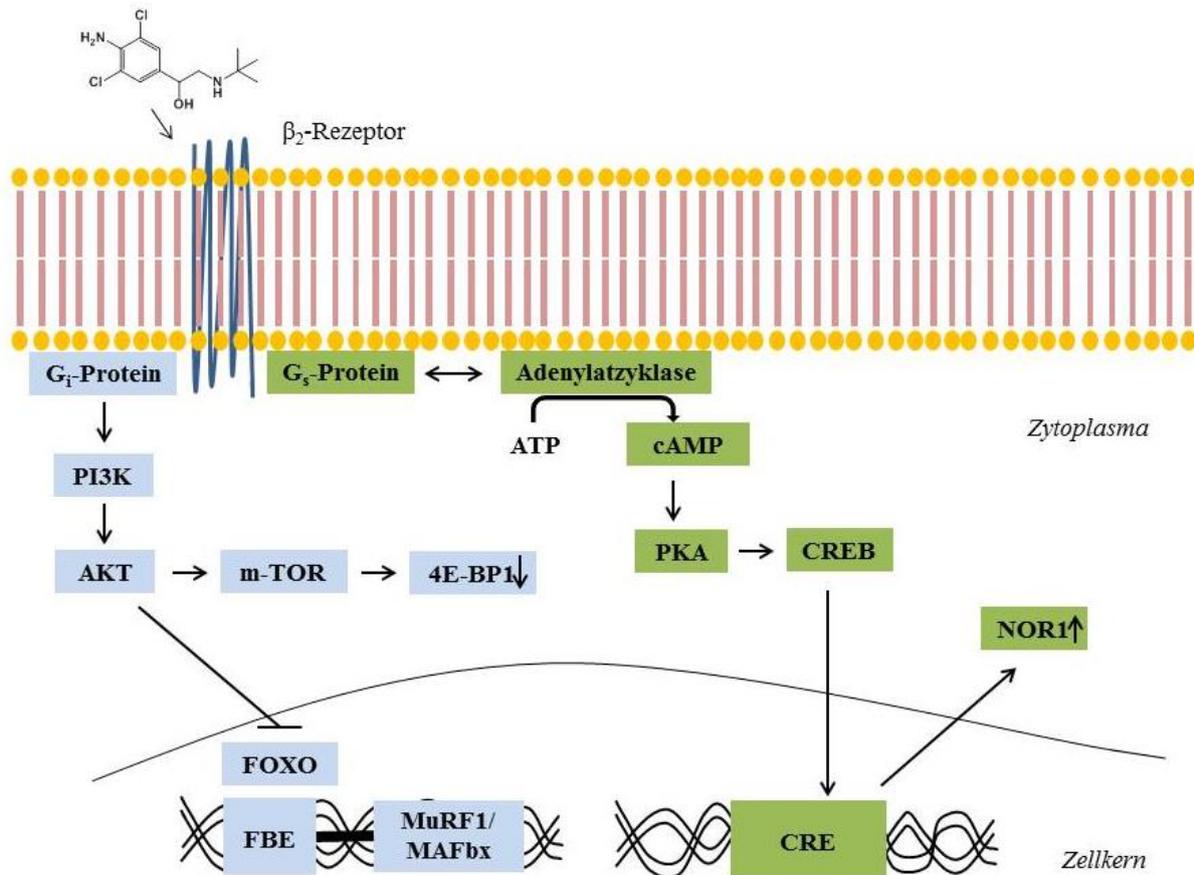


Abbildung 6: Schematische Darstellung der G_{αs} bzw. G_{αi} vermittelten Wirkungen von β₂-Sympathikomimetika im Skelettmuskel

Die lipolytischen Eigenschaften des Clenbuterols sind ebenfalls β₂-vermittelt. Bei der β-Rezeptorexprimierung der Adipozyten besteht eine hohe Speziesabhängigkeit [5], wobei in humanen Adipozyten β₁- und β₂-Rezeptor koexistent sind [64].

Über den cAMP/PKA Signalweg innervieren β₂-, aber auch β₁-Agonisten verschiedene Proteine (v.a. Perilipin), die an der Speicherung bzw. Stabilisierung der intrazellulären Fetttröpfchen beteiligt sind [65,66]. Desweiteren steigern sie die Aktivität hormonsensitiver Lipasen (HSL), sodass es zu einem verstärkten Abbau von Triglyceriden kommt (Abbildung 7) [67].

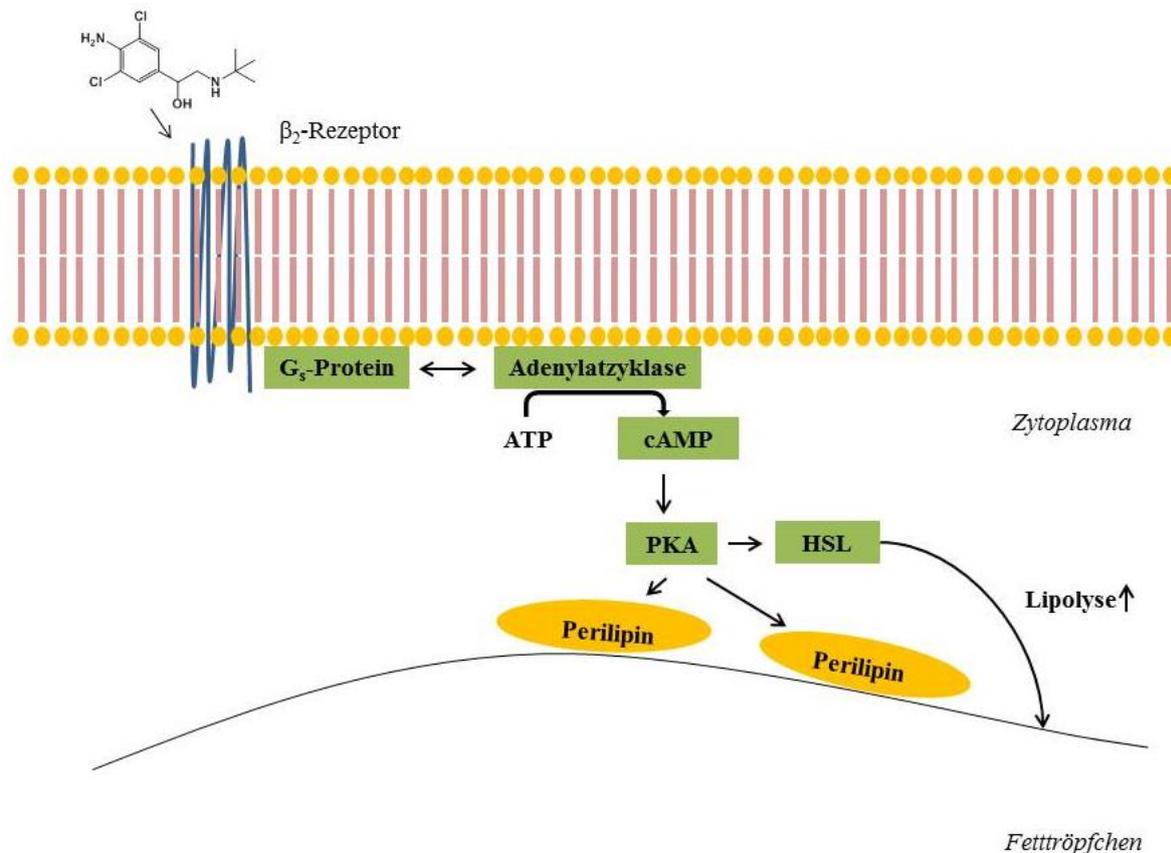


Abbildung 7: Signalweg der β -vermittelten Lipolyse in Adipozyten

2.3 Überkritische Fluidchromatographie

2.3.1 Physikalische Grundlagen und chromatographische Einordnung

Die Überkritische Fluidchromatographie, oder auch Superkritische Fluidchromatographie (SFC), bedient sich eines überkritischen Fluids als mobiler Phase. Ein Stoff liegt in diesem Zustand vor, wenn die stoffspezifische kritische Temperatur und der kritische Druck überschritten werden. Im superkritischen Bereich lässt sich nicht mehr zwischen gasförmigem und flüssigem Zustand unterscheiden. Experimentell lässt sich das Verhalten durch Verschwinden des Meniskus zwischen flüssiger und gasförmiger Phase sowie dem Auftreten einer Opaleszenz am kritischen Punkt beobachten. Stoffspezifische Phasendiagramme veranschaulichen den Zusammenhang zwischen Druck, Temperatur, Volumen und Aggregatzustand (Abbildung 8).

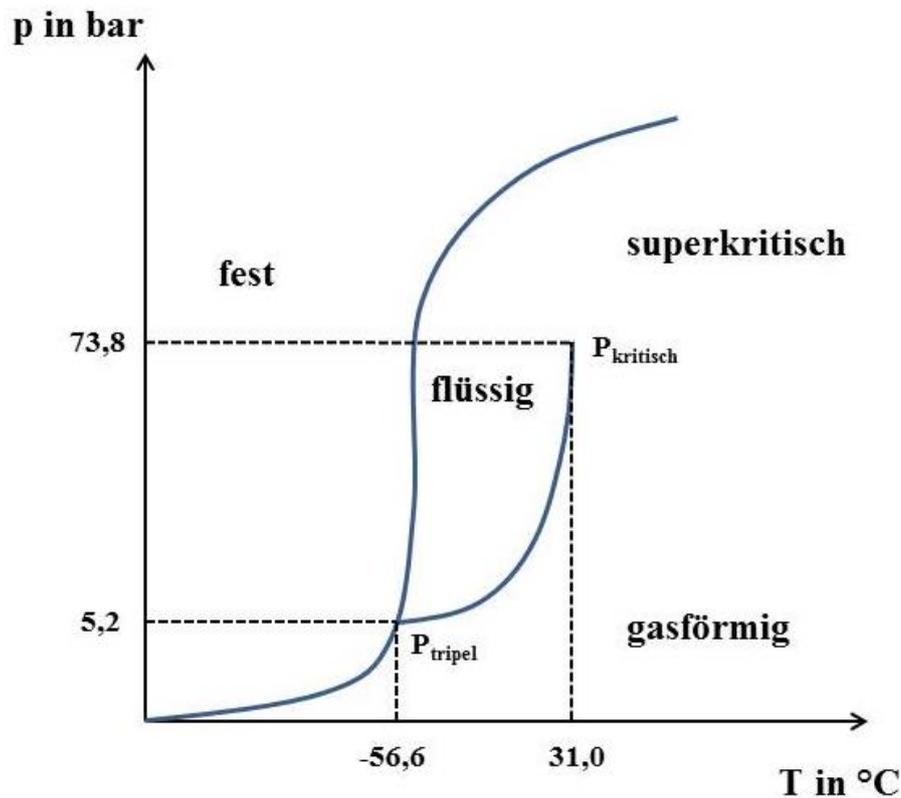


Abbildung 8: Phasendiagramm von Kohlenstoffdioxid (nicht maßstabsgetreu)

Superkritische Fluide zeigen Eigenschaften, die ihre Verwendung als mobile Phase in der Chromatographie interessant machen. Verglichen mit einem Gas zeichnet sich ein superkritisches Fluid durch ein Lösungsvermögen aus. Verglichen mit dem flüssigen Zustand weist es eine reduzierte Viskosität und Dichte auf. Tabelle 2 und Abbildung 9 geben eine Einordnung.

Physikalische Größe	Gas	Superkritisches Fluid (am kritischen Punkt)	Flüssigkeit
Dichte g/cm^{-3}	0,0006-0,002	0,2-0,5	0,6-1,6
Dynamische Viskosität $\text{mPa}\cdot\text{s}$	0,01-0,03	0,01-0,1	0,2-3
Selbstdiffusionskoeffizient cm^2/s	0,1-0,4	0,1-0,01	0,001
Oberflächenspannung mN/m	-	-	16-70

Tabelle 2: Vergleich physikalischer Größen zwischen den Aggregatzuständen

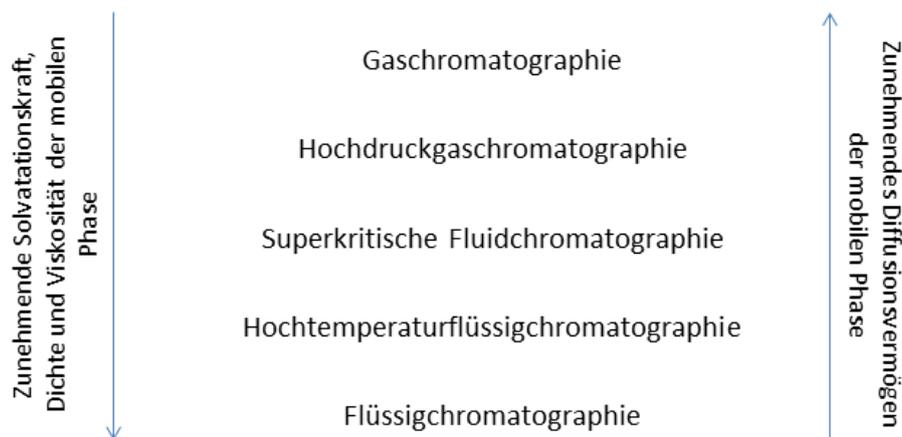


Abbildung 9: Physikalische Eigenschaften der mobilen Phasen in der Chromatographie

Der Zustand, in dem sich die mobile Phase eines chromatographischen Systems befindet, ist durch die Zustandsgrößen Druck, Temperatur, Stoffmenge und Volumen charakterisiert und lässt sich mathematisch mit Hilfe von thermodynamischen Zustandsgleichungen beschreiben. Allgemein gilt:

$$p = f(V, T, n) \text{ bzw. } V = f(p, T, n) \quad (2-1)$$

p.....Druck

V.....Volumen

T.....Temperatur

n.....Stoffmenge

Flüssigkeiten, die in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) als mobile Phase dienen, dehnen sich bei Temperaturzunahme aus, es gilt:

$$\frac{\Delta V}{V} = \gamma \cdot \Delta T \quad (2-2)$$

γVolumenausdehnungskoeffizient

Der Volumenausdehnungskoeffizient ist dabei eine stoffspezifische Konstante, die das Ausmaß der Volumenzunahme bzw. Abnahme bei Temperaturänderung beschreibt.

Unter Berücksichtigung der geringen Abhängigkeit vom Druck lässt sich die Volumenänderung (für kleine Änderungen Linearität angenommen) durch partielles Ableiten berechnen:

$$\frac{dV}{V} = \frac{1}{\underbrace{V\partial T}_{=\gamma}} dT + \frac{1}{\underbrace{V\partial p}_{=-\kappa}} dp \quad (2-3)$$

κKompressibilität

wobei die Kompressibilität das Verhältnis zwischen Druck- und Volumenänderung beschreibt.

Daraus folgt:

$$\frac{V-V_0}{V_0} = \gamma \cdot (T - T_0) - \kappa \cdot (p - p_0) \quad (2-4)$$

bzw. nach V

$$V = V_0 \cdot [1 + \gamma \cdot (T - T_0) - \kappa \cdot (p - p_0)] \quad (2-5)$$

Da in der HPLC die druckabhängige Volumenänderung marginal ist und in der Regel isotherm gearbeitet wird, vereinfacht sich der Zusammenhang zu:

$$V = V_0 \text{ bzw. } V = \text{const.} \quad (2-6)$$

Unter den in der Gaschromatographie (GC) üblichen Bedingungen verhält sich das Trägergas fast wie ein ideales Gas, sodass die universelle Gasgleichung in der Regel zur Beschreibung des Systems ausreicht:

$$p \cdot V = n \cdot R \cdot T \text{ bzw. } \frac{p \cdot V}{T} = \text{const.} \quad (2-7)$$

R.....universelle Gaskonstante

Bei hohem Druck weicht das Verhalten eines Gases immer mehr vom Idealzustand, in dem die Annahme gilt, dass die Gasmoleküle untereinander nicht wechselwirken, aufgrund der gegenseitigen Anziehung der Moleküle, die zu einem Abfall des nach außen messbaren Drucks führt (Kohäsionsdruck) und des räumlichen Volumens der Moleküle selbst (Kohäsionsvolumen), ab (reales Gas). In der Literatur sind diverse Zustandsgleichungen für reale Gase beschrieben. Für die SFC hat sich der Ansatz von Peng-Robinson als brauchbar erwiesen [68].

$$p = \frac{R \cdot T}{V-b} - \frac{a}{V(V+b)+b(V-b)} \quad (2-8)$$

a.....Kohäsionsdruck

b.....Kohäsionsvolumen

Viskosität, Dichte, Diffusions- und Lösungsvermögen eines superkritischen Fluids sind druckabhängig; je höher der angelegte Druck, desto höher sind Viskosität, Dichte sowie Lösungsvermögen und desto niedriger ist das Diffusionsvermögen des Fluids. Besonders stark ausgeprägt sind diese Effekte im Bereich des kritischen Druckpunktes [69].

Der Zusammenhang zwischen Lösungsvermögen und Druck bzw. Dichte eines superkritischen Fluids lässt sich mit Hilfe der von Chrastil entwickelten Gleichung beschreiben [70]:

$$\ln L = d \cdot \ln \rho + \frac{a_1}{T} + b_1 \quad (2-9)$$

ρDichte

L.....Lösungsvermögen

a_1, b_1, dStoffspezifische Konstanten des Fluids

Je höher also der angelegte Druck und damit die Dichte des Fluids, desto höher ist die Löslichkeit eines Stoffs. Einhergehend sind auch die Retentionsfaktoren der Eluenten und die chromatographische Selektivität des Systems abhängig von der Dichte der mobilen Phase und somit vom Druck. Peaden und Lee formulieren folgende Beziehung für den Retentionsfaktor [71]:

$$\ln k = a_1 - b_1 \cdot \rho \quad (2-10)$$

k.....Retentionsfaktor

Und für die Selektivität:

$$\ln \alpha = B_0 - m \cdot \rho \quad (2-11)$$

αSelektivität

B_0, mstoffspezifische Konstanten der stationären Phase

Aus den Gleichungen 2-10 und 2-11 geht hervor, dass mit zunehmendem Druck sowohl Retentionsfaktor k als auch Selektivität (α) abnehmen.

2.3.2 Praktische Aspekte

Durch die im vorhergehenden Kapitel geschilderten Zusammenhänge lässt sich ableiten, dass eine reproduzierbare Chromatographie eine präzise Rückdruckregulierung erfordert, um schwankende Retentionszeiten zu vermeiden. Ein Druckabfall entlang der Säule führt zusätzlich - im Gegensatz zur HPLC - zu einem veränderten Lösungsvermögen der mobilen Phase (Gleichung 2-9). Diese Faktoren trugen, neben der rasanten Entwicklung der HPLC, dazu bei, dass die SFC lange keinen Einzug in die analytische Chromatographie hielt, sondern hauptsächlich für präparative Ansätze herangezogen wurde. Im präparativen Bereich fallen vor allem die niedrige Viskosität des Fluids und die damit verbundenen geringen Rückdrücke ins Gewicht, da somit sowohl höhere Flussraten und damit kürzere Durchlaufzeiten ermöglicht werden, als auch die Verwendung kleiner Partikelgrößen bzw. längerer Säulen (höhere Ausbeute pro Lauf). Zudem lässt sich das Lösungsmittel nach der Chromatographie sehr leicht vom Produkt abtrennen.

Ein weiterer Vorteil der SFC ergibt sich aus dem gesteigerten Diffusionsvermögen der Analyten ins Fluid im Vergleich zu Flüssigkeiten (vgl. Tabelle 2), woraus eine verbesserte Massentransferkinetik resultiert. Die Peakverbreiterung bedingt durch Massentransfereffekte, die im C-Term der van-Deemter-Gleichung (vgl. Gleichung 2-12 und 2-13) berücksichtigt wird, ist in der SFC wesentlich geringer ausgeprägt, sodass, auch aufgrund der geringen Viskosität der mobilen Phase, mit höheren Flussraten bei gleicher, in einigen Fällen sogar besserer Trennleistung gearbeitet werden kann.

Die 1956 von van Deemter eingeführte Gleichung lautet:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (2-12)$$

bzw.

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma_1 D_m}{u} + \frac{f_1(k) d_p^2 u}{D_m} + \frac{f_2(k) d_f^2 u}{D_s} \quad (2-13)$$

u.....	Geschwindigkeit mobile Phase	C · u.....	Massenübergang
H.....	Bodenhöhe	D _m	Diffusivität des Eluenten in mobiler Phase
A.....	Eddy-Diffusion	D _s	Diffusivität des Eluenten in stationärer Phase
$\frac{B}{u}$	Longitudinal-Diffusion	d _f	Filmdicke der stationären Phase
λ, γ ₁	Konstanten	d _p	Partikeldurchmesser

Die Grundlagen und die Herleitung der van-Deemter Gleichung bzw. der van-Deemter Kurve sollen nicht Gegenstand dieser Arbeit sein, sondern werden als bekannt vorausgesetzt. Nach Katz [72] kann die Diffusivität der Analyten in die stationäre Phase aufgrund einer Filmbildung der mobilen Phase am Packmaterial auch als Funktion der Diffusivität der Analyten in der mobilen Phase ausgedrückt werden.

$$D_s = a_2 \cdot D_m \quad (2-14)$$

a_2stoffspezifische Konstante

Gleichung 2-13 vereinfacht sich damit zu:

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma_1 D_m}{u} + \frac{bu}{D_m} \quad \text{mit } b = f_1(k_e)d_p^2 + f_2(k_e)\frac{d_f^2}{a_2} \quad (2-15)$$

k_eKapazitätsverhältnis

Da der Einfluss der Longitudinaldiffusion bei hohen Flussraten, wie sie in der SFC vorliegen, gegen Null geht, kann mit guter Näherung angenommen werden:

$$H \approx 2\lambda d_p + \frac{bu}{D_m} \quad (2-16)$$

Aus obenstehenden Betrachtungen geht hervor, dass die im Vergleich zur HPLC erhöhte Diffusivität der mobilen Phase eine Verringerung des Einflusses des C-Terms nach sich zieht und dadurch die van-Deemter Kurve, bei Einsatz der gleichen Säule, einen wesentlich flacheren Verlauf nehmen kann [73].

Aus verschiedenen Gründen ist die Verwendung von superkritischem Kohlenstoffdioxid als mobile Phase am gebräuchlichsten. Durch die relativ niedrige kritische Temperatur (30,98 °C) und dem geringen kritischen Druck (73,75 bar) von Kohlenstoffdioxid sind die instrumentellen Anforderungen zur Fluidherzeugung (Druck- und Temperaturbelastung der Bauteile) gering und darüber hinaus auch thermolabile Analyte zugänglich. Weiterhin ist CO₂ weder brennbar noch gesundheitsschädigend und kostengünstig zu beschaffen, Lösungsmittelabfälle reduzieren sich ebenfalls [74].

Da überkritisches CO₂ eine Polarität vergleichbar der von Hexan aufweist, steht die SFC mit reinem CO₂ als Alternative zur NP-HPLC zur Verfügung, wobei die Säulenequilibration deutlich schneller abläuft.

Für polarere Analyten reicht die Elutionsstärke von CO₂ alleine dagegen nicht aus. Das superkritische CO₂ wird für diese Zwecke mit einem Coeluenten, auch „modifier“ genannt,

gemischt. Meist handelt es sich dabei um kurzkettige Alkohole oder Acetonitril, denen, je nach Beschaffenheit des Analyten, gegebenenfalls noch Additive wie z.B. Ameisensäure, Essigsäure oder Triethylamin zugesetzt werden [75]. Der Einsatz von polar organischen Coeluenten ermöglicht darüber hinaus eine Kopplung mit einem massenspektrometrischen Detektor, die sich in der NP-HPLC aufgrund der geringen Leitfähigkeit des Eluenten meist nicht realisieren lässt. Andererseits führt der Einsatz von Coeluenten dazu, dass sich kritische Temperatur und kritischer Druck des Lösungsmittelgemisches verändern [76].

Resultierender kritischer Druck und Temperatur eines binären Gemisches sind stark vom Mischverhältnis der Komponenten abhängig und können durch Zugabe von Additiven zusätzlich beeinflusst werden. Bei Anwendung eines Eluentengradienten ändern sich die kritischen Bedingungen der mobilen Phase demzufolge mit.

In der Regel befindet sich die mobile Phase, unter den in der Praxis gewählten chromatographischen Bedingungen, in einem subkritischen Zustand, der aber ähnliche Eigenschaften aufweist, wie die oben geschilderten für den superkritischen Bereich [74]. Der Anteil des Coeluenten sollte nicht mehr als ca. 60 Vol% betragen, da sonst ein Verlust des subkritischen Zustands droht [69]. Streng genommen müsste unter solchen Bedingungen von „Subkritischer Fluidchromatographie“ gesprochen werden, da aber der Begriff der „Superkritischen Fluidchromatographie“ allgemein auch unter solchen Bedingungen akzeptiert ist, wird auch in dieser Arbeit so verfahren.

Durch den Einsatz bzw. die Kombination von Coeluenten und Additiven ergibt sich ein weit gefasster Anwendungsbereich der SFC, dem viele unterschiedliche Analyten zugänglich sind (Abbildung 10).



Abbildung 10: Typische SFC Bedingungen für verschiedene Analyten

2.3.3 Instrumenteller Aufbau

In den Kapiteln 2.3.1 und 2.3.2 wurde beschrieben, dass der Druck wesentlichen Einfluss auf die Eigenschaften der mobilen Phase und damit auf die Trennleistung nimmt. Aus instrumenteller Sicht ergibt sich damit die Notwendigkeit einer hochpräzisen Druckregulierung. Prinzipiell ist der apparative Aufbau dem der HPLC ähnlich, allerdings ist zusätzlich ein Druckregulationsmodul integriert, welches den Eingangsdruck des CO₂ und den Rückdruck über einen Rückdruckregulator kontrolliert [77]. Optional ist, zusätzlich zum Photodioden-Array-Detektor (PDA), auch eine Kopplung mit einem massenselektiven Detektor möglich (Abbildung 11). Dazu wird über einen Splitter ein Teil des Flusses abgezweigt und in die Ionenquelle des Massenspektrometers überführt.

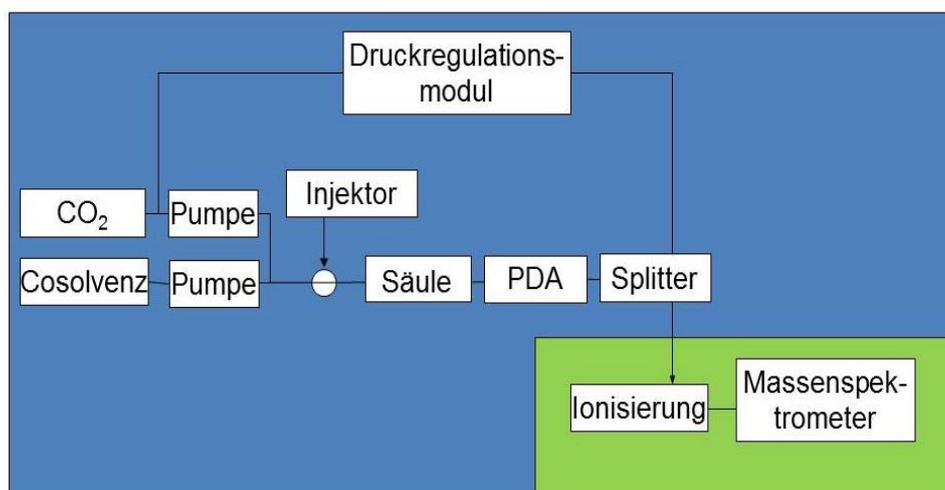


Abbildung 11: Schematische Darstellung des apparativen Aufbaus eines analytischen SFC-Systems

Wichtiger Bestandteil der Druckregulation ist ein Rückdruckregulator (Abbildung 12), der einem Druckablassventil gleicht. Eingangs- und Ausgangskapillaren werden von einem Diaphragma überspannt, auf dem ein durch Federspannung in seinem Widerstand regulierbarer Kolben aufsitzt. Erreicht der Eingangsdruck einen kritischen Wert, werden Diaphragma und Kolben angehoben. Es entsteht eine Verbindung zwischen Eingangs- und Ausgangskapillare, durch die Fluid entweichen kann. Dadurch sinkt gleichzeitig der Druck auf der Eingangsseite ab und der Kolben fährt in seinen Sitz zurück, bis die Verbindung wieder schließt [78].

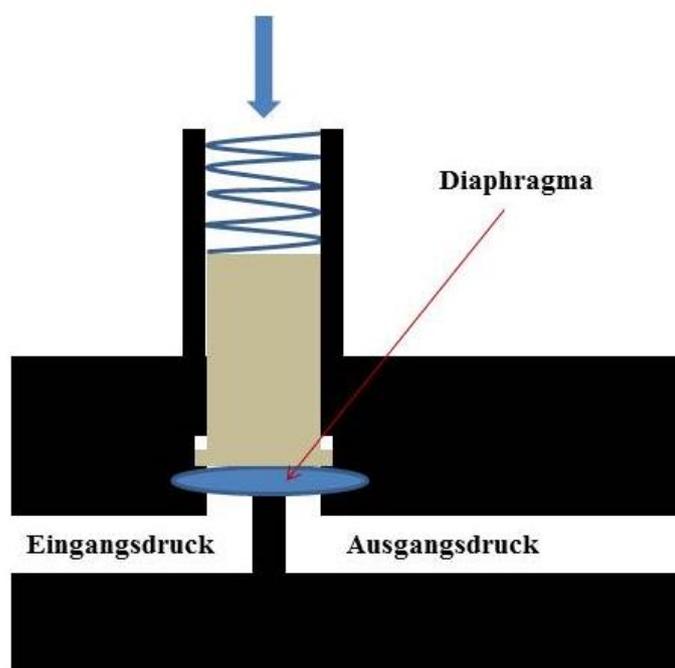


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Rückdruckregulators

Ein weiterer Unterschied zur HPLC besteht in der Beschaffenheit der PDA-Messzelle. Da nach der Säule der Druck auch weiterhin konstant hoch gehalten werden muss, um den super-, bzw. subkritischen Zustand der mobilen Phase beizubehalten und ein Ausgasen von CO_2 zu vermeiden, muss die Messzelle vor dem Rückdruckregulator integriert sein und die nötige Druckstabilität aufweisen.

Wie bereits in Kapitel 1 angedeutet, ist seit dem Jahr 2009 eine neue Generation analytischer SFC Systeme verfügbar. Diese zeichnen sich durch eine erheblich verbesserte Druckregulation aus. Das CO_2 wird durch das Druckregulationsmodul bereits auf der Eingangsseite (d.h. vor der Pumpe) nahe dem Säulenvordruck gebracht. Dadurch ist die CO_2 -Pumpe in der Lage, gleichmäßiger zu fördern und die Fluss- bzw. Druckschwankungen im System werden reduziert. Diese Schwankungen waren der Hauptgrund für das PDA-Detektorrauschen früherer SFC Systeme und konnten um Faktor 50 gesenkt werden [79]. Mit diesen Verbesserungen ist es jetzt möglich, Gehalts- und Reinheitsbestimmungen mittels SFC durchzuführen, die auch für den hochregulierten Pharmabereich geeignet wären und ICH Richtlinien entsprechen [80,81].

Eine Einschränkung der heutigen SFC Systeme besteht dagegen in ihrem oberen Drucklimit von 400 bzw. 600 bar [77,82]. Dies schränkt, vor allem verglichen mit Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographischen (UHPLC) Systemen, die Verwendung von

Säulen mit Partikelgrößen kleiner zwei Mikrometer insofern ein, als dass die maximale Trennleistung dieser Säulen nicht ausgeschöpft werden kann [83,84].

2.4 Enantiomerentrennung

2.4.1 Racematspaltung

Grundsätzlich lassen sich drei physikalische bzw. chemische Verfahren zur Racematspaltung unterscheiden. Das selektive Ausfällen eines Enantiomers, Trennverfahren über Diastereomerenbildung und die kinetische Racematspaltung.

Einige racemische Verbindungen können aus ihrer gesättigten Lösung durch Animpfen mit enantiomerenreinen Impfkristallen der gleichen Verbindung getrennt werden. Bei dieser sogenannten fraktionierten Kristallisation fallen enantiomerenreine Kristalle aus, die z.B. durch Filtration vom in Lösung verbleibenden anderen Enantiomer getrennt werden. Industriell findet dieses Verfahren Anwendung zur Darstellung von S-Methyldopa [85].

Da viele chirale Verbindungen aber racemisch kristallisieren, ist dieses Verfahren nur in seltenen Fällen einsetzbar.

Dem Trennprinzip der kinetischen Racematspaltung liegen unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der zu trennenden Eduktenantiomere mit einem enantiomerenreinen Reaktionspartner zugrunde [86]. Die Reaktion sollte zweckmäßigerweise beendet werden bevor das langsamer reagierende Enantiomer ebenfalls in nennenswertem Umfang in das Reaktionsprodukt überführt wird, um möglichst hohe Enantiomerenüberschüsse zu erhalten. Nach Trennung des Reaktionsprodukts vom langsam reagierenden Eduktenantiomer kann dieses gegebenenfalls wieder gespalten werden, um das schneller reagierende Enantiomer zu gewinnen. Bei der dynamisch kinetischen Racematspaltung wird parallel zur Umsetzung des schneller reagierenden Enantiomers mit dem Reaktionspartner das langsam reagierende Enantiomer racemisiert, sodass ständig das schneller reagierende Enantiomer nachgebildet wird [87]. Da dieses dem Gleichgewicht entzogen wird, sind mit dieser Methode höhere Reaktionsausbeuten möglich. Voraussetzung zur Anwendung der kinetischen Spaltungen sind ausreichend unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (Abbildung 13).

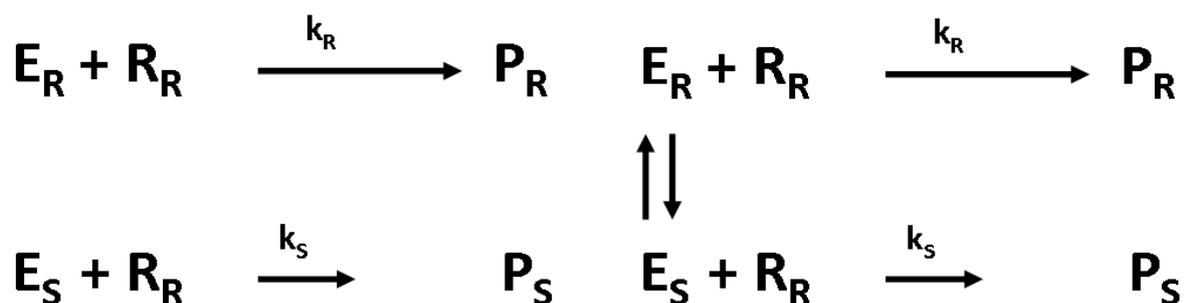


Abbildung 13: Prinzip kinetischer (links) und dynamisch kinetischer (rechts) Racematspaltung

Das dritte Trennprinzip beruht auf der Überführung der Enantiomere in diastereomere Salze bzw. Diastereomerenkomplexe, die im Gegensatz zu den Enantiomeren unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweisen und sich daher separieren lassen. So können Racemate mit Säure- oder Basenfunktion durch Zugabe optisch aktiver Basen bzw. Säuren in diastereomere Salze überführt werden, die dann mittels fraktionierter Kristallisation voneinander trennbar sind. Durch anschließendes Ansäuern oder Alkalisieren lässt sich die enantiomerenreine freie Säure/Base gewinnen.

Auch die chromatographischen Trennverfahren, auf die im nächsten Kapitel ausführlicher eingegangen werden soll, beruhen auf Diastereomerenbildung.

2.4.2 Chirale Chromatographie

Racemate lassen sich mit allen gängigen chromatographischen Methoden wie GC, HPLC, DC, SFC, CE usw. trennen [88]. Grundsätzlich stehen für eine chromatographische Enantiomerentrennung drei verschiedene Ansätze zur Wahl. Eine Möglichkeit besteht darin, die Enantiomere vor der Chromatographie durch Derivatisierung mit einem enantiomerenreinen Reagenz in Diastereomere zu überführen. Die erhaltenen Diastereomere können mittels achiraler mobiler und stationärer Phase getrennt werden. In der Literatur ist diese Vorgehensweise v.a. für die Trennung von Aminoalkoholen durch Derivatisierung mit Isocyanaten bzw. Isothiocyanaten beschrieben [89]. Kritisch sind bei dieser Methode sowohl die Enantiomerenreinheit des Derivatisierungsreagenz, als auch die Quantität der Umsetzung. Mithilfe chiraler Zusätze zur mobilen Phase (chirale Selektoren) können Racemate auch auf achiralen stationären Phasen separiert werden. Dazu kann der mobilen Phase beispielsweise

ein enantiomerenreines Ionenpaarreagenz zugesetzt werden, wodurch sich diastereomere Ionenpaare bilden. Alternativ bieten sich makromolekulare Zusätze, wie zum Beispiel α -, β - oder γ -Cyclodextrine (Näheres im Kapitel 2.4.2.1.3) oder Proteine an [90].

Eine Trennung von racemischem Tryptophan und Warfarin ist durch Zugabe von humanem Serumalbumin zur mobilen Phase beschrieben [91]. Die Methodik einer chiralen mobilen Phase ist allerdings nicht für gaschromatographische Systeme anwendbar.

Am gebräuchlichsten ist der Ansatz über eine Diastereomerenkomplexbildung der Enantiomere an einer chiralen stationären Phase eine Racematspaltung herbeizuführen. Im folgenden Kapitel werden die gängigsten chiralen Trennphasen vorgestellt.

2.4.2.1 Chirale stationäre Phasen

2.4.2.1.1 Pirklephasen

Pirklephasen, auch Bürstenphasen genannt, beruhen auf einem Dreipunkt-Wechselwirkungsprinzip zwischen Analyt und stationärer Phase. Strukturell bestehen sie aus einem über eine Alkanbrücke kovalent mit dem Silikagel verbundenem Molekül, das sowohl Wasserstoffbrückenbindungen als auch π - π - und Dipolwechselwirkungen ermöglicht [74]. Eine beispielhafte Struktur ist in Abbildung 14 dargestellt.

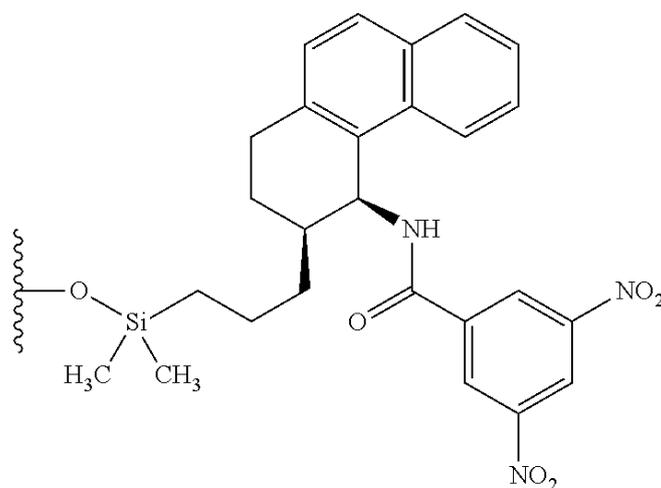


Abbildung 14: Struktur von Whelk-O1, einer typischen Pirkle Phase

Enantioselektivität wird dadurch erreicht, dass nur ein Enantiomer aufgrund seiner Konfiguration in der Lage ist, alle drei genannten Wechselwirkungen einzugehen.

2.4.2.1.2 Polysaccharidphasen

Weit verbreitet ist der Einsatz von modifizierten Polysacchariden auf Amylose- oder Cellulosebasis (Monomer: D-Glucose). Die Saccharide können dabei kovalent mit dem Säulenpackmaterial verknüpft sein oder dieses nur umhüllen. Letzteres schränkt die Fließmittelauswahl ein, um Säulenbluten zu vermeiden. Die Modifizierung der Polymere besteht in der Überführung der freien Hydroxygruppen der Glucosemonomere in Carbamate oder in einer Veresterung derselben mit Benzoesäurederivaten. So ist eine Vielzahl von verschiedenen Polysaccharidphasen zur chromatographischen Enantiomerentrennung zugänglich (Abbildung 15).

Auch bei diesen Phasen erfolgt die Enantiomerentrennung, wie bei den Pirklephasen, über eine Dreipunktwechselwirkung [74].

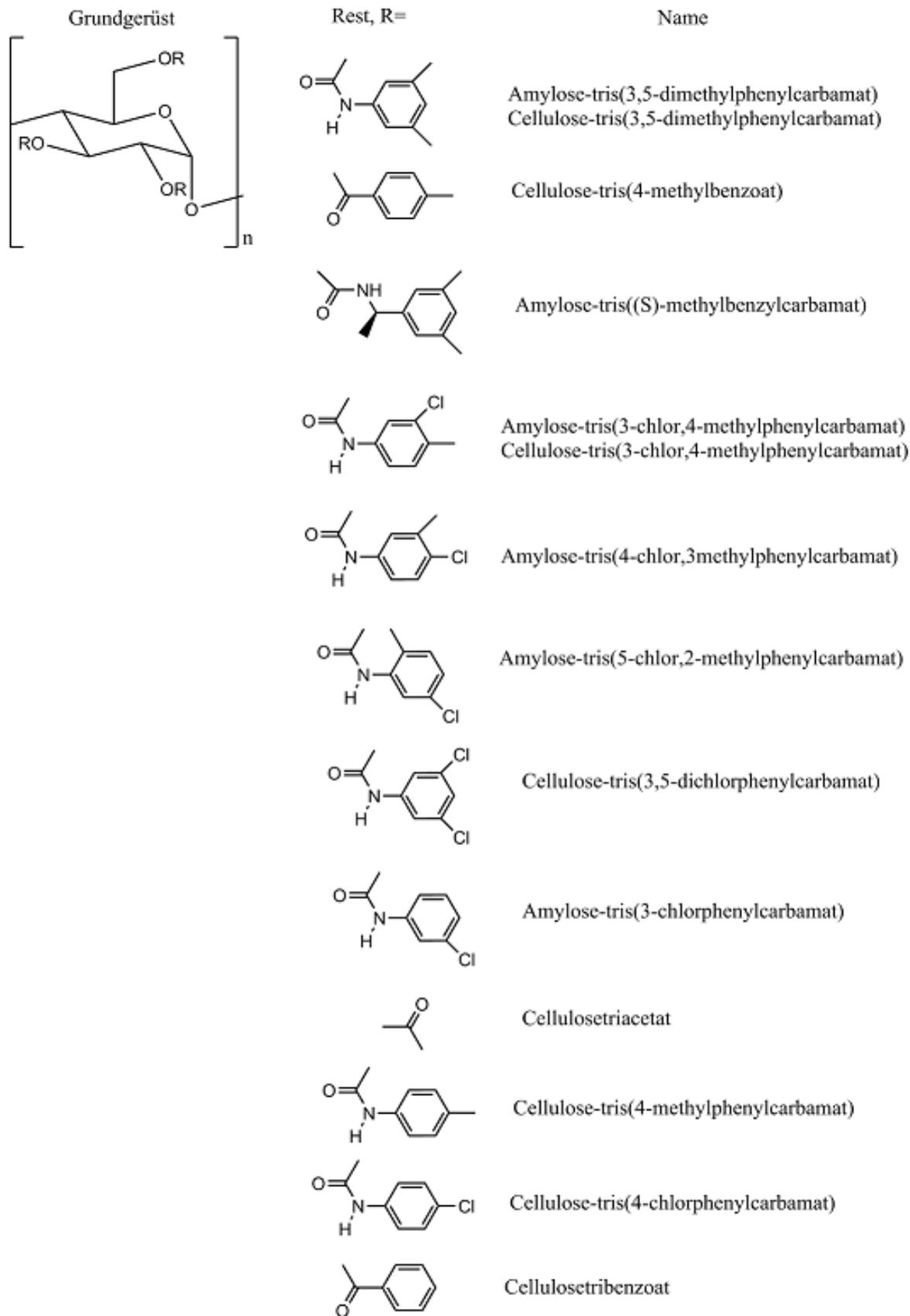


Abbildung 15: Übersicht zu den Polysaccharidphasen

2.4.2.1.3 Cyclodextrin- und Glycopeptid-Antibiotika-Phasen

Cyclodextrine sind aus Glucosemonomeren aufgebaute, zyklische Oligosaccharide, die nach Zahl der ringbildenden Glucosemoleküle klassifiziert werden. Üblicherweise finden in der chiralen Chromatographie α -, β - oder γ -Cyclodextrine, zum Teil auch an den freien Hydroxygruppen der Glucosemonomere derivatisiert, Verwendung (Abbildung 16).

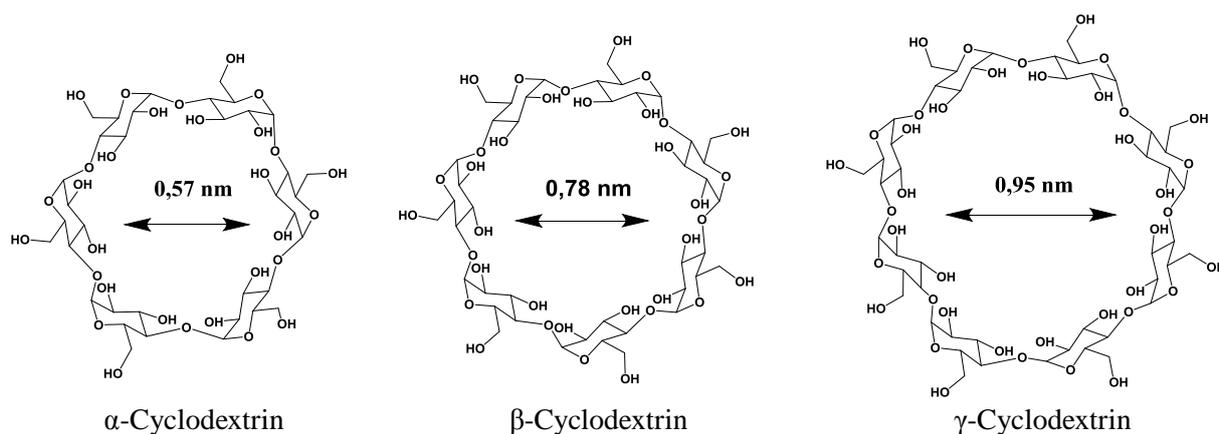


Abbildung 16: Strukturen der zur Chromatographie verwendeten Cyclodextrine

Cyclodextrine können aufgrund ihrer Struktur zahlreiche Wechselwirkungen mit den Analyten eingehen. Die Innenseite des Rings ist apolar und ermöglicht hydrophobe Wechselwirkungen bzw. Host-Guest Komplexe, während die hydrophile Außenseite Wasserstoffbrücken ausbilden kann [92]. In der Gaschromatographie sind Cyclodextrine die einzigen kommerziell zur Verfügung stehenden chiralen Phasen.

Die Glycopeptid-Antibiotika Vancomycin (Abbildung 17), Teicoplanin und Ristocetin werden ebenfalls als chirale stationäre Phasen verwendet. Sie bestehen aus einem Peptidaglykon und einem oder mehreren Zuckerresten und weisen aufgrund der Konfiguration ihrer Stereozentren zahlreiche enantioselektive Bindungsstellen auf.

Alle der genannten Glycopeptid-Antibiotika sind kovalent mit dem Silikagel verknüpft.

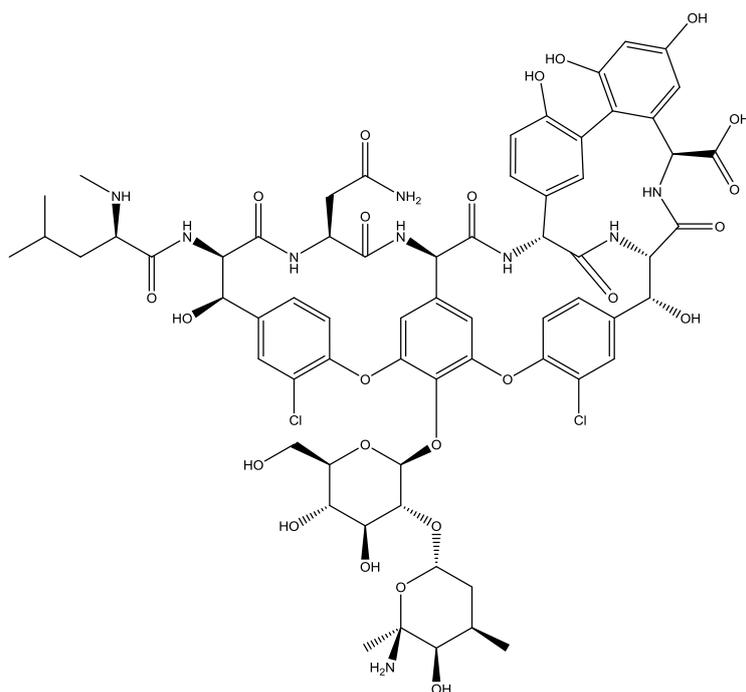


Abbildung 17: Strukturformel von Vancomycin

In der vorliegenden Arbeit wurde auf vancomycinbasierte Phasen zurückgegriffen. Diese zeichnen sich durch eine verbesserte Selektivität für basische Verbindungen aus. Darüber hinaus sind sie sowohl für Umkehrphasen-, als auch für Normalphasenchromatographie, bzw. SFC geeignet [93].

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Methodenentwicklung zur Bestimmung der Clenbuterolenantiomere in Arzneimitteln und Schwarzmarktpräparaten

3.1.1 Vorversuche

Zunächst wurden vorab geeignete chromatographische Bedingungen zur Enantiomertrennung auf Astec Chirobiotic[®] V2 Säulen (Stationäre Phase: Vancomycin) entwickelt. Dabei wurden Einflüsse verschiedener Fließmittel, Coeluenten, Fließmitteladditive, Salze, unterschiedliche Ionenstärken, Säulentemperaturen und Fließmittelgeschwindigkeiten untersucht. Anschließend ist die Elutionsreihenfolge der Enantiomere bestimmt worden, wobei sich zeigte, dass unter den gewählten Bedingungen R-Clenbuterol vor S-Clenbuterol eluiert. Gleichzeitig konnte so die racemische Zusammensetzung bzw. die Enantiomerenreinheit der eingesetzten Referenzstandards kontrolliert werden (Abbildung 18). Die entwickelten chromatographischen Methoden sind in Kapitel 6.2 beschrieben. Die Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzung erfolgte für Urin mittels HPLC bzw. SFC mit Triple Quadrupol Massendetektor (TQD), für die Arzneimittel und Schwarzmarktprodukte mittels HPLC mit UV- und Quadrupol-Time of flight (Q-TOF) MS-Detektion.

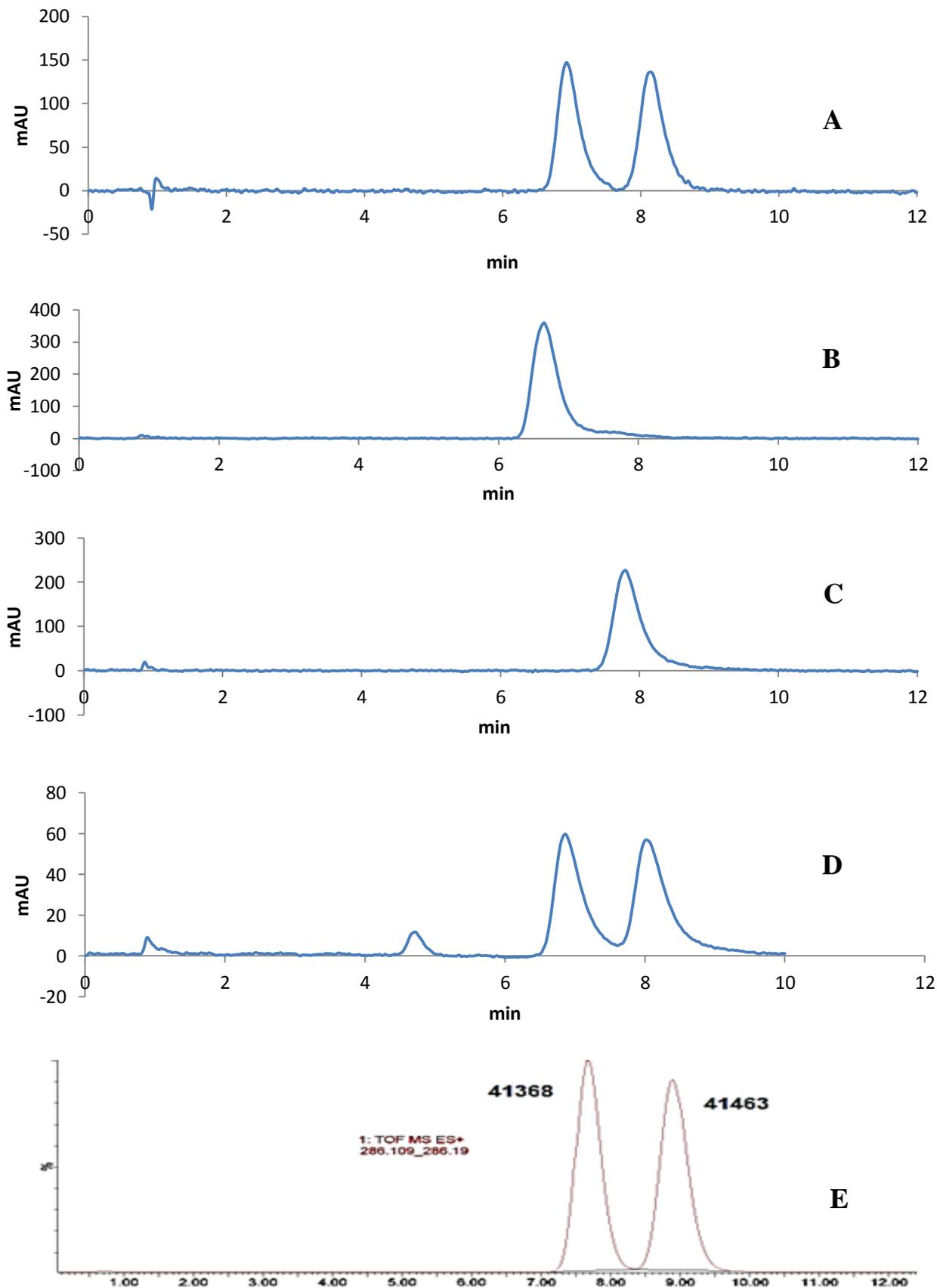


Abbildung 18: HPLC-UV Chromatogramme der Referenzstandards; racemisches Clenbuterolhydrochlorid (A), R-Clenbuterol (B), S-Clenbuterol (C) und UV- (D) sowie MS-Chromatogramme von D₉-Clenbuterol (E)
 A,B,C,D: HP 1100, Astec Chirobiotic V2 (150 x 2,1 mm; 5µm), MeOH mit 0,02 % v/v Additivgemisch aus TEA und HAc (65 %:35 %);
 isokratisch, 30 °C, 0,5 ml/min, 244 nm; E: wie Kapitel 6.2.2

Zudem wurden die Geräteparameter dahingehend optimiert, eine maximale Intensität für das Clenbuterolprodukt des Masse-Ladungsverhältnisses m/z 203 zu erhalten (Abbildung 19).

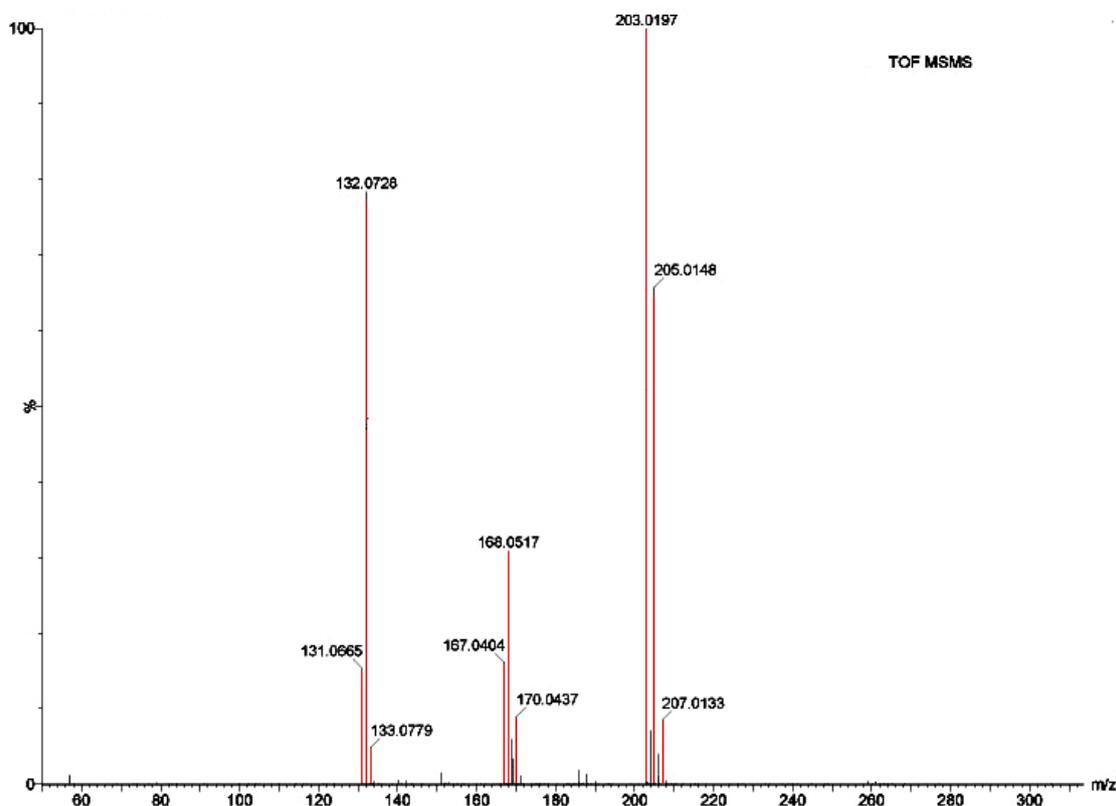


Abbildung 19: Produktionenspektrum vom Clenbuterol (Q-TOF, Mutterion: $[M+H]^+$, $m/z=277,19$, Low-Mass Resolution: 4,7, Collision Energy: 16 eV, Collision Gas: Argon)

Aufgrund der guten Erfahrungen mit den Extrelut[®] NT-3 Kartuschen bei der Probenvorbereitung der Humanurine (siehe Kapitel 3.2), wurden diese auch zur Analytik der Arzneimittel und Schwarzmarktpräparate herangezogen, zumal sich eine Probenaufarbeitung mittels wässriger Extraktion und anschließender Spritzenfiltration als ungeeignet erwies (das Filtrat blieb bei Aufarbeitung fester Arzneiformen trübe und wurde daher nicht ins chromatographische System injiziert).

Die Clenbuterolkonzentrationen in Arzneimitteln (10 μg bzw. 20 μg Clenbuterolhydrochlorid pro Tablette, in den Veterinärarzneimitteln noch höher) und in Schwarzmarktprodukten (Erwartungswert 20 μg pro Darreichungsform) ist für eine UV-Detektion ausreichend hoch. Deuteriertes Clenbuterol ist als interner Standard bei einer UV-Detektion aufgrund gleicher Retentionszeiten mit den undeuterten Clenbuterolenantiomeren

ungeeignet. Daher wurde für die Präparateanalytik R-Propranololhydrochlorid als interner Standard eingesetzt, das nach den Clenbuterolenantiomeren eluiert.

3.1.2 Methodvalidierung

Die Validierung erfolgte unter Berücksichtigung der ICH Guideline Q2(R1) „Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology“. Eine ausführliche Beschreibung, wie die einzelnen Parameter bestimmt worden sind, findet sich in Kapitel 6 „Material und Methoden“.

3.1.2.1 Richtigkeit und Präzision

Gemäß ICH Guideline Q2(R1) „Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology“ ist Richtigkeit definiert als Ausmaß der Übereinstimmung zwischen wahren Wert bzw. als wahr akzeptiertem Wert und dem gefundenen Wert. Für die hier untersuchte Fragestellung wäre dies also das Ausmaß der Übereinstimmung des gemessenen Enantiomerenanteils mit dem tatsächlich in der Probe vorliegenden.

Präzision ist, nach oben genannter Quelle, der Grad der Übereinstimmung zwischen den Einzelwerten einer Messreihe aus Mehrfachbeprobung des (homogenen) Probenmaterials.

Die Bestimmung mittels MS-Detektion zeigte im Gegensatz zur UV-Detektion signifikante Unterschiede zwischen den tatsächlich in der Probe vorhandenen Anteilen S-Clenbuterol und den gemessenen Anteilen (systematische Fehler, Abbildungen 20, 21, 22) sowie deutlich höhere Schwankungen zwischen den Einzelwerten (geringere Präzision).

Folglich wurden die Enantiomerenzusammensetzungen nur mittels UV-Detektion bestimmt.

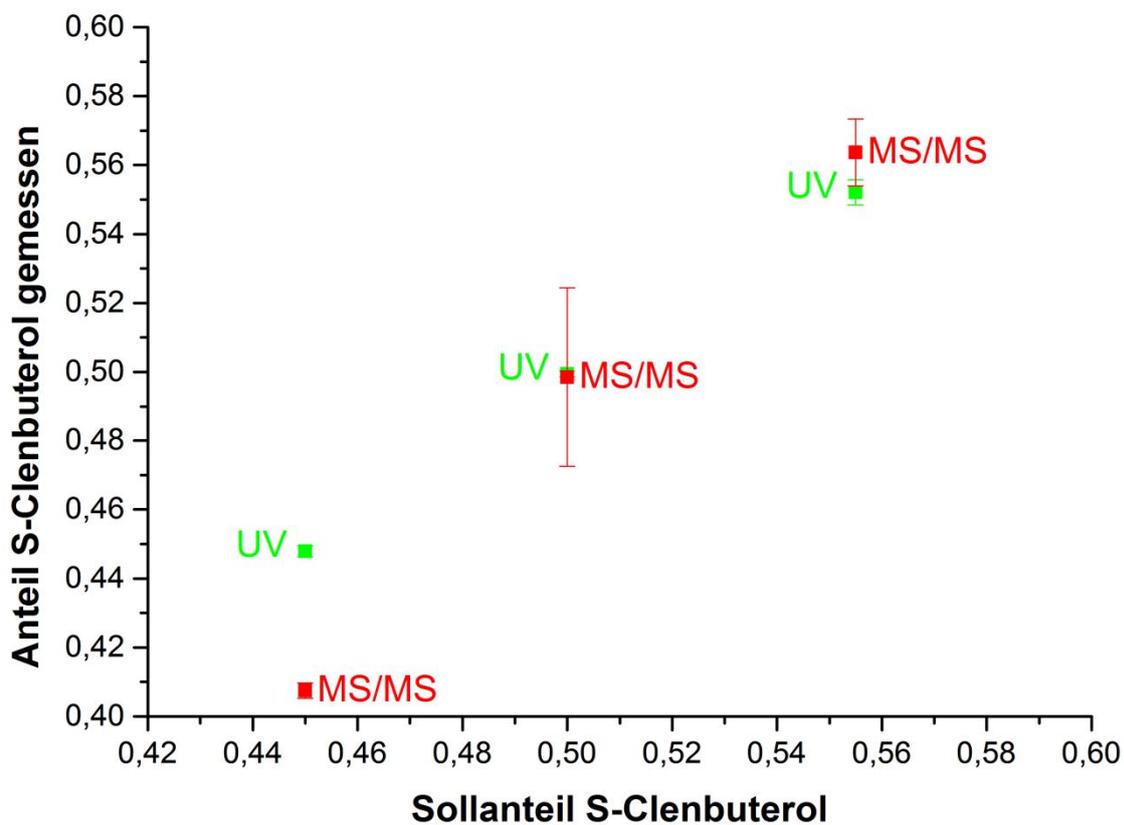


Abbildung 20: Genauigkeit der Bestimmung des S-Clenbuterolanteils mittels MS-MS- bzw. UV-Detektion (Mittelwert mit 95% KI; n=5)

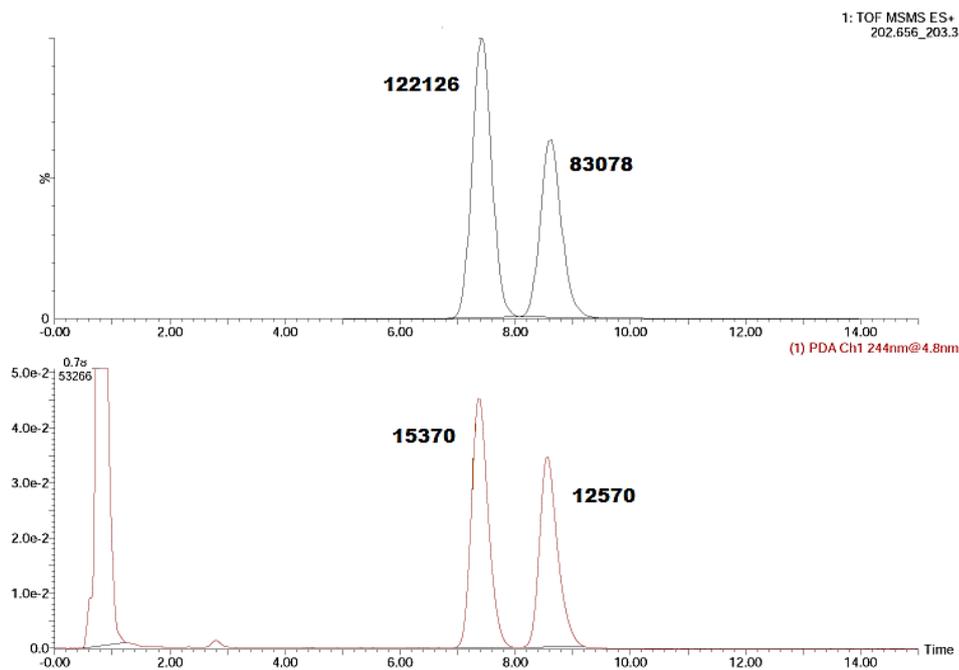


Abbildung 21: Chromatogramm einer mit S-Clenbuterolanteil 0,450 versetzten Probe; oben MS-MS-Spur, unten UV-Spur

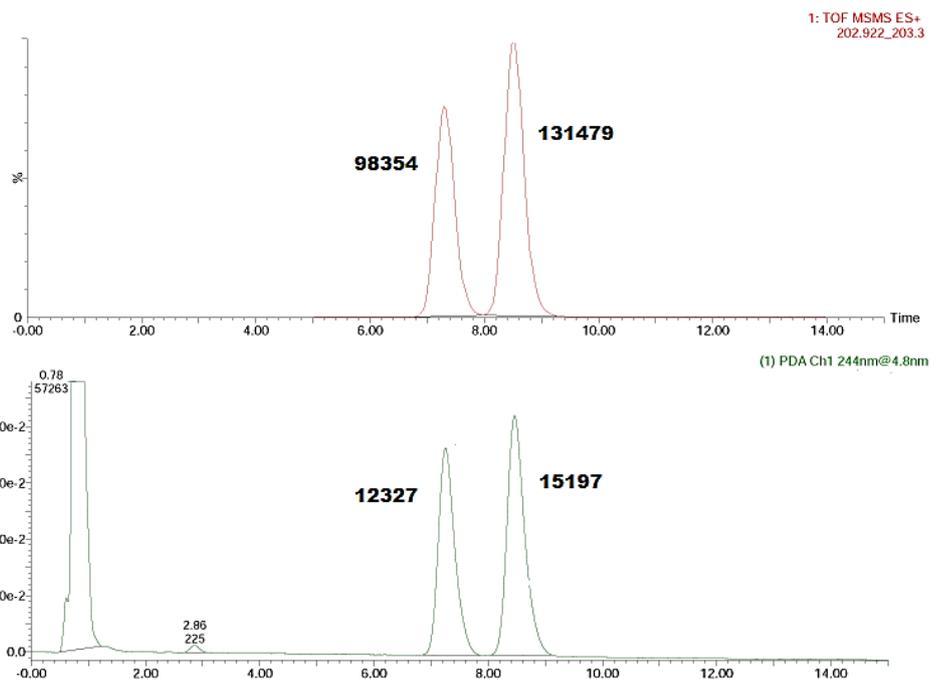


Abbildung 22: Chromatogramm einer mit S-Clenbuterolanteil 0,555 versetzten Probe; oben MS-MS-Spur, unten UV-Spur

Möglicherweise ist die MS-Detektion durch Matrixeffekte beeinflusst, ein in der Massenspektrometrie häufig anzutreffendes Phänomen [94].

3.1.2.2 Wiederfindung

Nach ICH ist die Wiederfindung das Verhältnis des erhaltenen Signals einer zugesetzten Menge Analyt zu einer Leerprobe (Probe ohne Analyt) nach Aufarbeitung der Probe, zu dem eines Signals einer Standardlösung gleicher Menge (=100 %).

Die Wiederfindung lag für jedes Enantiomer deutlich über 90 % (Tabelle 3).

Gemittelte Peakflächen UV (244 nm) in willkürlichen Einheiten (a.u.)			
R-Clenbuterol	S-Clenbuterol	Externer Standard R-Clenbuterol	Externer Standard S-Clenbuterol
9564	9545	10346	10317
Wiederfindung in %			
92,44	92,55		

Tabelle 3: Wiederfindung aus aufgestockter Leermatrix (n=5)

3.1.2.3 Linearität

Gemäß ICH ist die Linearität eines analytischen Verfahrens die Fähigkeit, über einen bestimmten Messbereich Messsignale zu erhalten, die der Analytkonzentration in den Proben direkt proportional sind.

Obwohl von untergeordnetem Interesse, wurde zur Quantifizierung des Clenbuterolgehalts der Arzneimittel und Schwarzmarktprodukte eine Kalibriergerade von 0,1 µg bis 10 µg Clenbuterolhydrochlorid (racemisch) pro Aliquot erstellt. Hierbei wurde auch eine Kalibriergerade für den Übergang m/z 277,19 zu m/z 203,19 aufgenommen, für den Fall, dass durch unbekannte Matrixkomponenten (Schwarzmarktprodukte) eine Quantifizierung über die UV-Spur nicht möglich sein sollte (Abbildung 23).

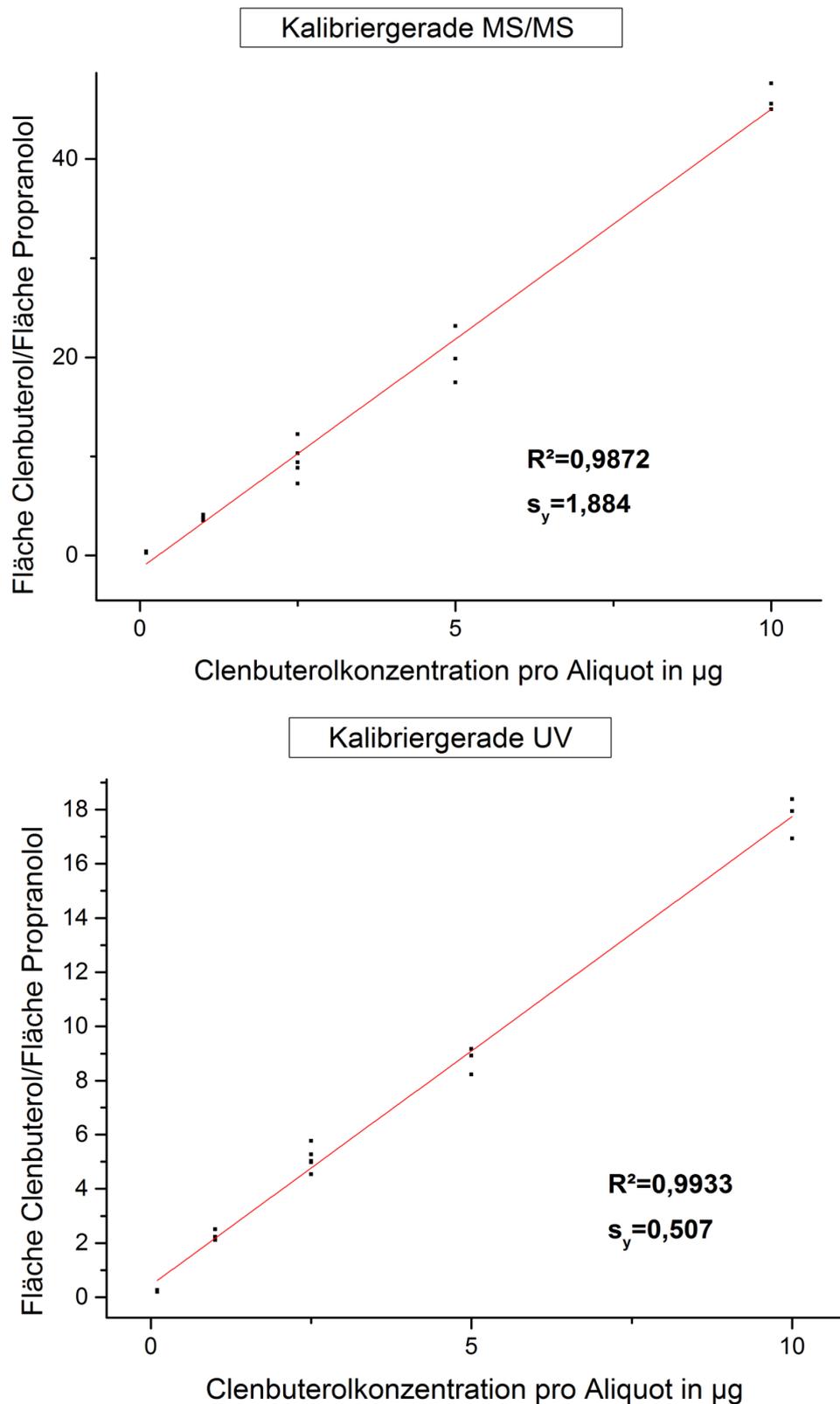


Abbildung 23: Kalibriergeraden von UV- und MS-MS-Detektion

Die Linearität der Geraden wurde mit dem Linearitätstest nach Mandel überprüft und war sowohl für UV-, als auch MS- Detektion gegeben.

3.1.2.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Gemäß ICH Guideline Q2(R1) „Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology“ kann bei Validierung einer Gehaltsbestimmungsmethode aus Arzneiformen auf Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze verzichtet werden (der Gehalt ist ausreichend hoch, siehe Tabelle 4).

Analysezweck Parameter	Identifizierung	Reinheit		Gehalt
		Quantitativ	Grenzwert	
Richtigkeit	-	+	-	+
Präzision	-	+	-	+
Spezifität	+	+	+	+
Nachweisgrenze	-	-	+	-
Bestimmungsgrenze	-	+	-	-
Linearität	-	+	-	+
Arbeitsbereich	-	+	-	+

Tabelle 4: Umfang der analytischen Validierung nach ICH Q2(R1)
+ in der Regel erforderlich, - in der Regel nicht erforderlich

3.1.2.5 Spezifität

Spezifität ist nach ICH die Fähigkeit einer Methode einen Analyten eindeutig in Gegenwart anderer Komponenten zu bestimmen, d.h. ohne Störung durch Matrixkomponenten.

Es zeigten sich in den UV-Spuren keine Interferenzen bei den Retentionszeiten der beiden Clenbuterolenantimere (244 nm) und der des internen Standards R-(+)-Propranolol (292 nm) (Abbildung 24).

3 Ergebnisse und Diskussion

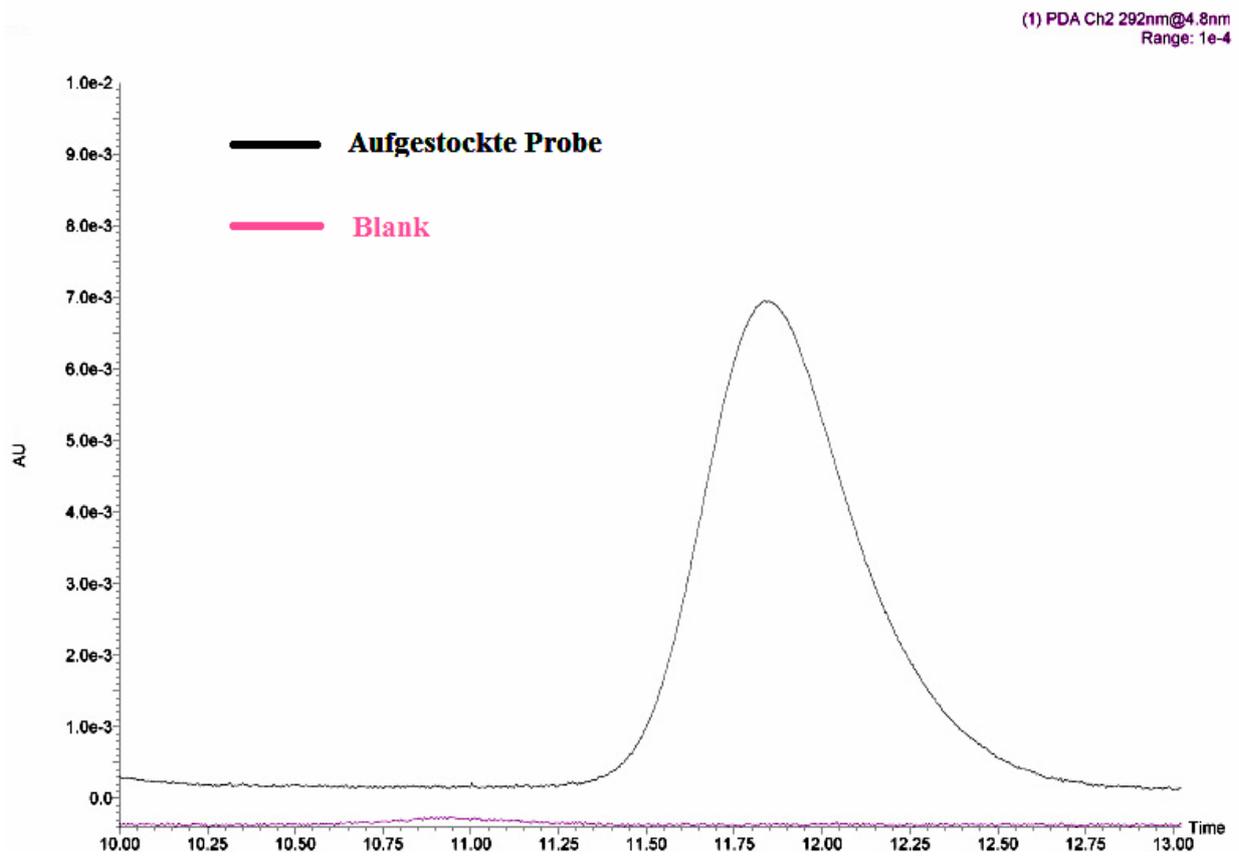
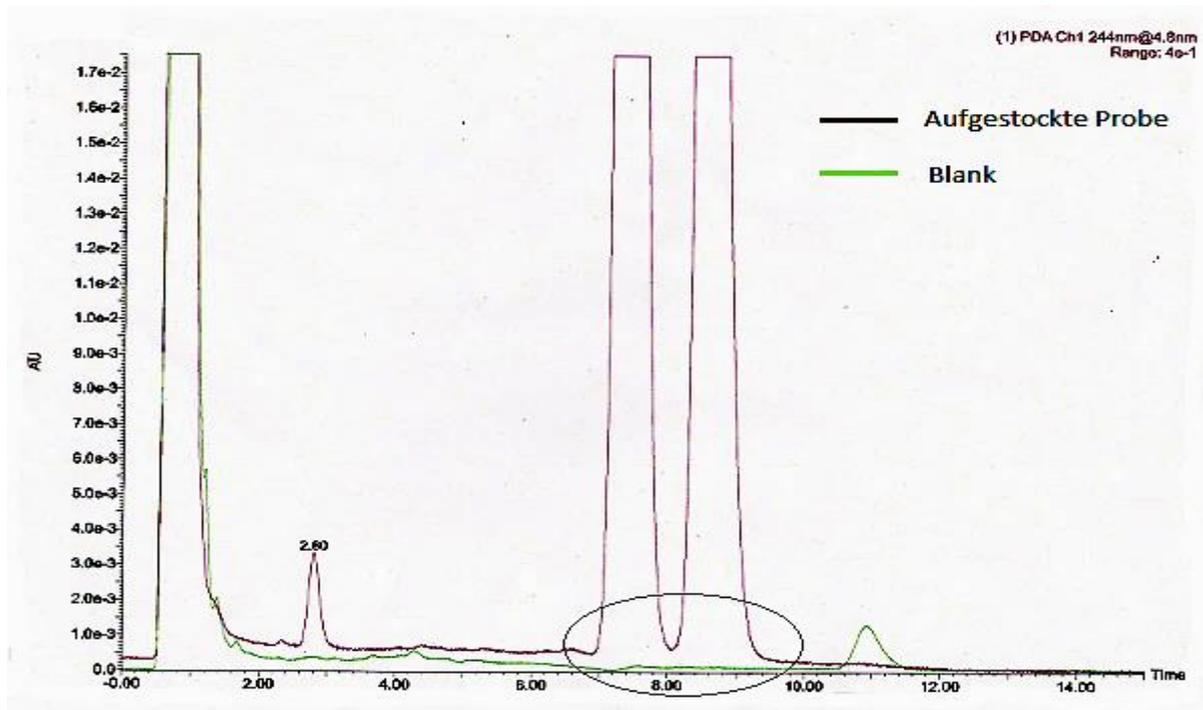


Abbildung 24: Overlaychromatogramme einer Leerprobe und einer aufgestockten Probe, Clenbuterolenantiomere (oben), R-(+)-Propranolol (unten)

3.1.2.6 Fazit zur Methodenentwicklung für Arzneimittel

Für die Anteilsbestimmung der Clenbuterolenantiomere aus Arzneiformen konnte mittels UV-Detektion eine genaue und - durch Überprüfung der UV-Signale mittels Massenspektrometer - auch spezifische Methode gemäß ICH etabliert und validiert werden. Einen Überblick zur Validierung gibt Tabelle 5. Die Robustheit der chromatographischen Methode wird gesondert in Kapitel 3.2 besprochen. Eine Untersuchung der Robustheit der Extraktionsmethode wurde nicht gesondert durchgeführt. Die Richtigkeit der Enantiomerenbestimmung inklusive der Extraktion wurde in Kapitel 3.1.2.1 gezeigt. Durch Abweichungen in der Extraktionsprozedur (vgl. Kapitel 6.4.5) wie z. B. Verweilzeit der Probe in den Kartuschen oder dem zur Elution verwendeten Lösungsmittelvolumen sollten keinerlei stereoselektive Effekte verbunden sein, die die Anteilsbestimmung beeinträchtigen. Allenfalls ist damit zu rechnen, dass ggf. insgesamt weniger Clenbuterol (racemisch) extrahiert wird, dies hat aber keinen Einfluss auf den in der Probe enthaltenen Anteil S-Clenbuterol. Auf dieser Anteilsbestimmung und nicht auf einer Quantifizierung lag aber der Fokus der Arbeit. Analoge Überlegungen gelten für die Extraktionsmethode zur Bestimmung des S-Clenbuterolanteils in Humanurin.

Parameter	UV 244 nm	
Anteil 0,450	0,448±0,002	
Anteil 0,500	0,499±0,001	
Anteil 0,555	0,552±0,004	
Präzision Gehalt Tag I bei 2,5 µg (Gesamtclenbuterol, bestimmt als Hydrochlorid)	0,26 %	
Präzision Gehalt Tag II bei 2,5 µg	0,16 %	
Präzision Gehalt zwischen den Tagen bei 2,5 µg	0,96 %	
Wiederfindung bei 2,5 µg	R-Clenbuterol	S-Clenbuterol
	92,44 %	92,55 %

Tabelle 5: Übersicht zur Methodenvalidierung der Präparateanalytik

3.2 Anwendbarkeit von HPLC-Modellingssoftware zur Robustheitsprüfung chiraler Trennungen

Die Robustheit einer Methode beschreibt ihr Vermögen, in Abhängigkeit von Variationen der Methodenparameter zuverlässige und richtige Ergebnisse zu liefern. Bei chromatographischen Methoden sind dies üblicherweise Parameter, die einen Einfluss auf die Auflösung (R_s) der zu trennenden Peaks haben, wie zum Beispiel: pH-Wert der mobilen Phase, Zusammensetzung der mobilen Phase, Fließgeschwindigkeit, Temperatur etc.

Im Rahmen der eingangs erwähnten Vorversuche (Kapitel 3.1.1) wurde als kritischer Parameter für die Trennung der beiden Clenbuterolenantiomere die Ionenstärke bzw. Additivkonzentration ausgemacht. So zeigt sich bei einer Zunahme der Ammoniumformiatkonzentration von 2,5 mM auf 10 mM (in Methanol) eine deutliche Abnahme der Auflösung (0,5 ml/min, 30 °C, Astec Chirobiotic V2:150 x 21 mm; 5 μ m), siehe Abbildung 25.

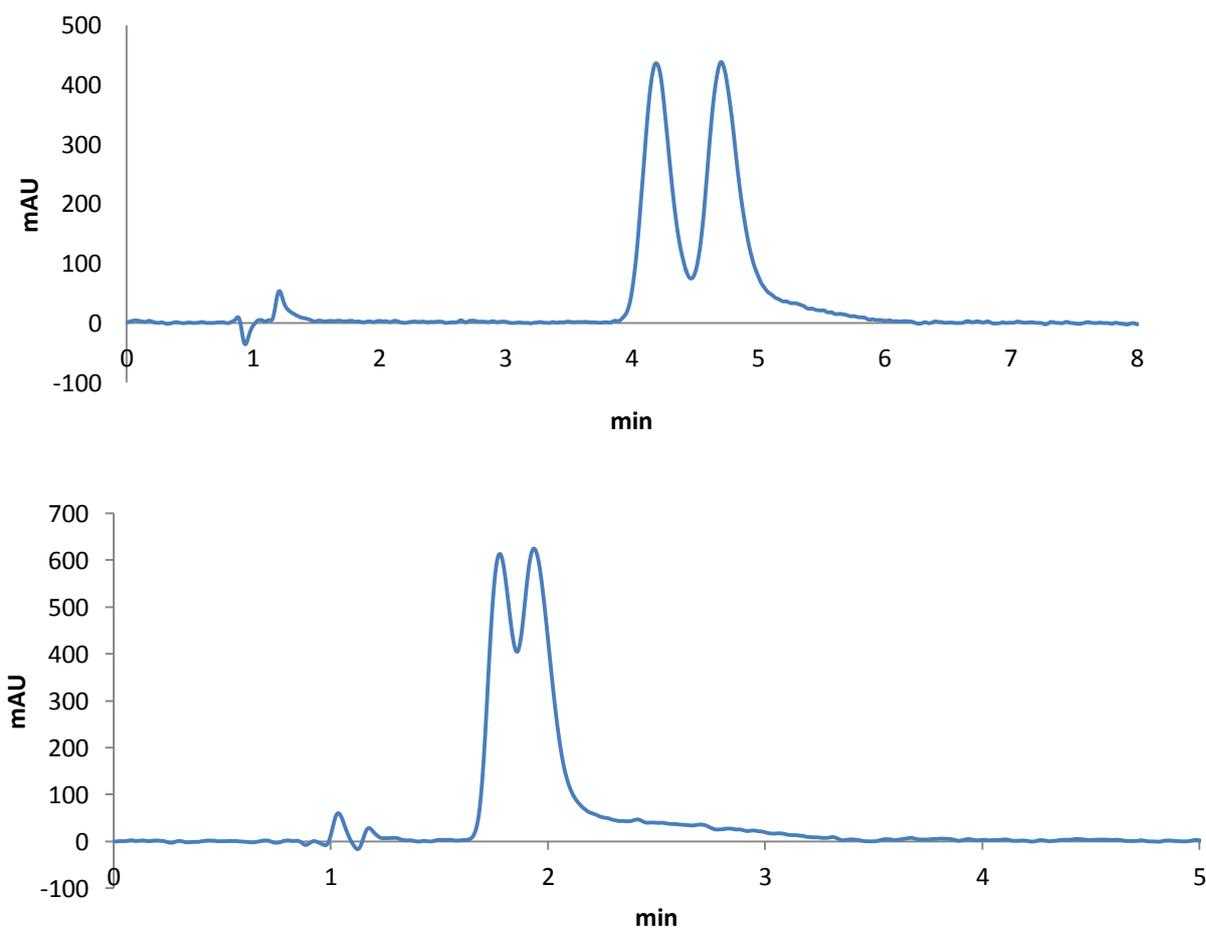


Abbildung 25: Chromatogramme der Clenbuterolenantiomere bei verschiedenen Ionenstärken (2,5 mM Ammoniumformiat (oben) und 10 mM Ammoniumformiat (unten))

Die mobile Phase, die letztlich eine Basislinientrennung ermöglichte und zur Analytik der Arzneiformen verwendet wurde, besteht aus Methanol mit 0,02 % Additivgemisch aus Triethylamin und Essigsäure (genaue Bedingungen in Kapitel 6.2.2). Dabei sind die Enantiomere basisliniengetrennt (Abbildung 18, A)

Um zu überprüfen, ob auch bei dieser Additivzusammensetzung eine solch drastische Abhängigkeit der Auflösung von der Additivkonzentration besteht, wurden Chromatogramme mit 0,01 % bzw. 0,03 % Additivzusatz im Fließmittel aufgenommen. Dabei zeigte sich im Wesentlichen nur eine Verschiebung der Retentionszeit, die Auflösung blieb erhalten (Abbildung 26).

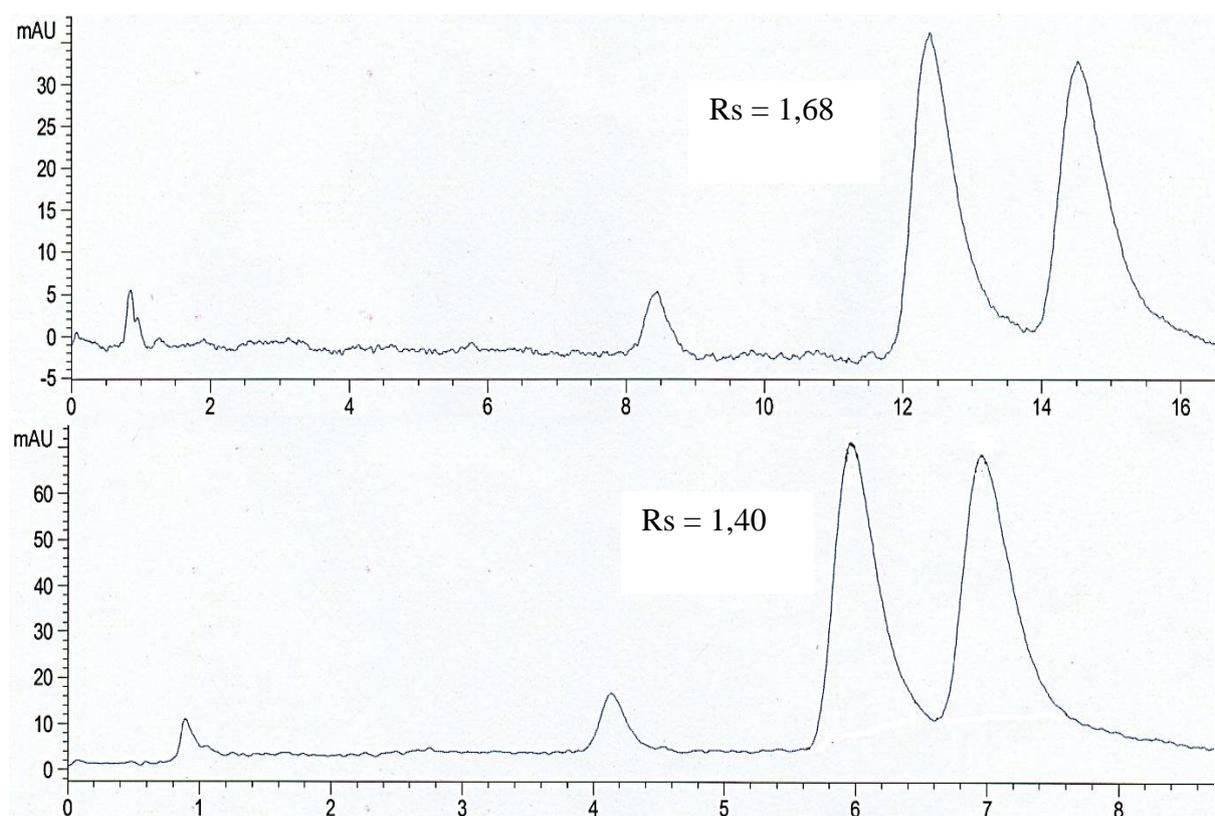


Abbildung 26: Chromatogramme bei 0,01 % (oben) und 0,03 % (unten) Additivzusatz

Schwankungen in der Additivkonzentration, die z.B. durch Pipettierfehler entstehen könnten, sollten deutlich geringer ausfallen, als die in diesem Versuch gewählten Bedingungen. Zusätzlich wurde die Möglichkeit der Vorhersagbarkeit der Trennung mit der Chromatographie-Modellingsoftware DryLab[®] untersucht. Dazu wurden die drei oben angegebenen Bedingungen als Eckpunktläufe zur Erstellung einer sogenannten resolution map (Diagramm der vorhergesagten Auflösung in Abhängigkeit von Bedingungen innerhalb

der Eckpunkte) in die Software eingegeben. Damit erzeugt die Software *in silico* Chromatogramme für alle Additivzusätze zwischen 0,01% und 0,03% und berechnet die zugehörigen hypothetischen Auflösungen (Abbildung 27).

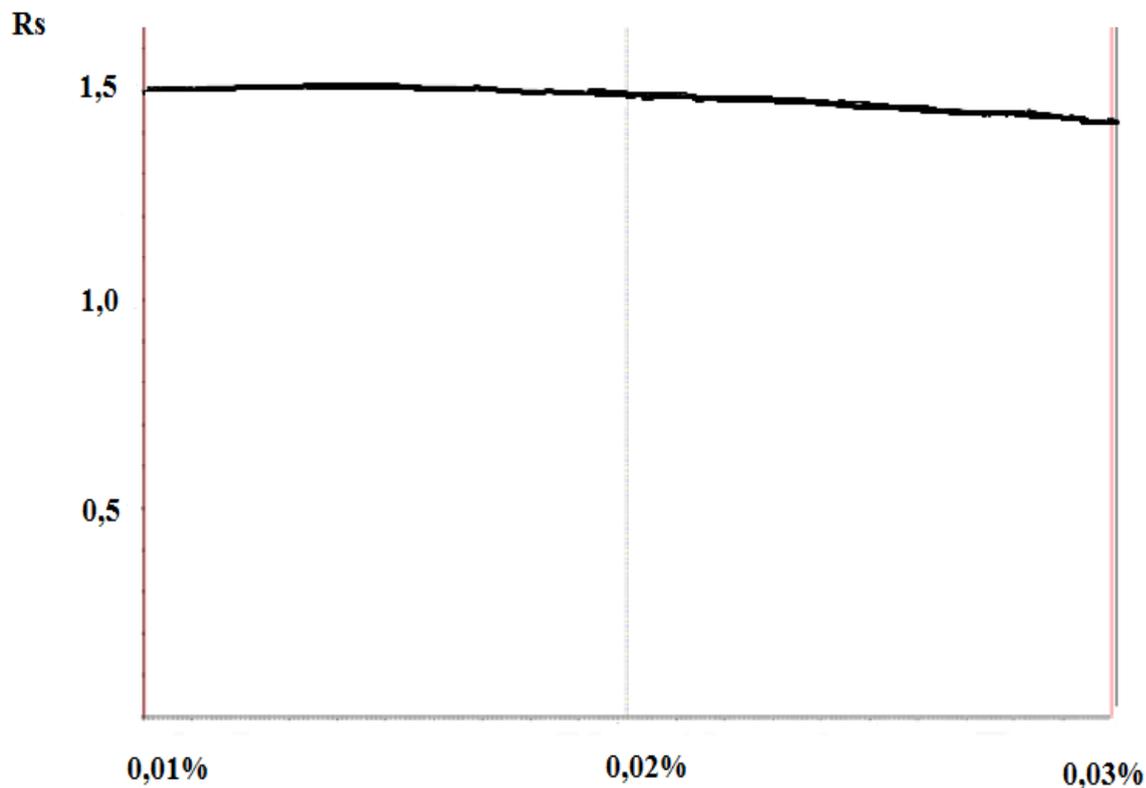


Abbildung 27: Resolution map für die Trennung mit unterschiedlichen Additivzusätzen

Zur Verifizierung des so erstellten Modells wurden die *in silico* generierten Chromatogramme für die Additivkonzentrationen 0,015% und 0,025% mit experimentell ermittelten Verifizierungsläufen verglichen (Tabelle 6).

0,015% Additivkonzentration			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
R-Clenbuterol	9,27	9,5	2,5
S-Clenbuterol	10,90	11,22	2,9
	Rs vorhergesagt	Rs gemessen	Abweichung %
Clenbuterol	1,51	1,62	6,8
0,025% Additivkonzentration			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
R-Clenbuterol	6,66	6,86	2,8
S-Clenbuterol	7,79	8,02	3,0
	Rs vorhergesagt	Rs gemessen	Abweichung %
Clenbuterol	1,46	1,47	0,7

Tabelle 6: Vergleich vorhergesagter und gemessener Retentionszeiten der Clenbuterolenantiomere bei 0,015 % und 0,025 % Additivkonzentration

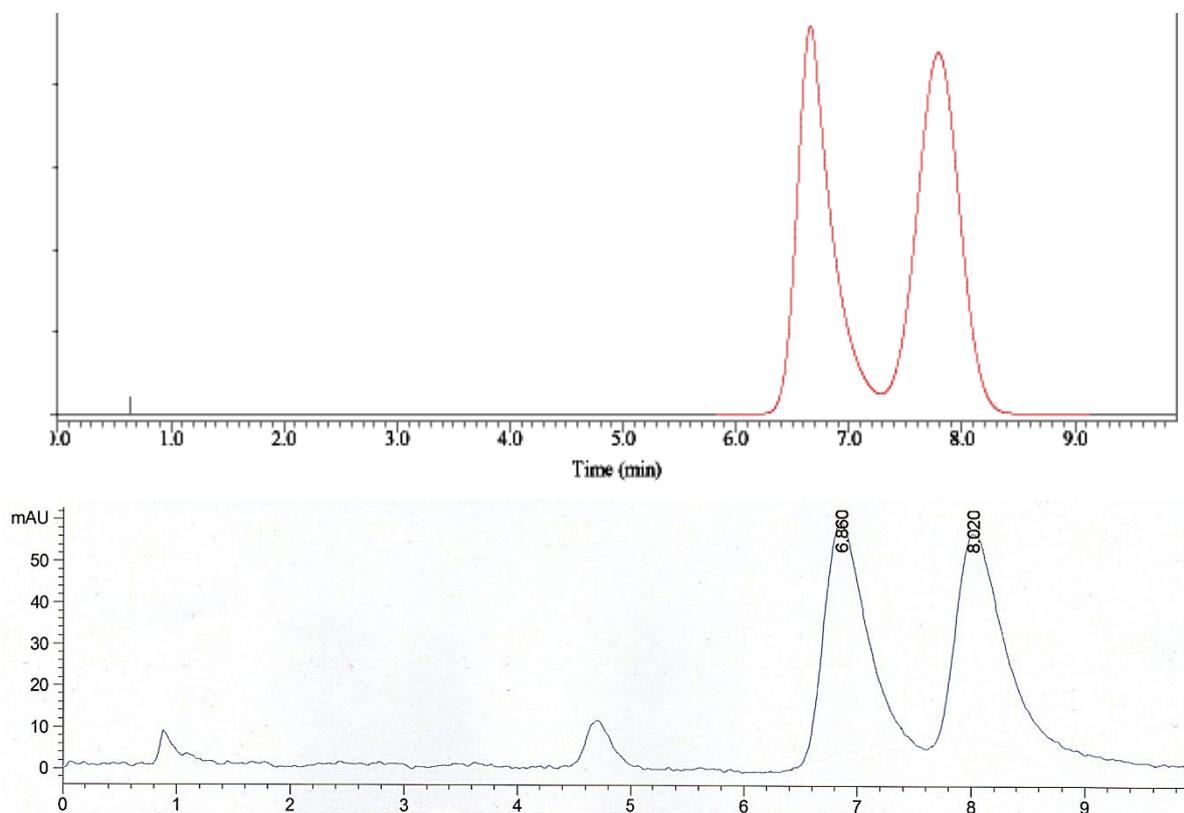


Abbildung 28: Vorhergesagtes (oben) und gemessenes Chromatogramm (unten) bei 0,025 % Additivzusatz

Die experimentell ermittelten Chromatogramme stimmen mit denen von DryLab[®] vorhergesagten gut überein (Abbildung 28). Es kann also davon ausgegangen werden, dass das *in silico*-Modell verifiziert und die Methode robust gegenüber dem kritischsten Einflussfaktor (Additivkonzentration) ist.

Aufgrund der sehr guten Übereinstimmung wurde die allgemeine Anwendbarkeit von DryLab[®] für chirale Trennungen im Umkehrphasenmodus an weiteren Stoffen und mit unterschiedlichen Parametern überprüft.

Dazu wurden im ersten Schritt diverse racemische Verbindungen Screeningläufen verschiedener Parameter wie: Art des Fließmittels, pH-Wert der mobilen Phase, Ionenstärke und Temperatur unterzogen, um Verbindungen herauszufiltern, für die die verwendete Säule (Astec Chirobiotic V2, 150 mm x 2,1 mm, 5 µm) eine ausreichende Selektivität aufweist. Zugleich konnte so schon ein Hinweis auf die für die jeweilige Trennung kritischen Einflussgrößen erhalten werden. Analog der oben geschilderten Vorgehensweise wurden dann Eckpunktläufe für diese Einflussgrößen aufgenommen, mit der DryLab[®] Software Modelle respektive resolution maps erstellt und Verifizierungsläufe zur Bestätigung des Modells durchgeführt. Dabei wurden die untersuchten Verbindungen, um die Equilibrierung des chromatographischen Systems zu gewährleisten, bei jeder Parameteränderung so oft eingespritzt, bis sich die Retentionszeit nicht mehr wesentlich veränderte.

Die chromatographischen Trennungen des Neuroleptikums Promethazin und des Malariatherapeutikums Mefloquin (Abbildung 29) zeigten Abhängigkeit von der Ionenstärke und dem Methanolanteil des Fließmittels, die Trennung Promethazins zusätzlich von der Säulentemperatur.

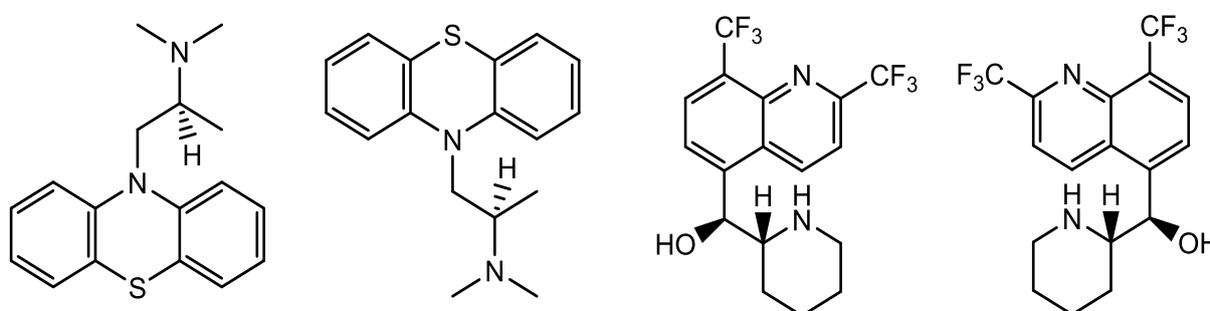


Abbildung 29: Strukturformeln von S-Promethazin, R-Promethazin, (S,R)-Mefloquin und (R,S)-Mefloquin (v.l.n.r.)

Hier konnten zweidimensionale resolution maps, die die Auflösung in Abhängigkeit zweier Parameter darstellen, erstellt werden.

In den resolution maps (Abbildung 30) blau dargestellt sind Regionen, d.h. chromatographische Bedingungen, bei denen die Auflösung des kritischen Peakpaars, in diesem Fall der beiden Enantiomere, gering ist; rot dargestellt sind Regionen mit hoher Auflösung.

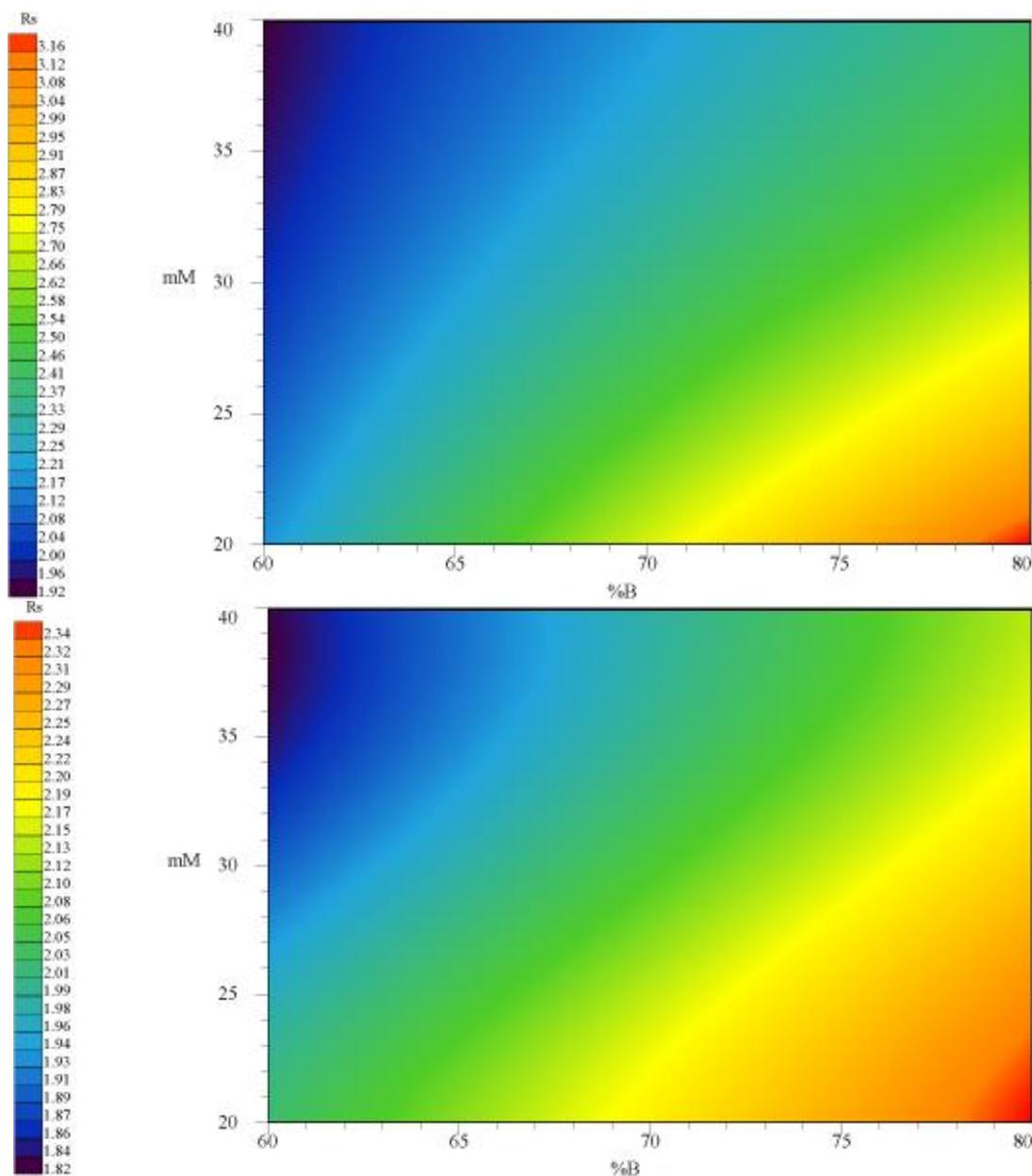


Abbildung 30: Resolution maps zur Trennung der Promethazin- (oben) und Mefloquinenantiomere (unten); Ionenstärke gegen % B

Zur Verifizierung des Modells wurden anschließend *in silico* erzeugte Chromatogramme experimentell überprüft (Tabelle 7, Abbildung 31).

25 mM Ammoniumacetat, 70 % Methanol			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
Promethazin Enantiomer 1	8,78	8,16	7,3
Promethazin Enantiomer 2	11,39	10,55	8,2
Mefloquin Enantiomer 1	8,65	7,45	15,3
Mefloquin Enantiomer 2	11,36	9,73	16,5
	Rs vorhergesagt	Rs gemessen	Abweichung %
Promethazin	2,05	1,78	13,3
Mefloquin	2,14	2,07	3,4
25 mM Ammoniumacetat, 75 % Methanol			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
Promethazin Enantiomer 1	7,86	7,55	4,6
Promethazin Enantiomer 2	10,42	9,95	4,2
Mefloquin Enantiomer 1	8,57	7,77	10,3
Mefloquin Enantiomer 2	11,37	10,27	10,7
	Rs vorhergesagt	Rs gemessen	Abweichung %
Promethazin	2,22	1,98	10,8
Mefloquin	2,22	2,36	6,3
35 mM Ammoniumacetat, 70 % Methanol			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
Promethazin Enantiomer 1	7,23	6,83	6,1
Promethazin Enantiomer 2	9,13	8,66	5,3
Mefloquin Enantiomer 1	6,90	6,13	12,3
Mefloquin Enantiomer 2	8,90	7,90	12,7
	Rs vorhergesagt	Rs gemessen	Abweichung %
Promethazin	1,84	1,56	15,2
Mefloquin	2,00	1,84	8,0
35 mM Ammoniumacetat, 75 % Methanol			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
Promethazin Enantiomer 1	6,56	6,25	5,0
Promethazin Enantiomer 2	8,40	8,01	5,0
Mefloquin Enantiomer 1	6,78	6,14	10,4
Mefloquin Enantiomer 2	8,84	7,99	10,5
	Rs vorhergesagt	Rs gemessen	Abweichung %
Promethazin	1,95	1,75	10,3
Mefloquin	2,08	2,08	0,2

Tabelle 7: Vergleich vorhergesagter und gemessener Retentionszeiten der Promethazin- und Mefloquinenantiomere bei unterschiedlichen Ionenstärken und Methanolanteilen der mobilen Phase

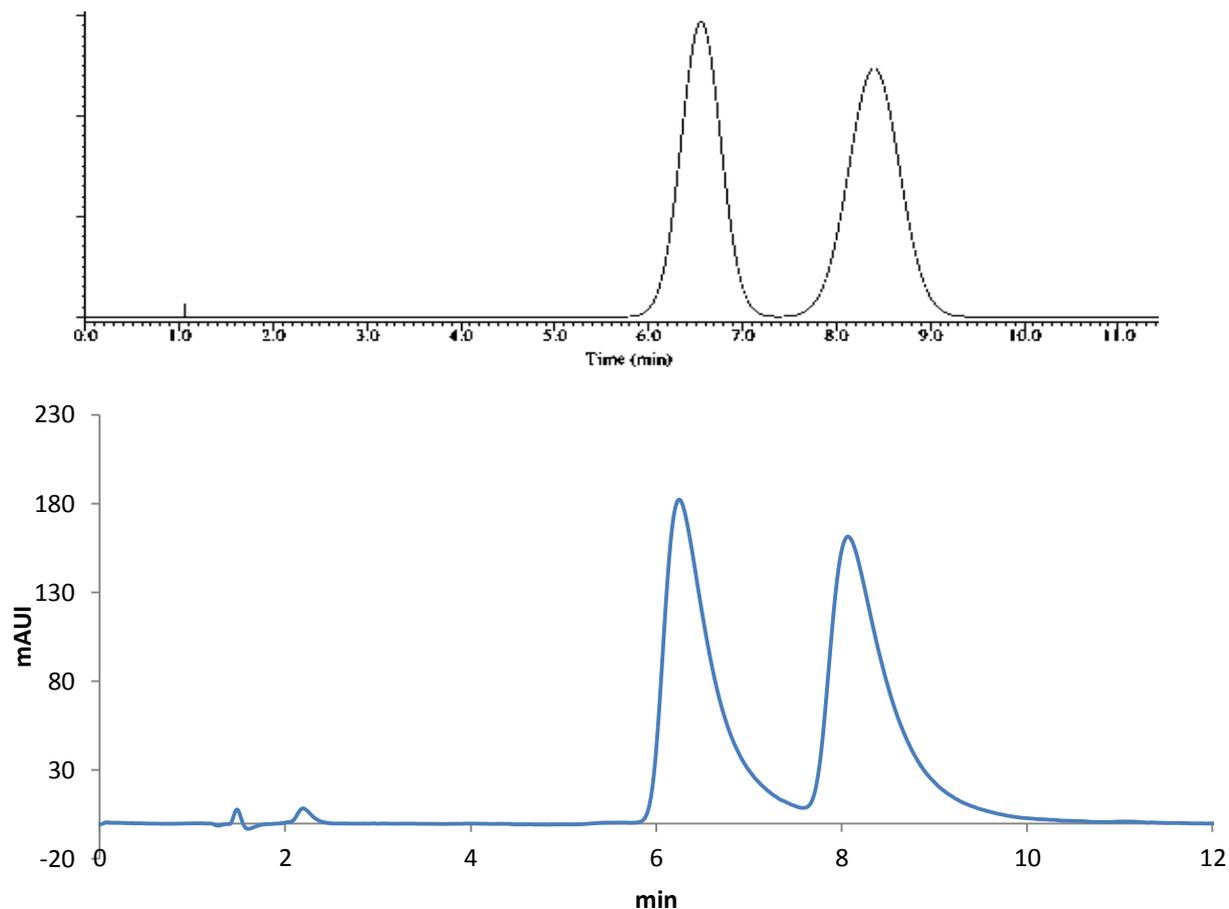


Abbildung 31: Trennung der Promethazinenantiomere bei 35 mM Ammoniumacetat und 75 % Methanol; von DryLab[®] vorhergesagt (oben) und experimentell ermittelt (unten)

Für Promethazin wurde, wie oben genannt, ein weiteres Modell aus vier Eckpunktläufen zu 60 % und 80 % Methanolanteil, bei jeweils 20 °C und 60 °C Säulentemperatur erstellt (um die Laufzeit zu verkürzen bei einer Ionenstärke von 40 mM; Abbildung 32) und anschließend verifiziert (Tabelle 8).

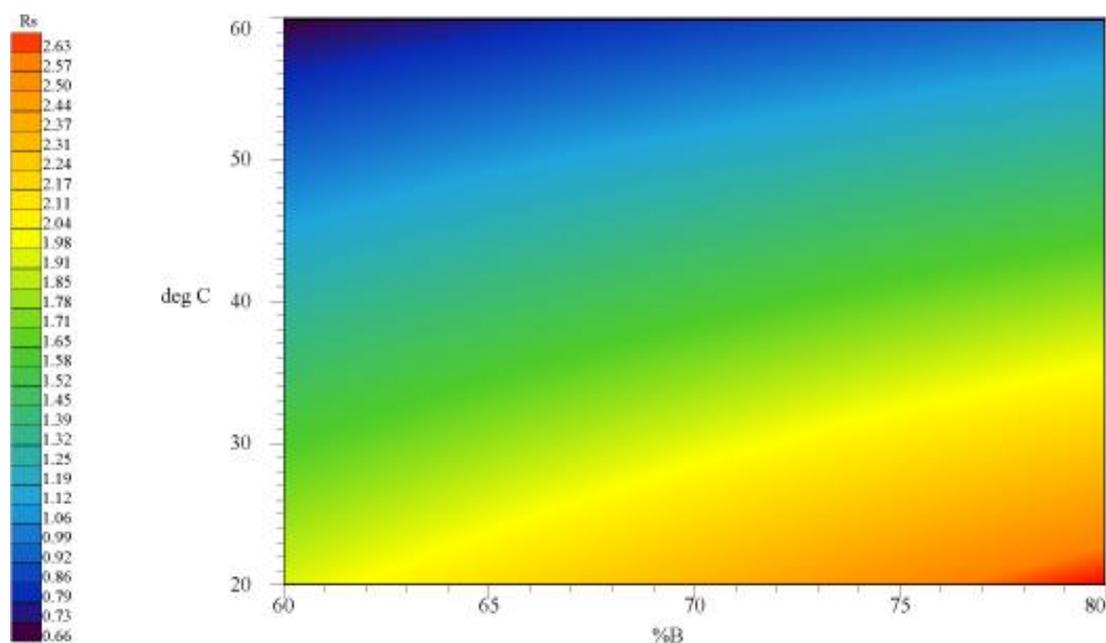


Abbildung 32: Resolution map zur Trennung der Promethazinenantiomere; Säulentemperatur gegen % B (Ionenstärke 40 mM)

40 °C, 70 % Methanol			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
Promethazin Enantiomer 1	6,04	5,62	6,8
Promethazin Enantiomer 2	7,35	6,72	9,4
	Rs vorhergesagt	Rs gemessen	Abweichung %
Promethazin	1,55	1,3	16,1
30 °C, 80 % Methanol			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
Promethazin Enantiomer 1	5,56	5,58	< 0,1
Promethazin Enantiomer 2	7,39	7,29	1,4
	Rs vorhergesagt	Rs gemessen	Abweichung %
Promethazin	2,23	1,66	25,6
30 °C, 60 % Methanol			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
Promethazin Enantiomer 1	8,69	8,47	2,6
Promethazin Enantiomer 2	10,63	10,30	3,1
	Rs vorhergesagt	Rs gemessen	Abweichung %
Promethazin	1,59	1,12	29,5

Tabelle 8: Vergleich vorhergesagter und gemessener Retentionszeiten der Promethazinenantiomere bei unterschiedlichen Säulentemperaturen und Methanolanteilen der mobilen Phase

Bei den bisher mit der DryLab[®] Software im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Trennungen handelt es sich allesamt um basische Verbindungen. Um auch andere Substanzklassen zu berücksichtigen, wurde auch die Chromatographie der vinylogenen Carbonsäure Warfarin (Antikoagulant; Abbildung 33) hinsichtlich pH-Wert und Acetonitrilanteil der mobilen Phase, sowie Säulentemperatur modelliert.

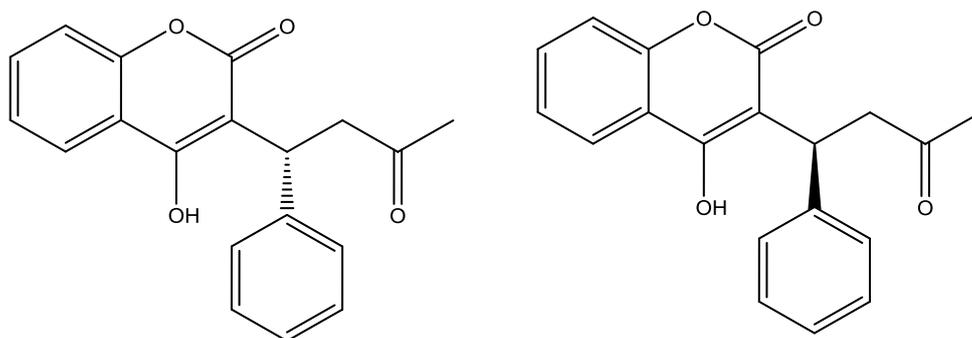


Abbildung 33: Strukturformeln von R-Warfarin (links) und S-Warfarin (rechts)

Die pH-Abhängigkeit der Trennung wurde mittels einer eindimensionalen resolution map (Abbildung 34) aus drei Eckpunktläufen bei pH 4,0, 5,0 und 6,0 erstellt (0,5 % Triethylammoniumacetat (TEAA) in Wasser (70 %); pH mit Eisessig bzw. Triethylamin eingestellt, Acetonitril (30 %)). Mit steigendem pH-Wert der mobilen Phase zeigte sich hierbei eine Abnahme der Auflösung zwischen den Enantiomeren bis hin zur Coelution bei pH 6,0. Unter Berücksichtigung des pK_s Wertes des Warfarins von 5,05 wird dieses chromatographische Verhalten nachvollziehbar. Die Verifizierung erfolgte bei pH 4,5 und 5,5 (Tabelle 9, Abbildung 35).

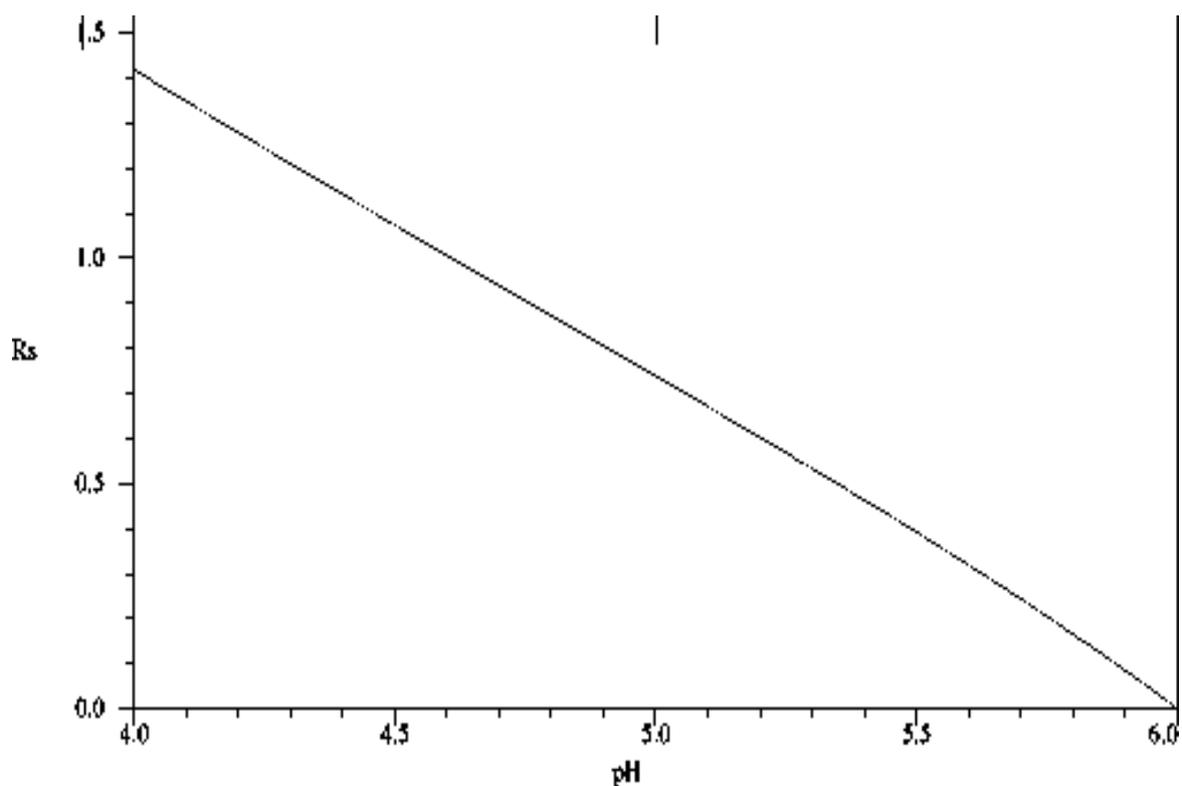


Abbildung 34: Resolution map zur pH-abhängigen Trennung der Warfarinenantimere

pH 4,5			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
Warfarin Enantiomer 1	4,76	4,68	1,7
Warfarin Enantiomer 2	5,45	5,41	< 0,1
	R_s vorhergesagt	R_s gemessen	Abweichung %
Warfarin	1,07	1,11	3,6
pH 5,5			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
Warfarin Enantiomer 1 und 2 (Coelution)	4,11	3,85	6,8
	R_s vorhergesagt	R_s gemessen	Abweichung %
Warfarin	0	0,4	-

Tabelle 9: Vergleich vorhergesagter und gemessener Retentionszeiten der Warfarinenantimere bei unterschiedlichen pH-Werten der mobilen Phase

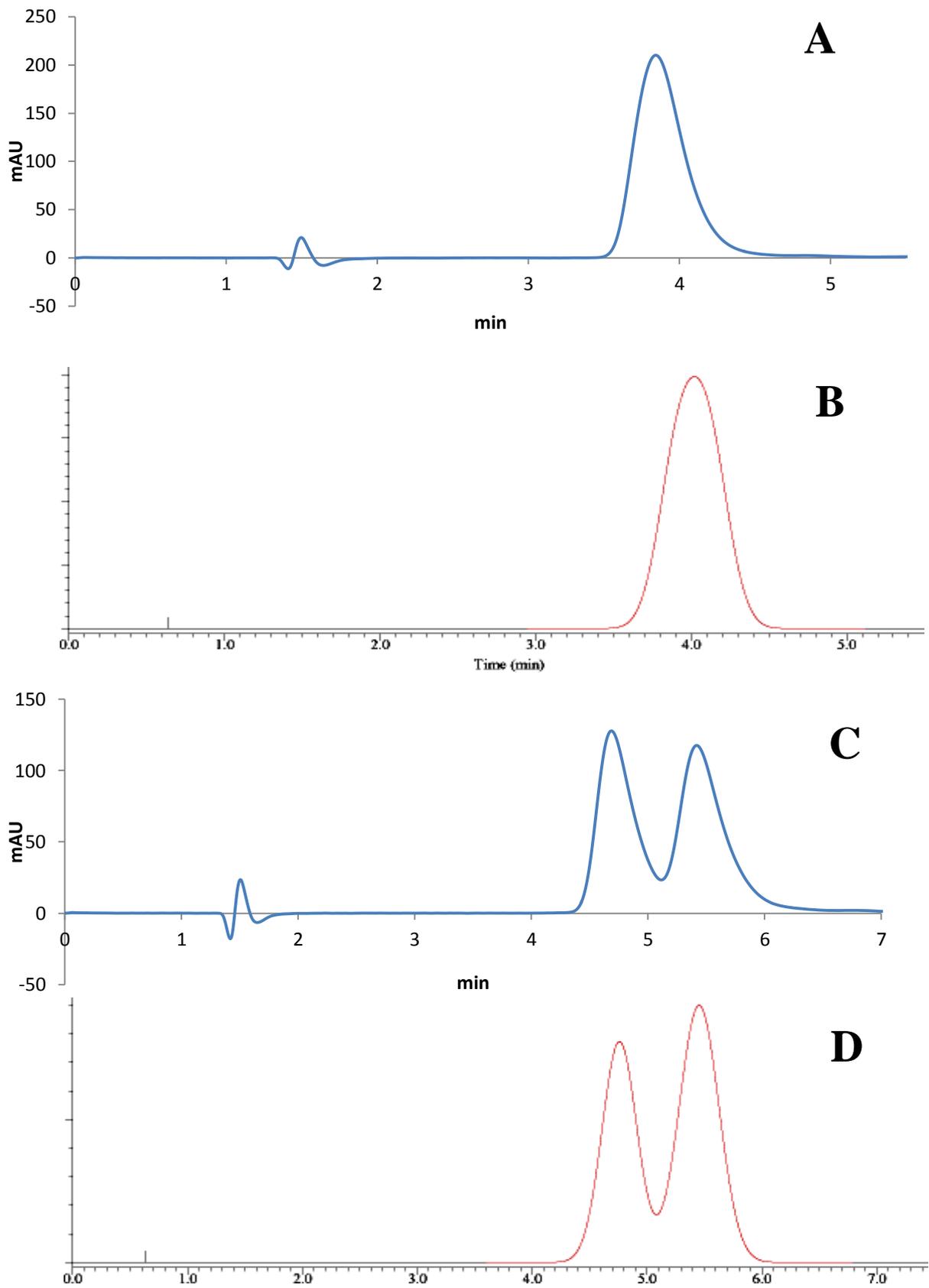


Abbildung 35: Vergleich gemessener (A, pH 5,5; C, pH 4,5) und vorhergesagter (B, pH 5,5; D, pH 4,5) Chromatogramme der Warfarinenantimere bei unterschiedlichen pH-Werten der mobilen Phase

Zur weiteren Optimierung der Trennung wurde bei einem konstantem pH-Wert von 4,0 (hier war bereits eine Basislinientrennung gegeben) der Einfluss der Säulentemperatur und des Acetonitrilanteils der mobilen Phase modelliert (30 °C und 60 °C je 10 % und 30 % Acetonitril; vier Eckpunkte; Abbildungen 36 und 37, Tabelle 10).

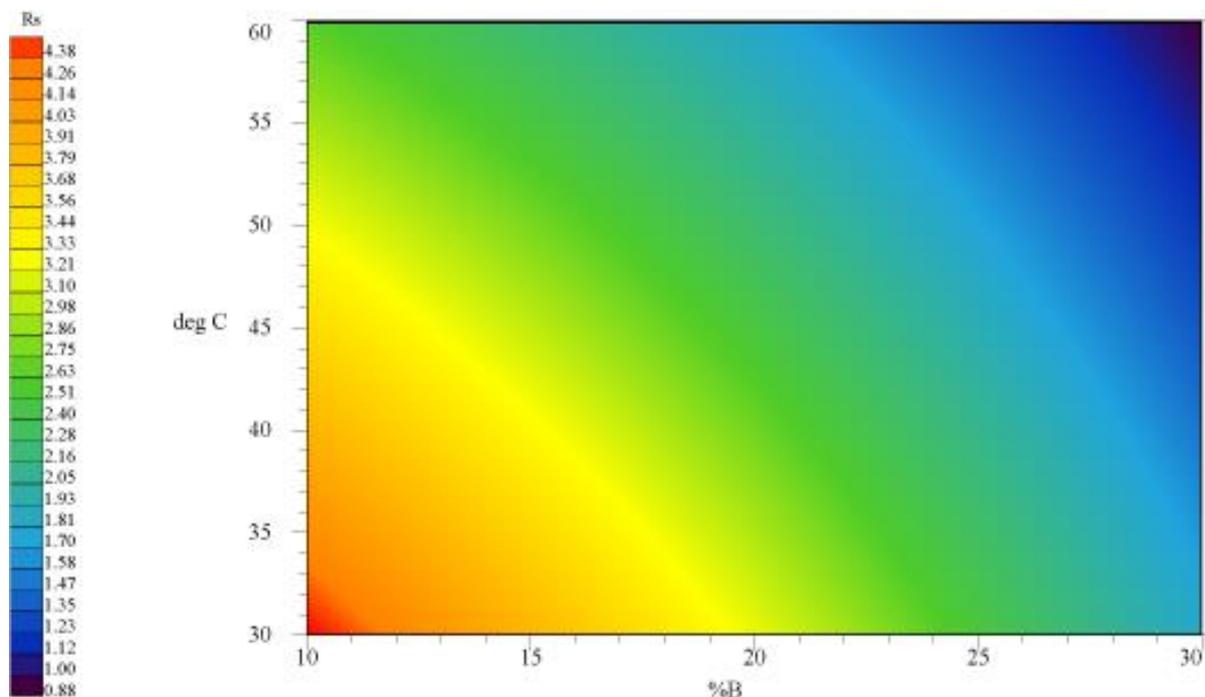


Abbildung 36: Resolution map zur Trennung der Warfarinenantimere; Säulentemperatur gegen % B (pH=4,0)

50 °C, 15 % Acetonitril			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
Warfarin Enantiomer 1	15,76	14,84	6,2
Warfarin Enantiomer 2	20,92	19,37	8,0
	Rs vorhergesagt	Rs gemessen	Abweichung %
Warfarin	2,72	2,46	9,5
40 °C, 20 % Acetonitril			
	t_r vorhergesagt min	t_r gemessen min	Abweichung %
Warfarin Enantiomer 1	11,49	10,47	9,5
Warfarin Enantiomer 2	15,18	13,47	12,7
	Rs vorhergesagt	Rs gemessen	Abweichung %
Warfarin	2,68	2,14	20,2

Tabelle 10: Vergleich vorhergesagter und gemessener Retentionszeiten der Warfarinenantimere bei unterschiedlichen Acetonitrilanteilen und Säulentemperaturen

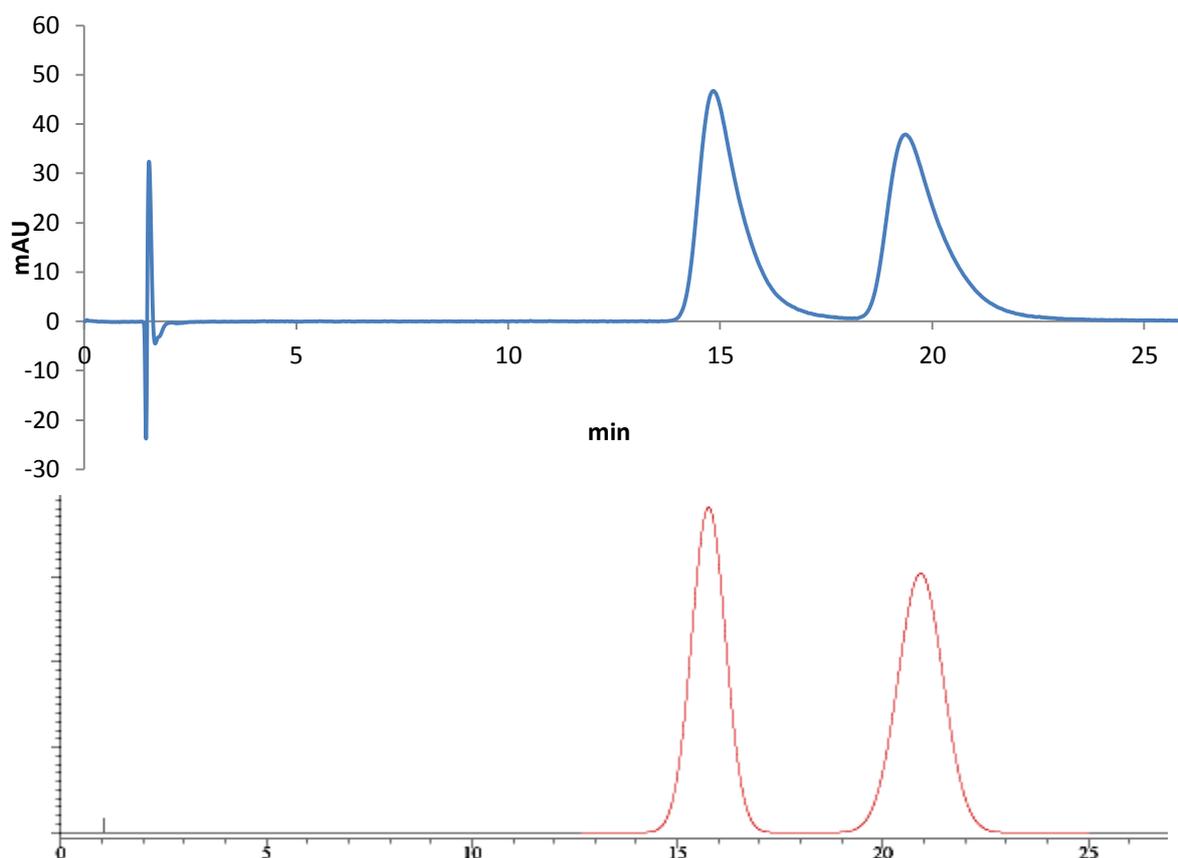


Abbildung 37: Vergleich des bei 50 °C, 15 % Acetonitril gemessenen (oben) und vorhergesagten (unten) Chromatogramms der Warfarinenantiomere

Die Chromatographie der Warfarinenantiomere konnte mittels der DryLab[®] Software von einer ursprünglichen Auflösung von 1,4 zu einer Auflösung von ca. 2,5 optimiert werden. Insgesamt konnte – für die verwendete Säule - die Chromatographie sowohl basischer, als auch saurer Moleküle mittels DryLab[®] hinsichtlich Additivkonzentration, Ionenstärke, Säulentemperatur, pH-Wert der mobilen Phase und dem organischen Anteil des Fließmittels modelliert und vorhergesagt werden. Dabei ließen sich vor allem die Retentionszeiten der Enantiomere sehr gut vorhersagen. Bezüglich der Vorhersagbarkeit der Auflösungen muss konstatiert werden, dass diese zum Teil deutlich stärker vom Modell abwichen. Dies mag an einer, in einigen Fällen von der Realität abweichenden Peaksymmetrie liegen (vgl. Abbildungen 31 und 37). Insbesondere eine Neigung zum Tailing ließ sich schlecht modellieren. Eine Methodenoptimierung einer chiralen Trennung mittels der Software konnte am Beispiel von Warfarin erbracht werden. Es wäre sicher lohnenswert, die Anwendung der DryLab[®] Software für chirale Trennungen anhand weiterer chiraler stationärer Phasen zu überprüfen.

3.3 Analyse von Arzneimitteln und Schwarzmarktprodukten

Im Folgenden wurden mit der entwickelten Methode Proben aller in Deutschland zugelassenen Human- und Veterinärarzneimittel, sowie einige, laut Deklaration clenbuterolhaltige Schwarzmarktprodukte (Abbildung 38), analysiert. Der Fokus lag dabei auf der Anteilsbestimmung des S-Clenbuterols. Eine Kalibriergerade zur Quantifizierung des Gesamtclenbuterolgehalts wurde aber mittels der aufgestockten Leermatrix trotzdem aufgenommen, um vor allem für die Schwarzmarktprodukte eine Aussage über ihren Gehalt treffen zu können.



Abbildung 38: Fotos einiger der untersuchten Schwarzmarktpräparate

Tabelle 11 gibt die Ergebnisse sowohl der Anteilsbestimmung, als auch der Quantifizierung an. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibriergerade aus aufgestockter Spiropent[®] Placebomatrix erstellt (vgl. Kapitel 6.5.3.1).

Präparat	Deklarierter Gehalt Clenbuterolhydrochlorid in µg pro Tablette, falls nicht anders angegeben	Anteil S-Clenbuterol	Gemessener Gehalt Clenbuterolhydrochlorid in µg	
			UV 244 nm	MS/MS 203 UV 244 nm
Spiropent Tablette®*	20	0,499±0,001	18,06±1,52	18,15±0,47
Spasmo-Mucosolvan Tablette®*	10	Keine Bestimmung möglich (Störsignal)	11,84±2,23	Keine Bestimmung möglich (Störsignal)
Spasmo-Mucosolvan Saft®*	5 (auf 5 ml)	0,508±0,017	6,36±1,02 (auf 5 ml)	6,81±1,25 (auf 5 ml)
Ventipulmin Gel®*	25 (auf 1 ml)	0,500±0,0005	19,26±1,29 (auf 1 g)	17,23±1,3 (auf 1 g)
Ventipulmin Granulat®*	16 (auf 1 g)	0,501±0,0007	11,81±0,55 (auf 1 g)	12,82±0,55 (auf 1 g)
Planipart®*	30 (auf 1 ml)	0,500±0,0006	23,87±1,82 (auf 1 ml)	28,04±2,57 (auf 1 ml)
Clenbuterol International Pharmaceuticals	40	0,503±0,0002	14,00±1,12	14,78±1,47
Spiropent Schwarzmarkt	20	0,499±0,001	15,06±1,61	15,84±1,70
Spiropent Comprimidos Euror	k.A.	0,501±0,001	15,36±3,20	15,57±3,19
E.C.A.	k.A.	0,499±0,0007	1034,95±209,67	1929±255 (ohne internen Standard berechnet, da 1: 200 verdünnt)
Anabolic Burner	k.A.	0,500±0,001	19,03±1,75	22,57±2,29
Clenbuteroltabletten (evtl. aus Russland)	k.A.	0,501±0,0002	15,20±2,51	16,57±3,79

Tabelle 11: Ergebnisse der Analytik der in Deutschland zugelassenen Arzneimittel (mit * gekennzeichnet) und Schwarzmarktprodukte (Mittelwert mit 95% KI; n=5 für jedes Präparat)

Alle untersuchten Präparate zeigen einen S-Clenbuterolanteil, der von 0,50 nicht signifikant verschieden ist oder diesem sehr nahe liegt (Abbildung 39).

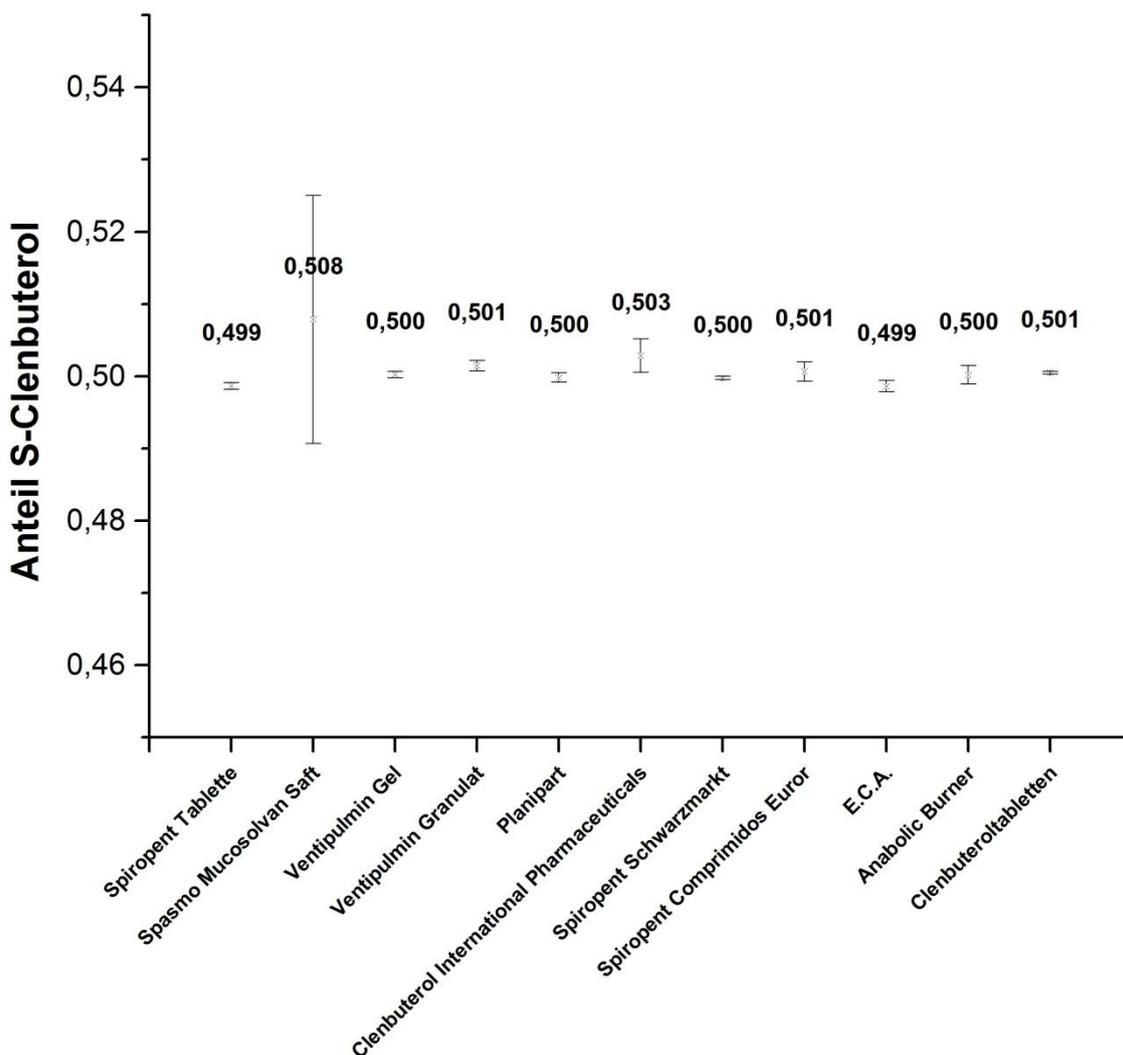


Abbildung 39: Anteile S-Clenbuterol in den untersuchten Präparaten (Mittelwert mit 95% KI; n=5 für jedes Präparat)

Vom Arzneimittel Spasmo-Mucosolvan[®] Tabletten konnte keine Enantiomerenzusammensetzung bestimmt werden, da unbekannte Substanzen zusammen mit R-Clenbuterol eluierten (Abbildung 40).

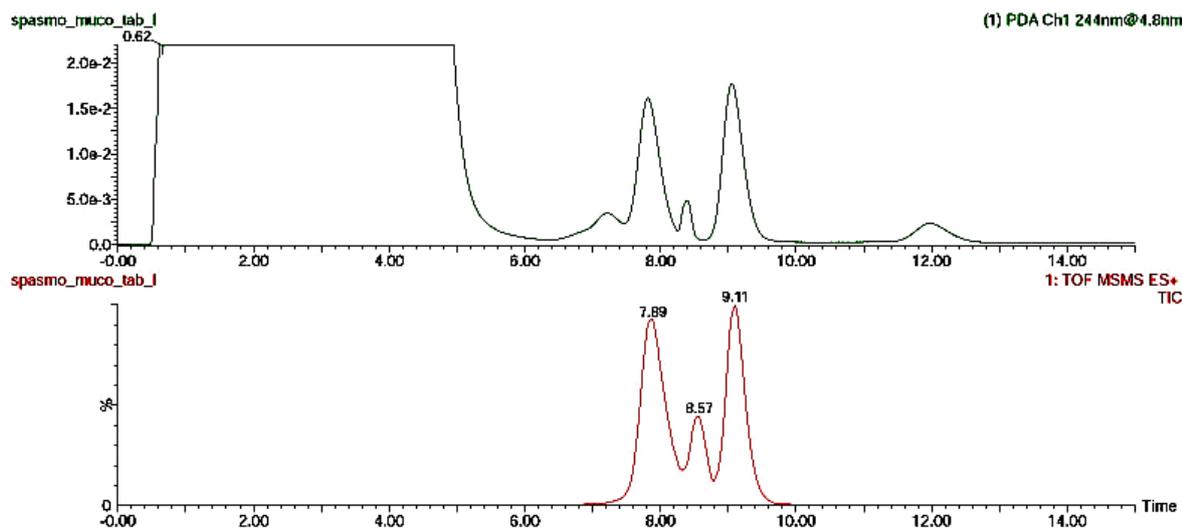


Abbildung 40: Chromatogramm eines Aliquots einer Spasmo-Mucosolvan Tablette (UV-Spur oben, MS/MS-Spur unten)

Alle Gehalte der untersuchten Fertigarzneimittel liegen, bis auf Ventipulmin Granulat[®], in der Toleranz des Europäischen Arzneibuches (2.9.6). Das Präparat Ventipulmin Gel[®] musste zur Analyse abgewogen werden, da die Lösung so hochviskos war, dass sie sich nicht pipettieren ließ.

Ein Problem der Quantifizierung lag in der unbekanntem Zusammensetzung der Schwarzmarktprodukte bzw. der von der Spiropent[®] Tablette abweichenden Matrix der anderen untersuchten Fertigarzneimittel. Dies mag auch den Minderbefund beim Ventipulmin Granulat[®] erklären. Hier wäre für eine optimale Gehaltsbestimmung sicherlich ein Standardadditionsverfahren sowie, wie auch bei den Urinproben, eine Chromatographie mit einer achiralen Säule Methode der Wahl. Im Fokus stand jedoch eine Bestimmung der Enantiomerenanteile und keine Quantifizierung.

Interessante Ergebnisse lieferte das Schwarzmarktpräparat E.C.A. bezüglich des Gehalts. Basierend auf einem Erwartungswert von 20 µg pro Darreichungsform wurden Aliquots eingewogen und aufgearbeitet. Die Säule war dabei jedoch derart überladen (Abbildung 41), dass die injektionsfertigen Rekonstitute aus der Aufarbeitung der Aliquots eins zu zweihundert (!) verdünnt werden mussten, um ein Signal innerhalb der Kalibriergeraden zu liefern (Abbildung 42). Hierbei wurde auch der interne Standard so verdünnt, dass er nur noch in der MS/MS-Spur ein Signal lieferte. Die Berechnung des Gehalts konnte daher für die massenspektrometrische Detektion noch unter Berücksichtigung des internen Standards

erfolgen, für die UV-Detektion allerdings nicht mehr. Auf eine erneute Aufarbeitung kleinerer Aliquote wurde verzichtet, da sich diese nicht mehr präzise hätten abwägen lassen.

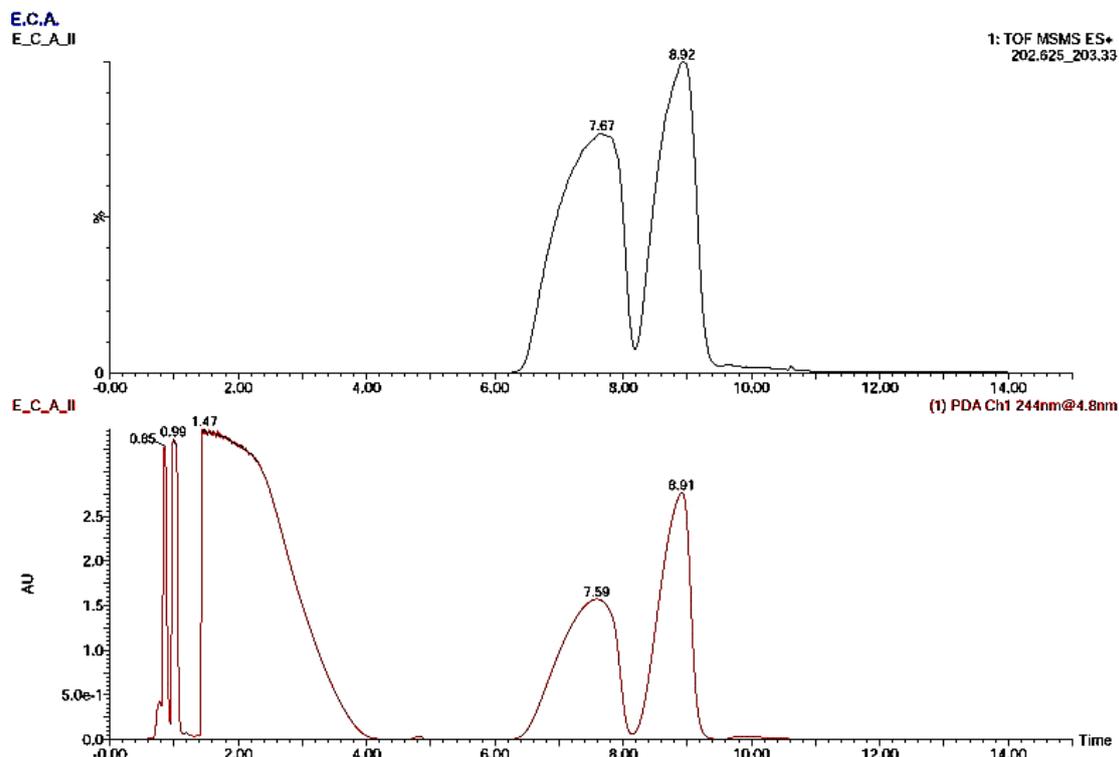


Abbildung 41: Chromatogramm einer unverdünnten Probe des Präparates E.C.A.

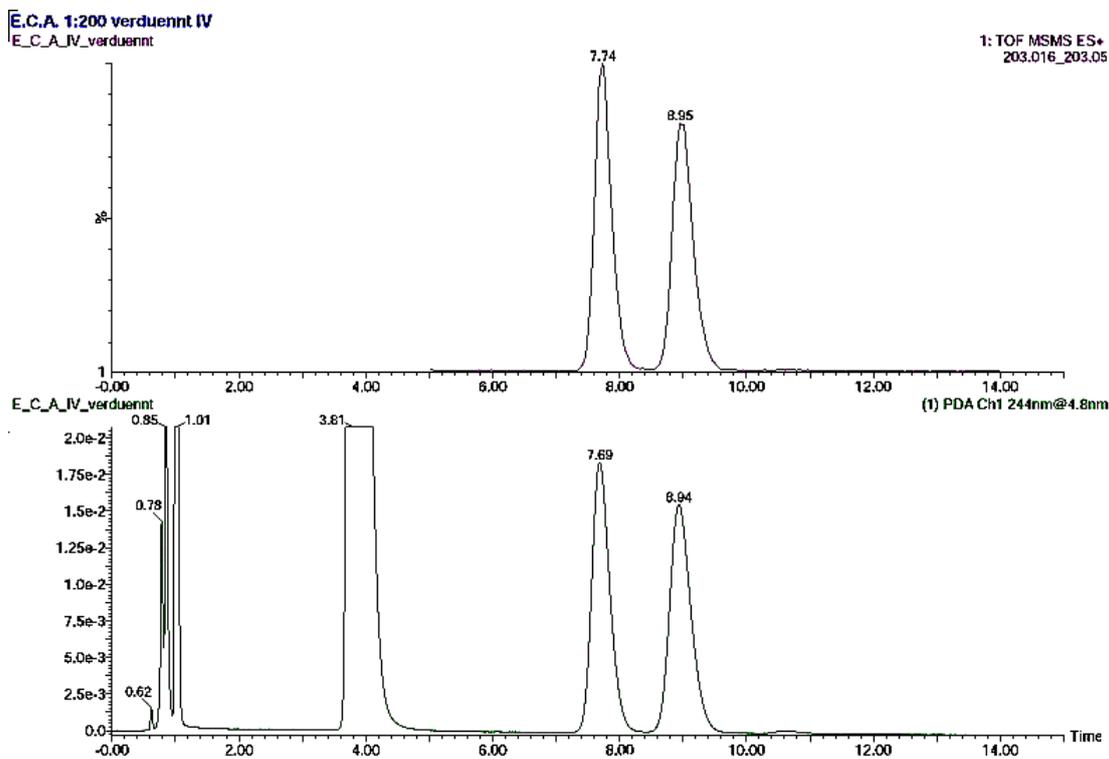


Abbildung 42: Chromatogramm einer verdünnten Probe (1:200) des Präparates E.C.A.

Das Präparat E.C.A. ist ein eindrückliches Beispiel für die Gefahr, die von Schwarzmarktpräparaten bzw. nicht zugelassenen Arzneimitteln ausgeht. Selbst unter Zugrundelegung eines niedrigstmöglichen Gehalts von gut 800 µg (untere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls des Gehalts ermittelt durch Massenspektrometrie), entspricht dies einer vierzigfachen (!) Überdosierung. Die Einnahme dieses Präparates wäre daher mit einer Gesundheitsgefährdung verbunden, insbesondere wenn mehrere Kapseln pro Tag eingenommen werden sollten. Beim Hund wurden ab einer Dosierung von 0,1 mg pro Tag myokardiale Nekrosen beobachtet [27]. Der Todesfall eines Bodybuilders infolge eines Myokardinfarkts nach Clenbuterolabusus (zweimal täglich 20 µg) wurde berichtet [95].

3.4 Bestimmung der Clenbuterolenantiomere in Humanurin

3.4.1 Vorversuche und Entwicklung einer geeigneten Extraktionsmethode

Clenbuterol wird beim Menschen hauptsächlich als Muttersubstanz (und damit unverändert) renal eliminiert (Kapitel 2.21). Demzufolge bietet sich zur Dopinganalytik eine Isolierung aus dem Urin an.

Im Rahmen von Vorversuchen wurden verschiedene Extraktionsverfahren getestet, um eine Methode zu finden, die richtige und reproduzierbare Ergebnisse liefert und möglichst hohe Wiederfindungsraten aufweist. Dabei wurden eine in der Literatur beschriebene Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) [96], eine Festphasenextraktion mittels SupelMIP[®] SPE Kartuschen und eine unterstützte Flüssig-Flüssig-Extraktion (supported liquid extraction, SLE) mithilfe von Extrelut[®] NT-3 und Isolute[®] SLE+ 2 ml Kartuschen untersucht.

Bei der Aufarbeitung von mit racemischem Clenbuterol versetztem Humanurin zeigte die klassische Flüssig-Flüssig-Extraktion personen- und konzentrationsunabhängig sehr unpräzise Ergebnisse, eine Analytverschleppung in Leerproben sowie eine starke Enantiomerendiskriminierung des S-Clenbuterols. Eine Probenvorbereitung mittels LLE führt demzufolge aus unbekanntem Gründen zu falschen Ergebnissen (Tabelle 12). Als nachteilig erwiesen sich weiterhin der hohe zeitliche Aufwand bei der Probenvorbereitung und die begrenzte Probenaufarbeitungskapazität.

Probe	Clenbuterol 200 pg/ml		Clenbuterol 20 pg/ml		Leerprobe	
	R-Isomer	S-Isomer	R-Isomer	S-Isomer	R-Isomer	S-Isomer
1	31481	7302	10671	3207	1392	0
2	27617	4526	14328	2672	2779	0
3	26311	7198	16024	5177	0	0
4	25788	5870	14917	4967	0	0
5	21387	7930	4368	463	0	0
6	25357	8002	15971	4523	0	0
Mittelwert rels	26324 12,5	6805 19,9	12713 35,7	3502 51,1		

Probe	Clenbuterol 200 pg/ml		Clenbuterol 20 pg/ml		Leerprobe	
	R-Isomer	S-Isomer	R-Isomer	S-Isomer	R-Isomer	S-Isomer
1	34178	7210	11332	3622	1617	0
2	28172	5106	12112	2420	5289	0
3	28239	8060	14541	3689	3135	0
4	28395	2363	12678	4014	2395	0
5	19084	5892	2773	264	3050	0
6	23832	6320	15146	4325	2040	0
Mittelwert rels	26983 18,8	5825 34,0	11430 39,2	3056 49,5		

Tabelle 12: Mittels LLE selbst (oben) und von einer Mitarbeiterin aufgearbeitete Urinproben (unten); gemessen mittels SFC-MS/MS

Zur Optimierung der Probenvorbereitung wurden anschließend verschiedene SLE bzw. SPE Systeme getestet, Extrelut[®] NT-3, Isolute[®] SLE+ 2 ml und SupelMIP[®] SPE. Hierzu wurden mit allen Systemen Aliquote von mit Clenbuterol in verschiedenen Enantiomerenanteilen versetzten Humanurinen (Konzentration: 135 pg/ml) entsprechend den Vorgaben der Hersteller aufgearbeitet und mittels SFC-MS/MS vermessen (Bedingungen siehe Kapitel 6). Dabei waren nach Aufarbeitung mit dem SupelMIP[®] System keine auswertbaren Signale im Chromatogramm vorhanden. Die Probenvorbereitung mittels Isolute[®] SLE+ 2 ml System führte zwar zu Analytsignalen, die jedoch aufgrund ihrer geringen Intensität nicht befriedigend waren. Die mit Abstand größte Signalintensität zeigten die Proben, die mit den Extrelut[®] NT-3 Kartuschen aufgearbeitet wurden (Abbildung 43).

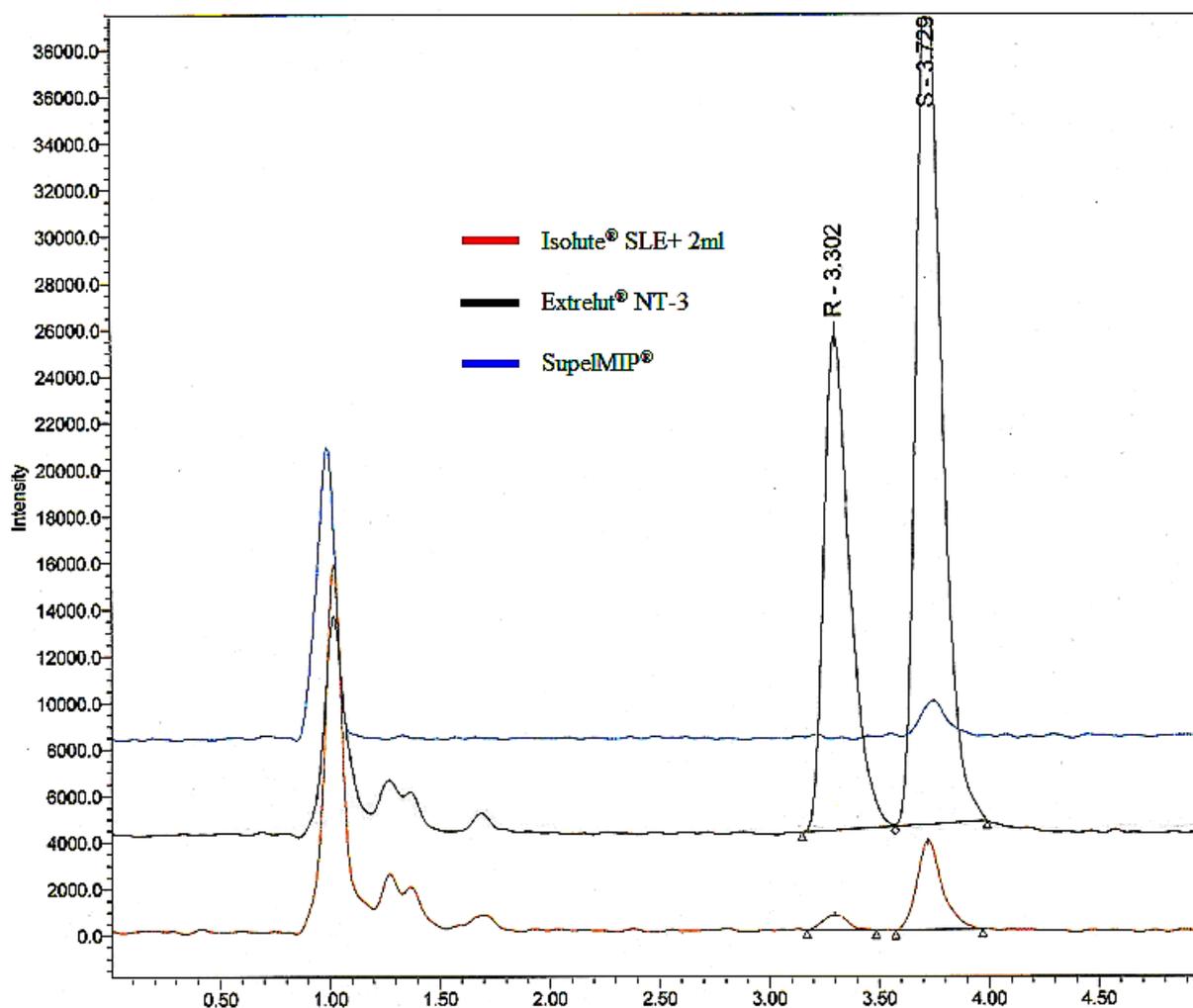


Abbildung 43: Overlay-Chromatogramm Clenbuterol versetzter Urinaliquote mit den verschiedenen Extraktionssystemen, gemessen mit SFC-MS/MS

Die Validierung der Methode nach ICH erfolgte dementsprechend mit den Extrelut[®] NT-3 Kartuschen, für die in der Literatur auch schon Erfahrungswerte bei der Aufarbeitung clenbuterolhaltiger Urinproben vorliegen [97,98].

3.4.2 Methodvalidierung und Vergleich von SFC und HPLC

In dieser Arbeit sollte auch die Möglichkeit des Einsatzes der seit 2009 neu verfügbaren analytischen SFC Systeme in der Spurenanalytik untersucht werden.

Für den Vergleich wurden im Rahmen der Methodvalidierung die mittels Extrelut[®] NT-3 aufgearbeiteten Proben nach Rekonstitution geteilt und sowohl in ein HPLC-MS/MS System, als auch in ein SFC-MS/MS System eingespritzt.

Dabei handelte es sich um eine Waters Acquity UPC²[®] (SFC) bzw. um eine Waters Acquity H-Class[®] (eigentlich ein UHPLC System, das aber aufgrund des Drucklimits der Säule als HPLC zu betrachten ist), jeweils mit einer bau- und chargengleichen Astec Chirobiotic[®] V2 Säule ausgestattet. Zur Detektion wurde sowohl die SFC, als auch die HPLC wahlweise mit demselben Triple-Quadrupol Massenspektrometer gekoppelt (siehe Abbildungen 44 und 45).

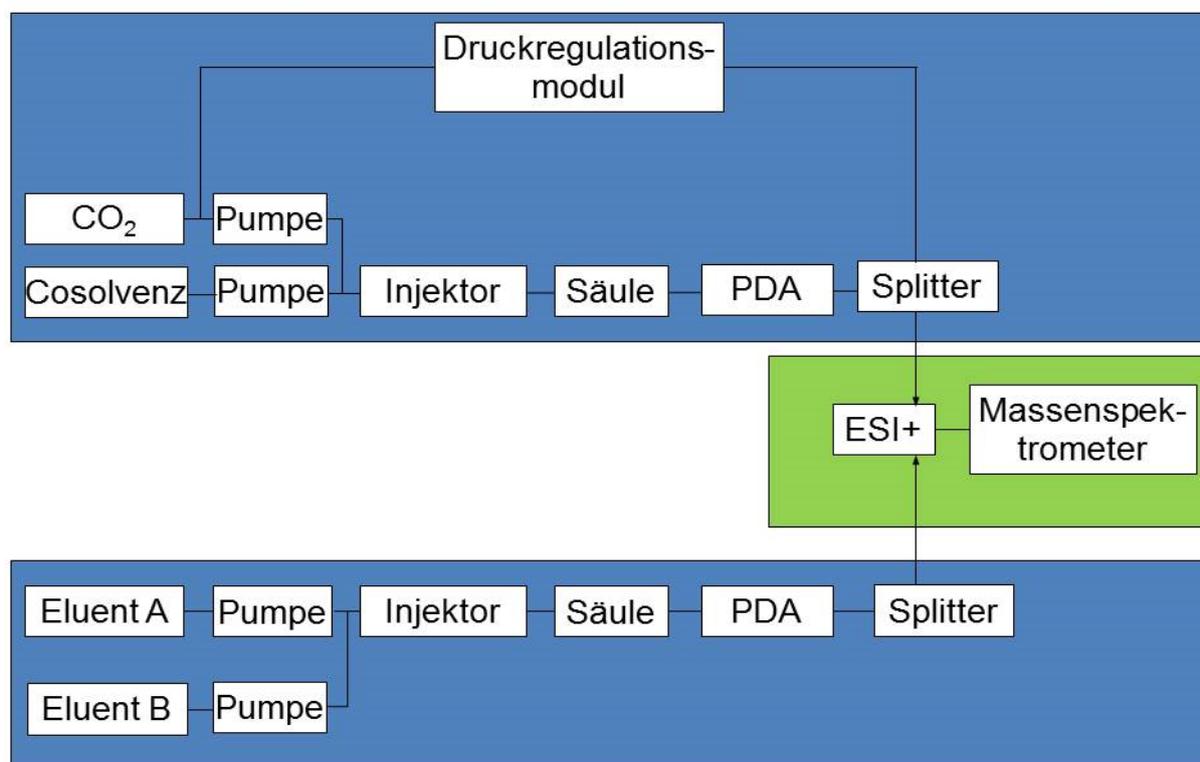


Abbildung 44: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus



Abbildung 45: Versuchsaufbau im Labor

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Validierung von HPLC- und SFC Methode beschrieben. Es wurden grundsätzlich Doppelinjektionen vorgenommen, d.h. jede Probe ist zweimal nacheinander aufgegeben worden und der arithmetische Mittelwert der gemessenen Peakflächen beider Injektionen ist in die Validierung eingeflossen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Anteil des S-Clenbuterols an der Gesamtmenge Clenbuterol unter Berücksichtigung des internen Standards (siehe Kapitel 6.4).

3.4.2.1 Richtigkeit und Präzision

Für die Bestimmung von Richtigkeit und Präzision gelten analoge Überlegungen wie bei der Analytik der Arzneimittel und Schwarzmarktpräparate. Entscheidend ist, dass die Enantiomerenanteile genau erfasst werden, eine Quantifizierung ist von sekundärem Interesse. Sowohl mit HPLC-MS/MS, als auch mit SFC-MS/MS zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den nominellen und den gemessenen Werten (Tabelle 13, Abbildung 46).

Nominaler Anteil S-CB	HPLC		SFC	
	Anteil S-CB	rels in %	Anteil S-CB	rels in %
0,545	0,551±0,016	2,8	0,560±0,019	3,2
0,500	0,506±0,010	2,5	0,496±0,017	4,5
0,444	0,450±0,010	2,1	0,456±0,012	2,3

Tabelle 13: Genauigkeit der Messungen mittels SFC und HPLC (Mittelwert mit 95% KI; n=6 für 0,545 und 0,444; n=9 für 0,500)

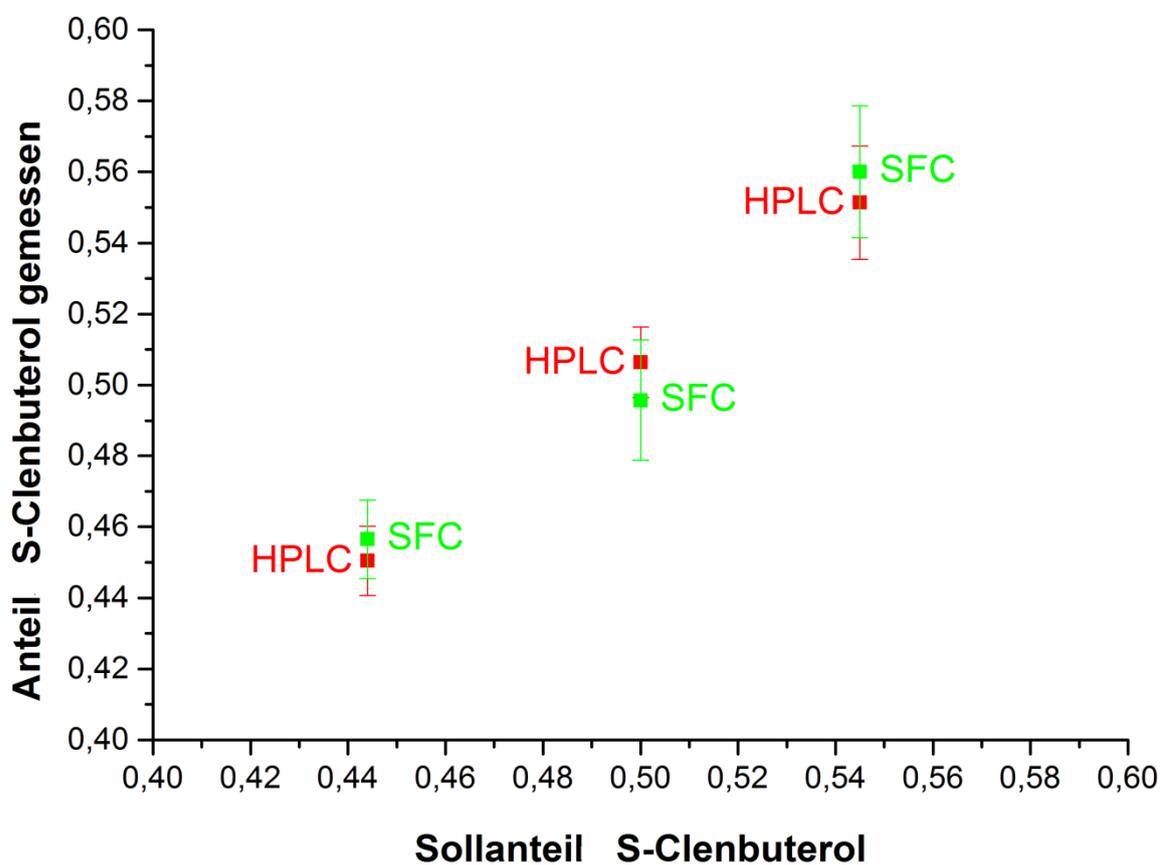


Abbildung 46: Graphische Darstellung der Genauigkeit der beiden Verfahren (Mittelwert mit 95% KI)

Weiterhin wurden die in Kapitel 3.4.2.3 beschriebenen Kalibriergeraden auf eine Abhängigkeit der gemessenen Anteile des S-Clenbuterols von der Konzentration untersucht. Der Erwartungswert lag hier bei einem Anteil von 0,5 und wurde sowohl mittels HPLC-MS/MS als auch mittels SFC-MS/MS für alle Konzentrationen gemessen (Abbildung 47).

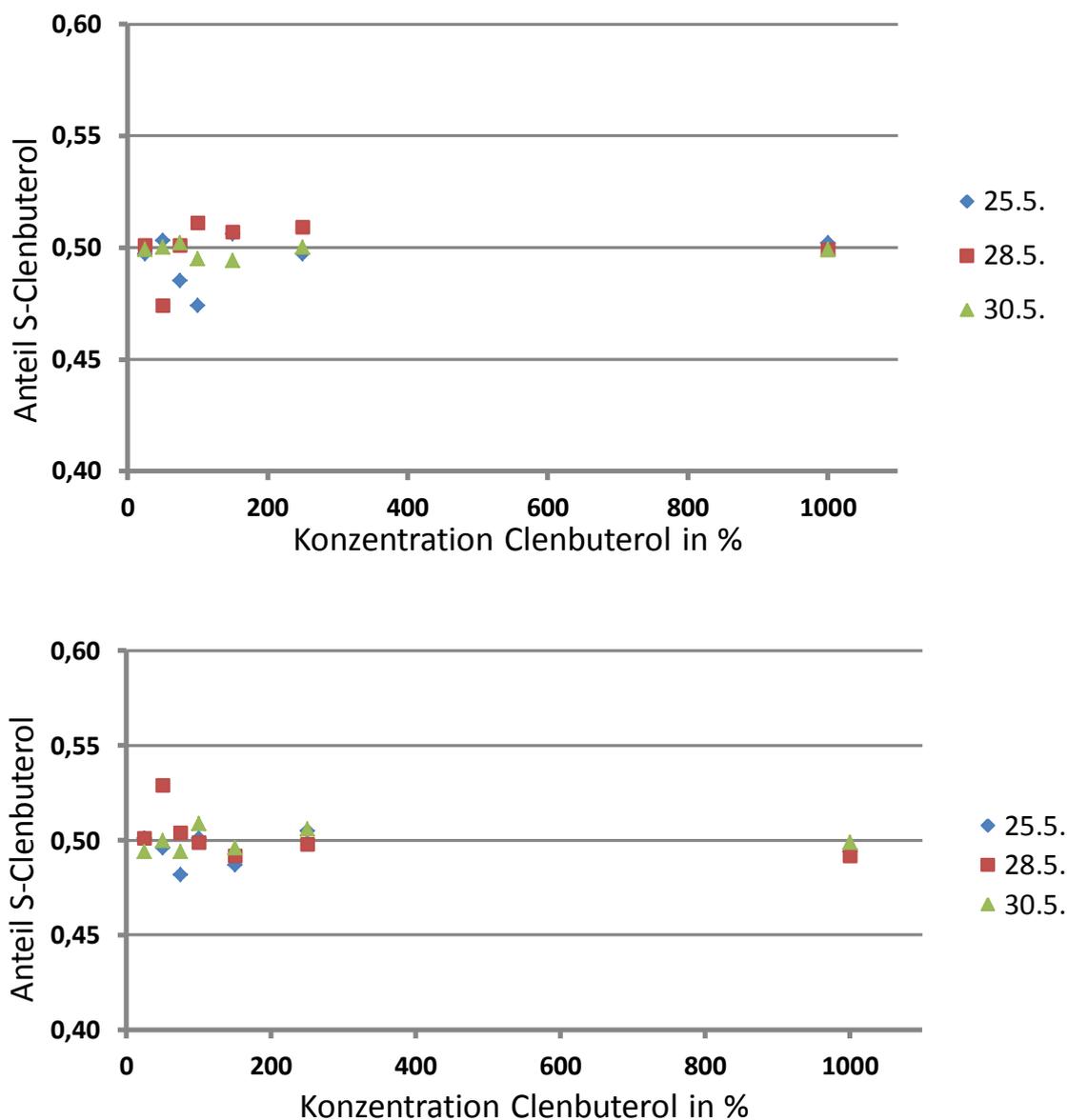


Abbildung 47: Plot der gemessenen Anteile S-CB in Abhängigkeit von der Konzentration (SFC oben, HPLC unten 100% entspricht 33 pg/ml Clenbuterol (racemisch))

Zusätzlich wurden mittels SFC-MS/MS Proben vermessen, bei denen eine Gegenüberstellung von wässriger und urinärer Matrix erfolgte. Die gemessenen Mittelwerte weichen dabei weder untereinander noch vom nominellen Wert ab, Varianzhomogenität besteht (Abbildung 48).

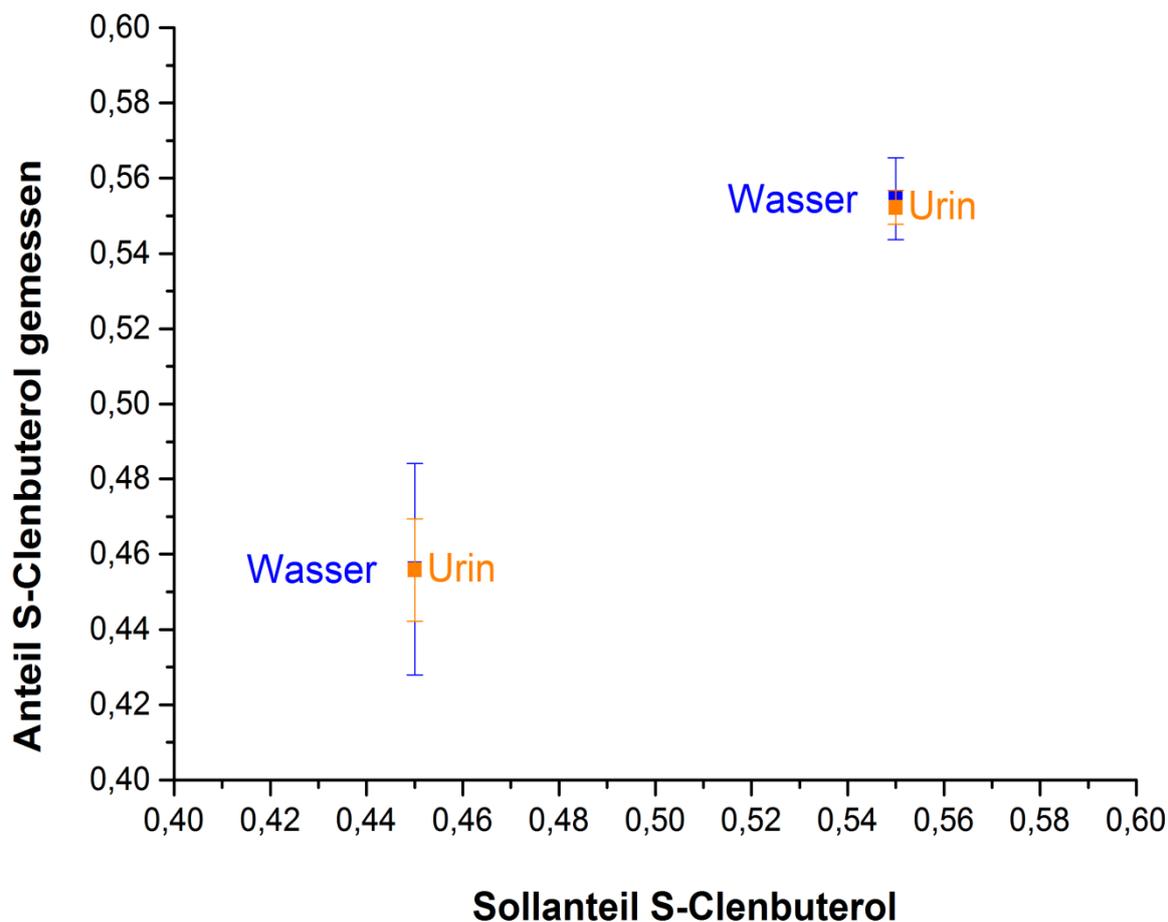


Abbildung 48: Vergleich der gemessenen S-Clenbuterolanteile nach Extraktion von aufgestocktem Wasser bzw. Urin (Mittelwert mit 95% KI; n=3)

3.4.2.2 Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde bestimmt als das Verhältnis des erhaltenen Signals einer zugesetzten Menge Clenbuterol zu einem clenbuterolfreien Urin (Probe ohne Analyt) nach Aufarbeitung des Urins, zu dem eines Signals einer nicht extrahierten Standardlösung gleicher Menge (=100 %). Sie betrug für jedes Enantiomer über 95 % (Tabelle 14).

HPLC				SFC			
Urin		Externer Standard		Urin		Externer Standard	
R	S	R	S	R	S	R	S
4934	4813	5419	5561	1113	1129	1209	1190
5325	5292	5389	5497	1127	1156	1201	1170
5323	5742			1163	1163		
Mittelwerte							
5194	5282	5404	5529	1134	1149	1205	1180
Wiederfindung in %							
96,11	95,54			94,13	97,40		

Tabelle 14: Wiederfindung in Urinproben mittels HPLC und SFC

3.4.2.3 Linearität

Eine Quantifizierung des Clenbuterols im Urin war in dieser Arbeit von sekundärem Interesse, hierfür stehen bereits geeignete Methoden zur Verfügung. Für diesen Zweck wäre, wie schon zur Quantifizierung der Präparate, eine achirale Säule (die nur einen Clenbuterolpeak und damit höhere Signalintensitäten liefern würde) geeigneter, um niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie präzisere Ergebnisse zu erhalten.

Die aufgenommenen Kalibriergeraden (Abbildung 49) unterscheiden sich für SFC und HPLC an Tag zwei und Tag drei signifikant voneinander (F-Test). Die Linearität wurde mit dem Linearitätstest nach Mandel überprüft und war für alle sechs Kalibriergeraden gegeben. Tabelle 15 listet die zugehörigen Bestimmtheitsmaße auf.

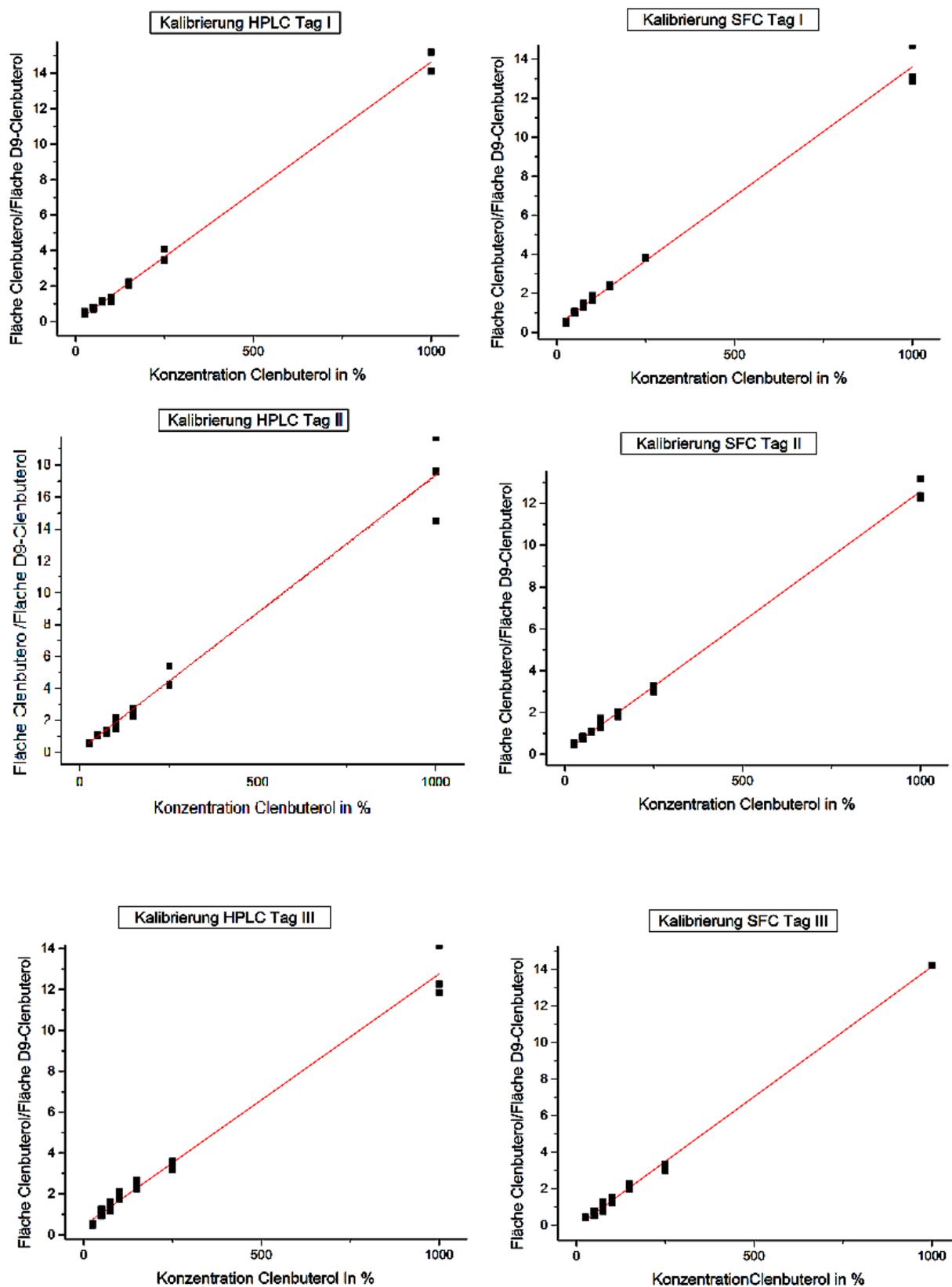


Abbildung 49: Kalibriergeraden von HPLC und SFC

Tag	HPLC		SFC	
	Bestimmtheitsmaß	Reststandardabweichung	Bestimmtheitsmaß	Reststandardabweichung
I	0,9980	0,45	0,9974	0,21
II	0,9960	0,24	0,9979	0,19
III	0,9765	0,89	0,9939	0,37

Tabelle 15: Bestimmtheitsmaße und Reststandardabweichungen der Kalibriergeraden

3.4.2.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN 32645:2008-11 „Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung“ aus den Kalibriergeraden der einzelnen Enantiomere berechnet (Tabelle 16).

	Nachweisgrenze in pg/ml				Bestimmungsgrenze in pg/ml			
	SFC		HPLC		SFC		HPLC	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Tag I	3,9	4,6	3,6	3,5	14,7	17,1	13,4	13,1
Tag II	3,8	3,6	3,1	4,3	14,4	13,5	11,4	15,9
Tag III	2,8	3,4	4,8	5,4	10,5	12,5	17,6	19,8
Mittelwerte in pg/ml								
	3,5	3,9	3,8	4,4	13,2	14,4	14,1	16,3

Tabelle 16: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645

3.4.2.5 Spezifität

Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode einen Analyten eindeutig in Gegenwart anderer Komponenten zu bestimmen, d.h. ohne Störung durch Matrixkomponenten.

Durch die Kopplung eines chromatographischen Systems mit einem massenselektiven Detektor, der geeignet ist MS/MS Experimente durchzuführen, ist die Spezifität der Methode per se sehr hoch. Eine Substanz müsste, um die Analytik zu stören, die gleiche Retentionszeit wie eines der beiden Clenbuterolenantiomere aufweisen, das gleiche Masse-Ladungsverhältnis besitzen und bei der MS/MS-Fragmentierung Produktionen gleichen

Masse-Ladungsverhältnisses liefern. Bei Urinproben dreier Personen zeigten weder der Übergang der Clenbuterolenantiomere ($m/z\ 277 \rightarrow m/z\ 203$) noch der Übergang der Enantiomere des D₉-Clenbuterols ($m/z\ 286 \rightarrow m/z\ 204$) Interferenzen während der Retentionszeit der jeweiligen Enantiomere (Abbildungen 50,51 und 52).

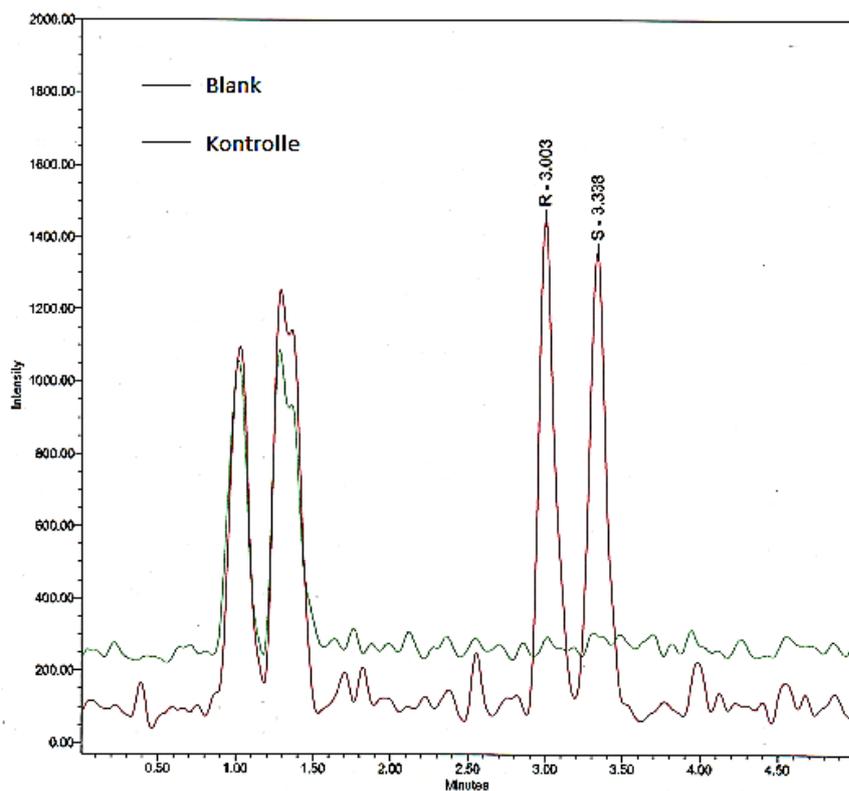
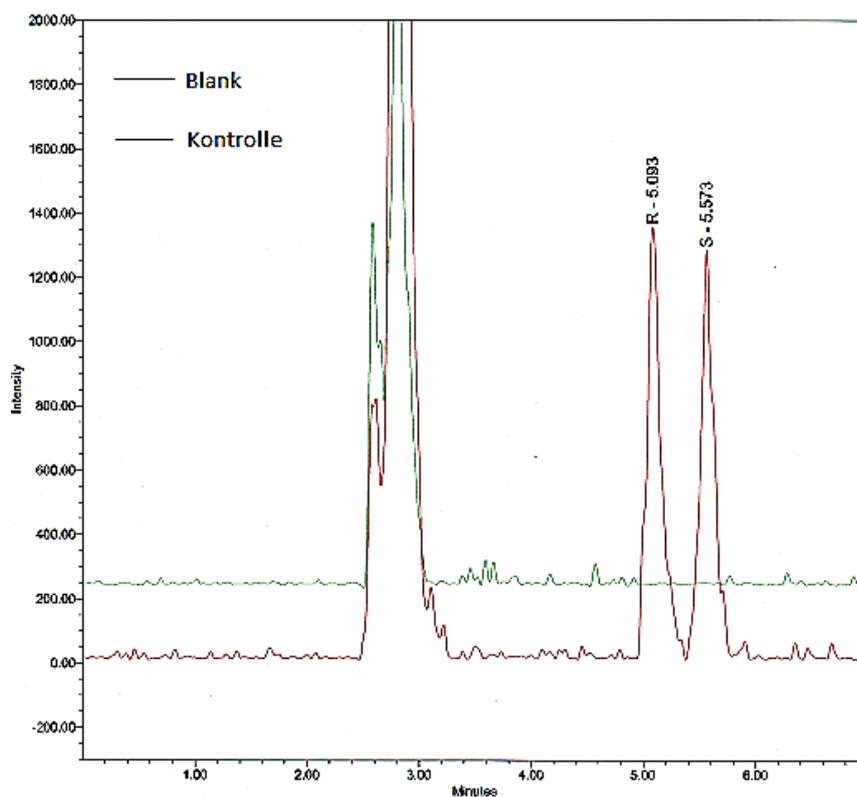


Abbildung 50:
Overlaychromatogramm
SFC (277→203)

Abbildung 51:
Overlaychromatogramm
HPLC (277→203)



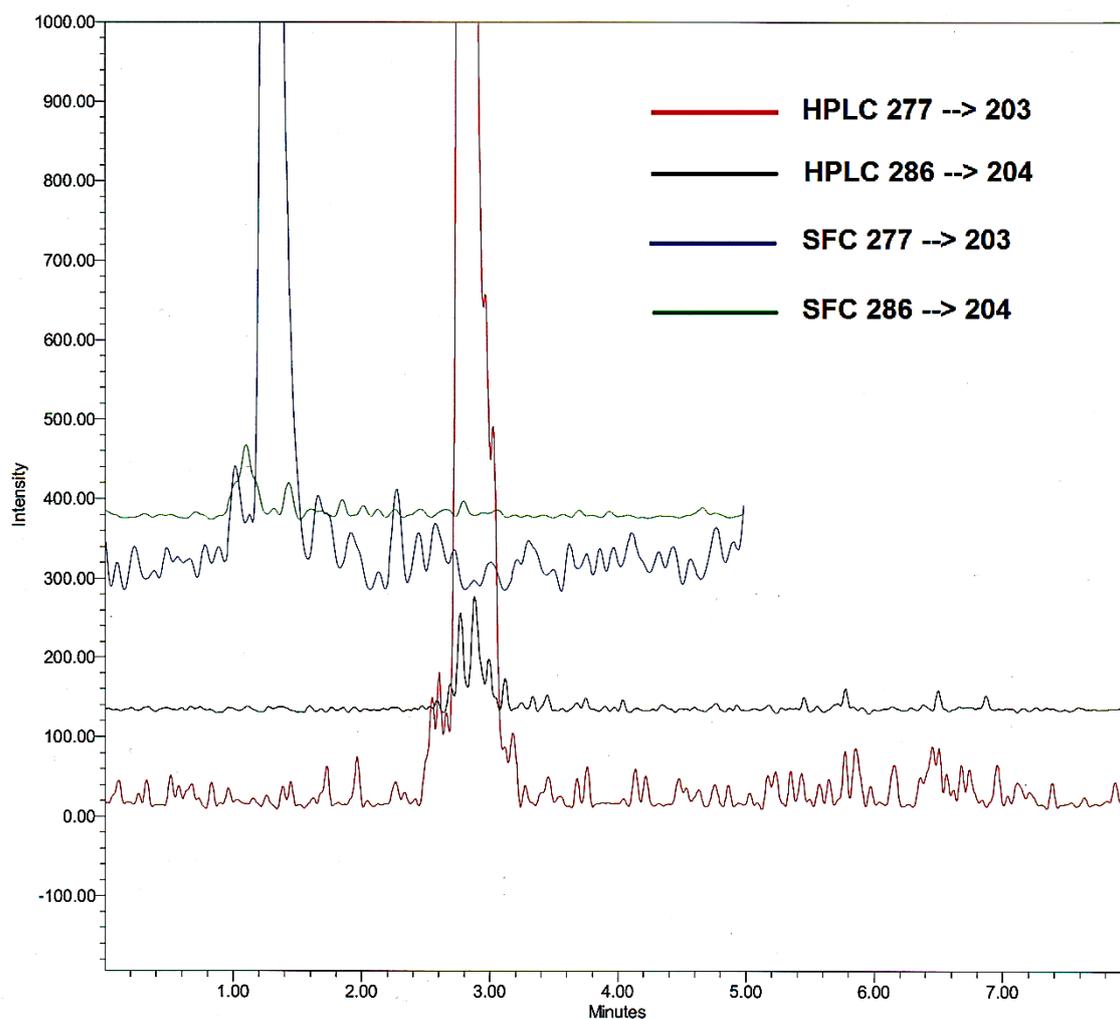


Abbildung 52: Overlaychromatogramm von Leerproben der untersuchten Massenübergänge; SFC und HPLC

3.4.2.6 Probenstabilität während der Lagerung

Um sicherzustellen, dass sich das tatsächlich vom Menschen ausgeschiedene Enantiomerenverhältnis auch in den Proben wiederfindet, die nicht sofort aufgearbeitet werden, sondern, wie in der Dopinganalytik häufig, zunächst gekühlt gelagert werden oder aber eingefroren und wieder aufgetaut werden, sind verschiedene Stabilitätsexperimente durchgeführt worden.

Sowohl das R- als auch das S-Enantiomer wurden vom Kooperationspartner RIKILT Wageningen UR in neutraler (Wasser), alkalischer (einprozentige Ammoniaklösung) und saurer (1 M Essigsäure) Lösung bei -20 °C , 4 °C und 37 °C über verschiedene Zeiträume inkubiert. Dabei war eine Racemisierung in saurer Lösung bei 37 °C zu beobachten. Die

3 Ergebnisse und Diskussion

Proben waren hierbei über zwei Tage stabil, ab der Messung am siebten Tag war eine deutliche Zunahme des jeweils anderen Enantiomers zu verzeichnen (Abbildung 53).

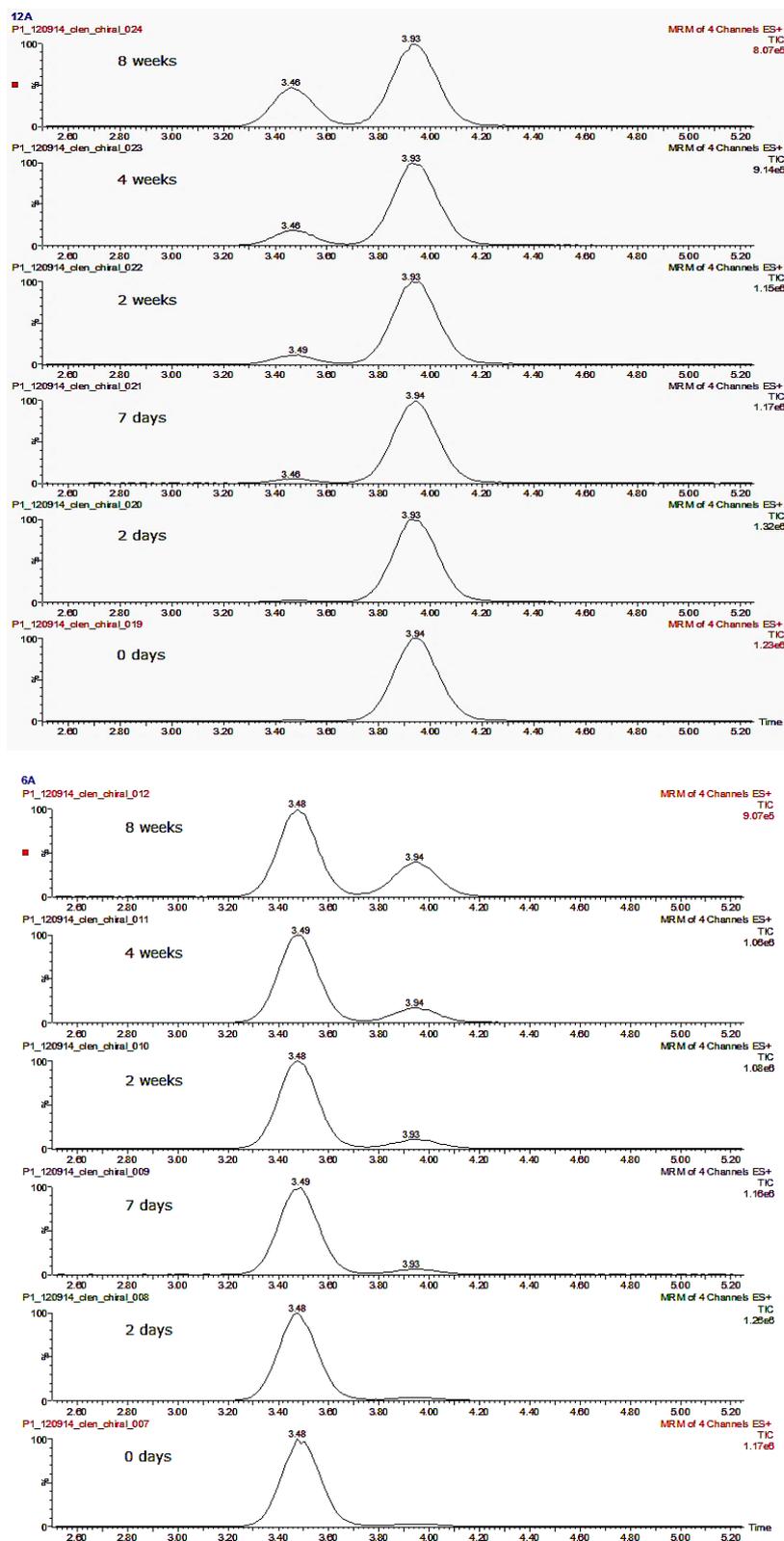


Abbildung 53: S-Clenbuterol (oben) und R-Clenbuterol (unten) nach verschiedenen Inkubationszeiten in saurer Lösung, T=37 °C, 1 M Essigsäure

Der Reaktionsmechanismus, der zur säurekatalysierten Racemisierung führt, ist in Abbildung 54 dargestellt.

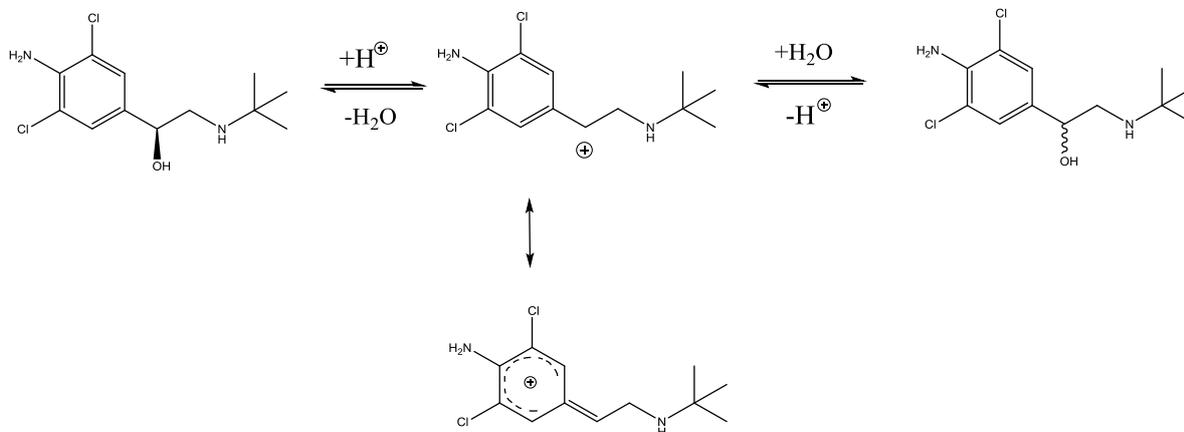


Abbildung 54: Mechanismus der säurekatalysierten Racemisierung der Enantiomere

Darüber hinaus wurde auch der Einfluss einer Lagerung aufgestockten Urins über 24 bzw. 48 Stunden im Kühlschrank, sowie nach einem und zwei Einfrier-Auftau-Zyklen untersucht. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Mittelwerten und dem Erwartungswert (0,454). Ferner sind die Mittelwerte nicht signifikant voneinander verschieden, die hier untersuchten Lagerungsbedingungen haben also keinen Einfluss auf die Enantiomerenzusammensetzung der Probe (Abbildungen 55 und 56).

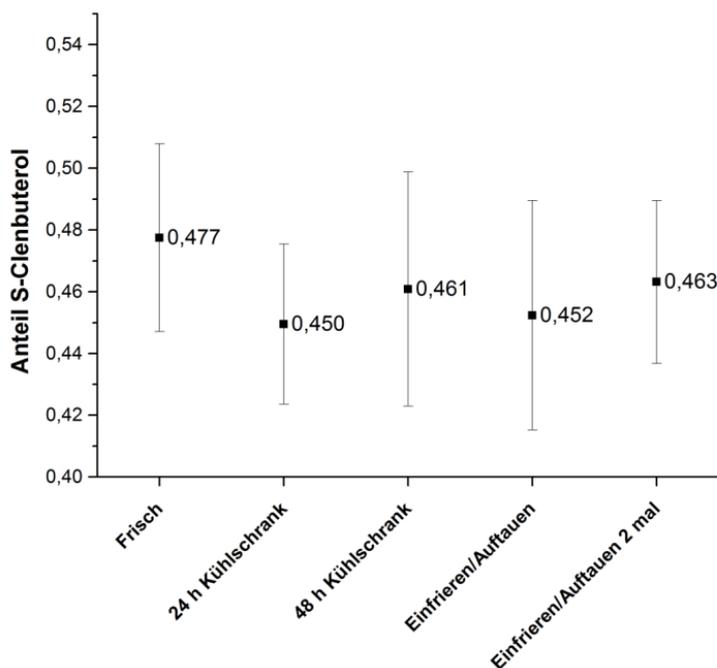


Abbildung 55: Einfluss von Lagerungsbedingungen auf die Enantiomerenzusammensetzung (Mittelwert mit 95% KI; n=4)

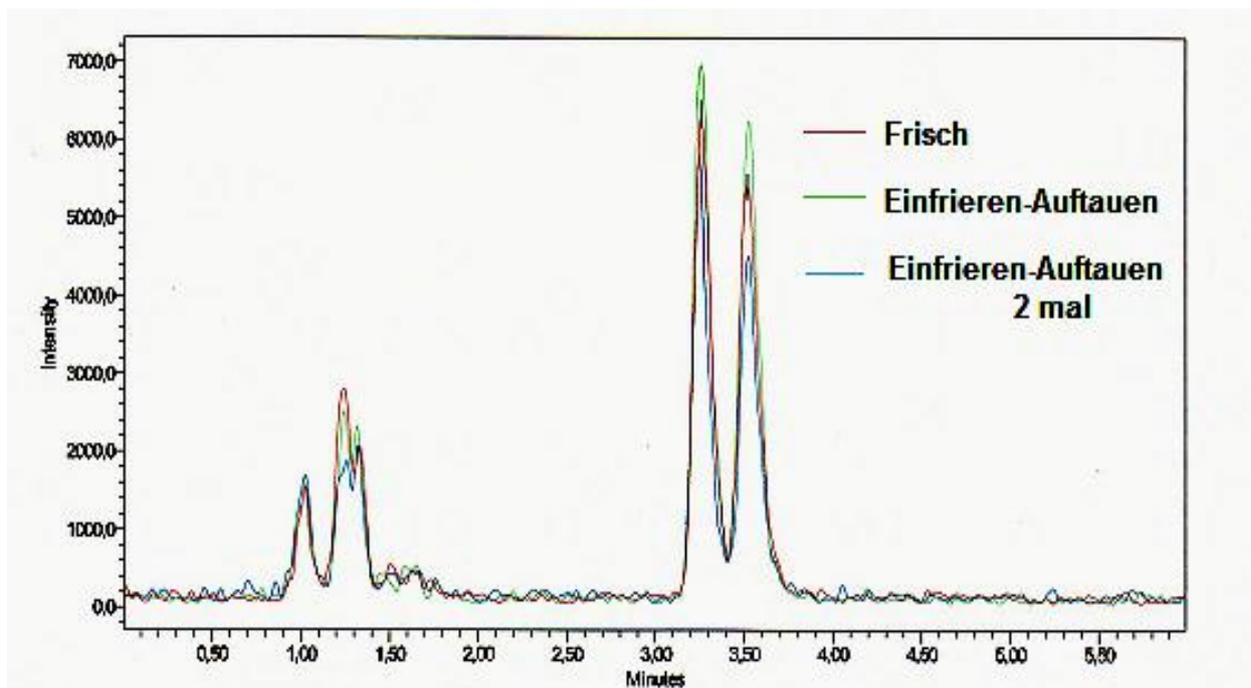
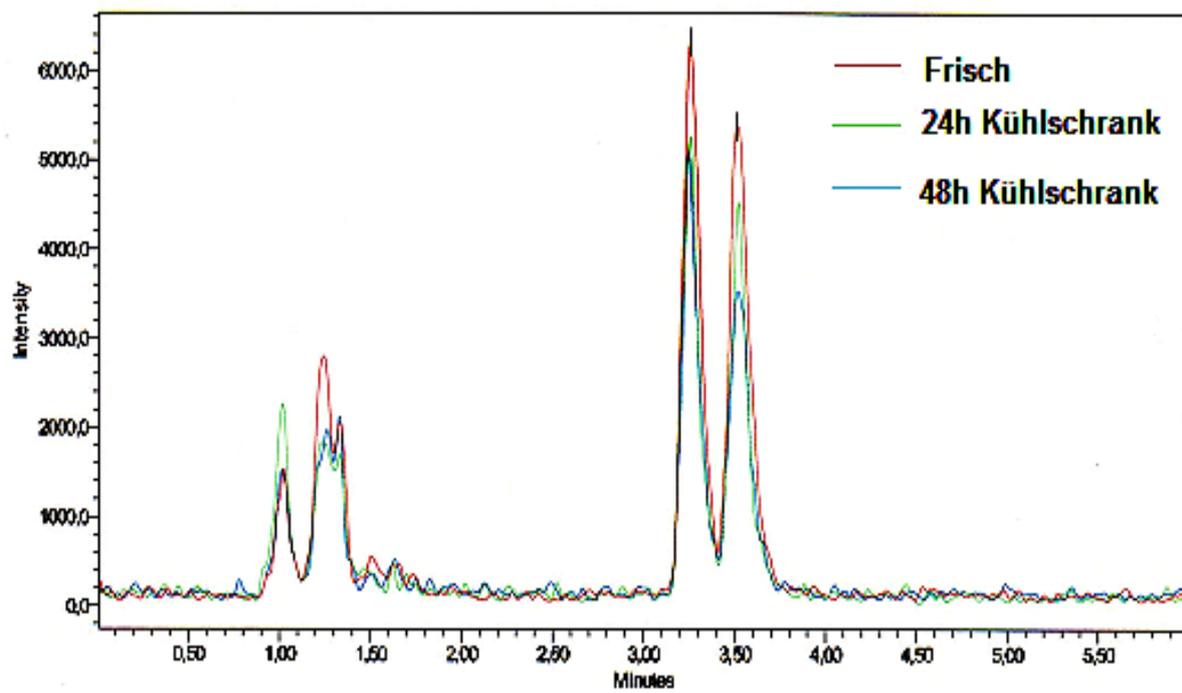


Abbildung 56: Overlaychromatogramme SFC zu Lagerung im Kühlschrank (oben) und Einfrier-Auftau-Zyklen (unten)

3.4.2.7 Fazit zur Methodenentwicklung für Urinproben

Sowohl HPLC, als auch SFC sind mit massenspektrometrischer Detektion zur Bestimmung der Clenbuterolenantiomerenverhältnisse in Humanurin geeignet. Beide Verfahren liefern richtige Ergebnisse sowie vergleichbare Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (Tabelle 17). Mit der SFC verkürzt sich aber die Analysendauer fast um die Hälfte.

Parameter	HPLC		SFC	
	Präzision 100% 25.5.	8,3%		4,0%
Präzision 100% 28.5.	4,8%		7,1%	
Präzision 100% 30.5.	5,7%		12,2%	
Präzision 100% gemittelt	6,3%		7,8%	
Präzision zwischen den Tagen 100%	15,8%		20,1%	
Wiederfindung	R-CB: 96,11%	S-CB: 95,54%	R-CB: 94,13%	S-CB: 97,4%
Nachweisgrenze (pg/ml)	R-CB: 3,8	S-CB: 4,4	R-CB: 3,5	S-CB: 3,9
Bestimmungsgrenze (pg/ml)	R-CB: 14,1	S-CB: 16,3	R-CB: 13,2	S-CB: 14,4

Tabelle 17: Übersicht zur Methodvalidierung der Urinanalytik (Daten aus urinärer Matrix)

3.5 Applikationsstudien

3.5.1 Rückstellmuster einer vorausgegangenen Applikationsstudie

Im Rahmen der Arbeit konnten Rückstellmuster von Urinproben zweier Probanden (S3 und S19) nach Einzelapplikationen unterschiedlicher Clenbuteroldosen (1 µg, 5 µg und 10 µg) zugänglich gemacht werden [99]. Die Urinproben wurden nach jeder Applikation über einen Zeitraum von sechs Tagen gesammelt. Die Applikation erfolgte dabei über Joghurt, der mit Spiropent[®] Sirup versetzt wurde. Dieses Präparat konnte zwar nicht hinsichtlich seiner Enantiomerenzusammensetzung analysiert werden (in Deutschland nicht zugelassen und somit nicht verfügbar), wird aber aus einer Bulklösung („Spiropent[®], liquid (Bulk), <= 1%“) hergestellt, die auch für Ventipulmin[®] Gel und Palnipart[®] verwendet wird [100]. Diese Präparate wurden diesbezüglich wie in Kapitel 3.3 beschrieben untersucht und zeigten racemische Zusammensetzung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass im Rahmen dieser Studie wahrscheinlich auch racemisches Clenbuterol Verwendung fand.

Jede Urinprobe wurde doppelt aufgearbeitet und wie oben beschrieben doppelt injiziert. Die Analytik erfolgte mittels SFC-MS/MS. Es zeigten sich dabei über den Ausscheidungszeitraum die in Tabelle 18 angegebenen mittleren Anteile S-Clenbuterol im Urin. Ein beispielhaftes Ausscheidungsprofil ist in Abbildung 57 dargestellt, alle anderen Werte sind im Anhang (Kapitel 7.7) angegeben.

	1µg	5µg	10µg
	Anteil S-Clenbuterol		
Proband S3	0,485±0,009 (n=16)	0,488±0,007 (n=17)	0,489±0,004 (n=22)
Proband S19	0,487±0,001 (n=13)	0,479±0,019 (n=19)	0,494±0,011 (n=17)

Tabelle 18: Mittlere Anteile S-Clenbuterol in Urinproben zweier Probanden nach Applikation racemischen Clenbuterols (Mittelwert mit 95% KI)

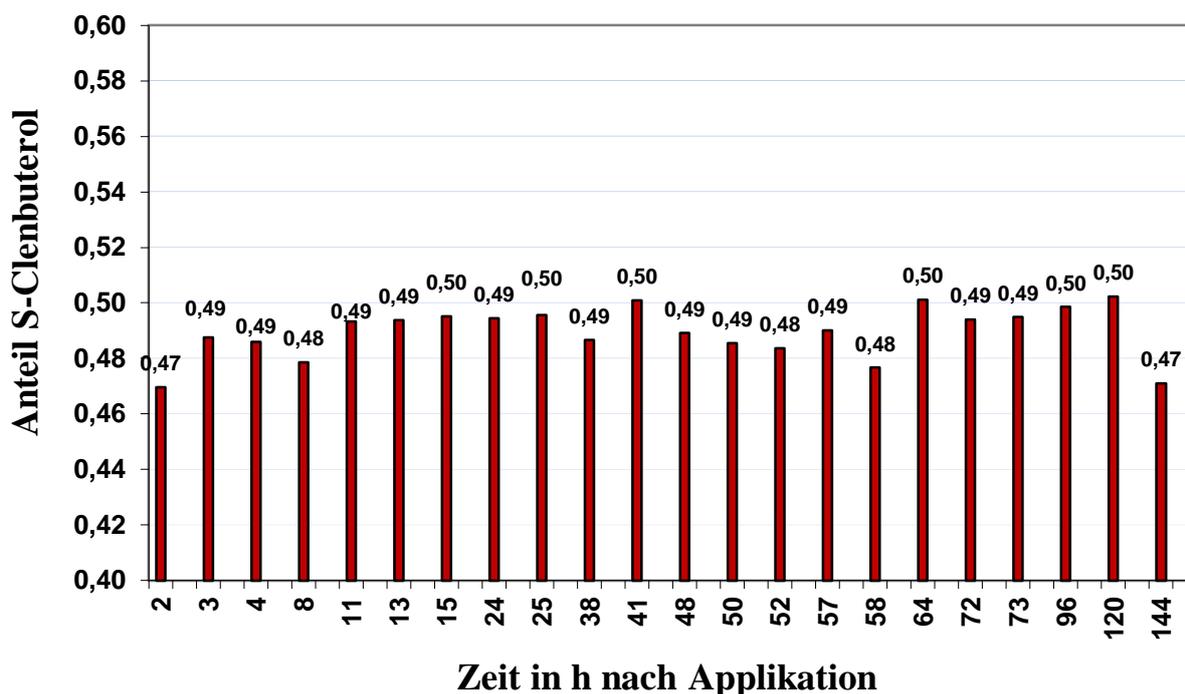


Abbildung 57: Beispielhaftes Ausscheidungsprofil von Proband S3 nach Applikation von 10 µg Clenbuterol

Die mittleren S-Clenbuterolanteile im Urin unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, sodass von einer Dosisunabhängigkeit der ausgeschiedenen Enantiomerenanteile ausgegangen werden kann (Abbildung 58).

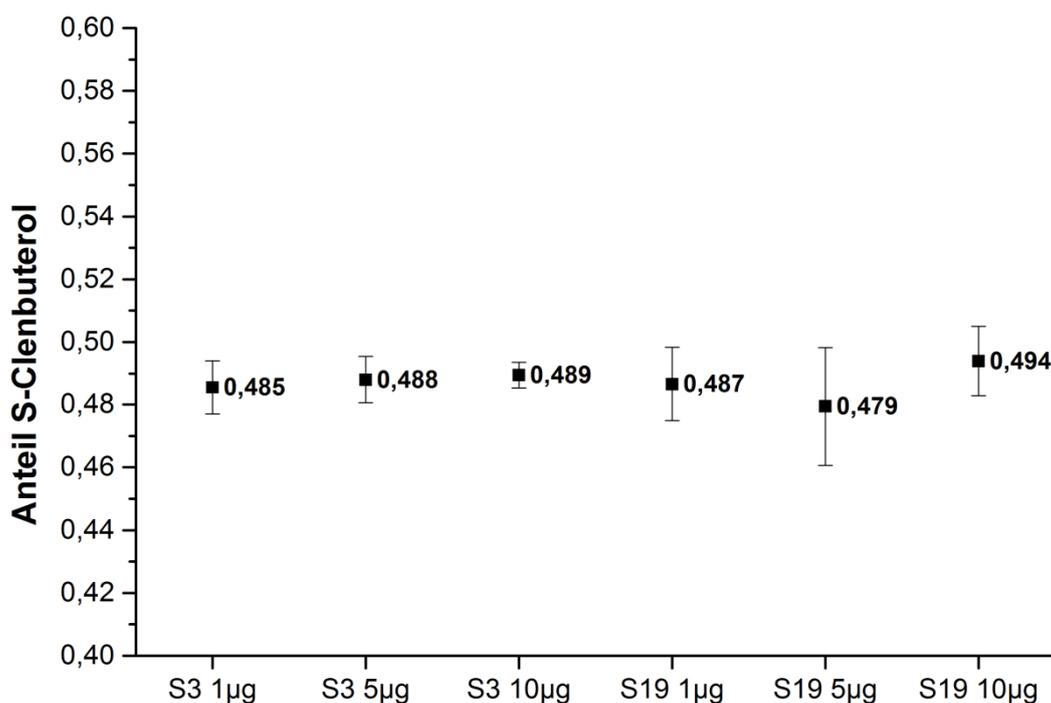


Abbildung 58: Mittlere Anteile S-Clenbuterol im Urin nach Aufnahme verschiedener Mengen Clenbuterol (Mittelwert mit 95% KI)

Die Mittelwerte liegen zwar meist knapp signifikant unter 0,5, was dem Erwartungswert zuwider läuft, allerdings sollte beachtet werden, dass die Proben aus zweiter Hand stammen und somit Einflüsse auf die Enantiomerenzusammensetzung während der Probensammlung, der Erstanalyse, der Lagerung und dem Transport nicht ausgeschlossen werden können.

Es zeigte sich für keine der drei Dosierungen eine Zeitabhängigkeit oder Konzentrationsabhängigkeit des S-Clenbuterolanteils im Urin (beispielhaft Abbildung 59 für die Applikation von 1 µg Clenbuterol). Die Steigungen der linearen Regressionsmodelle waren nicht signifikant von Null verschieden. Da bei einer Dopingkontrolle in der Regel nur eine Probe vorliegt, die im Falle eines positiven Befunds zu einem beliebigen Zeitpunkt nach Aufnahme des Clenbuterol erfolgt sein kann und kein Ausscheidungsprofil aufgenommen wird, ist die Frage nach einer Zeitabhängigkeit für die Anwendbarkeit der Methode im Rahmen einer Dopinganalytik von hoher Bedeutung.

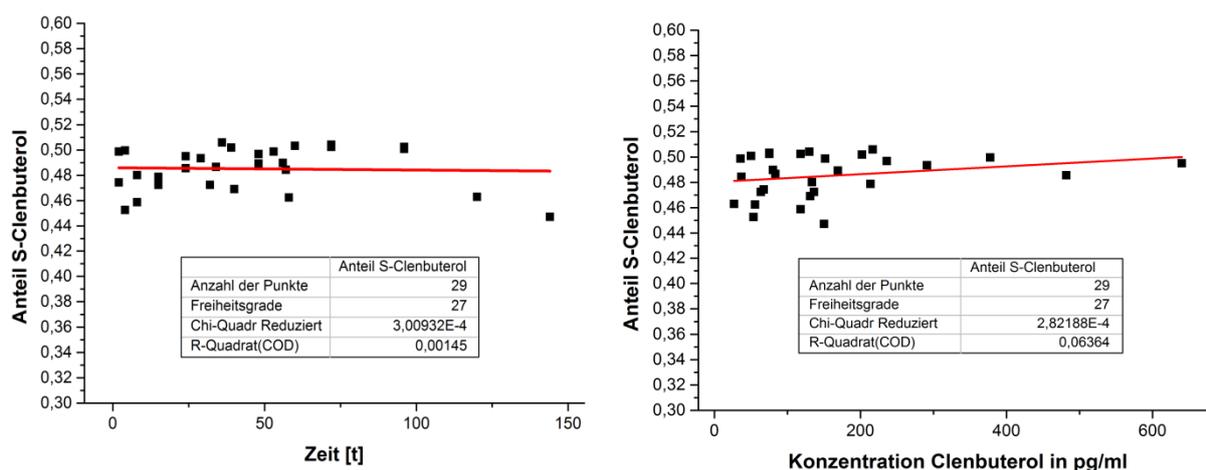


Abbildung 59: Beispielhafte lineare Regressionsmodelle für die Applikation von 1 µg Clenbuterol (Zeitabhängigkeit links, Konzentrationsabhängigkeit rechts)

3.5.2 Applikationsstudie Warschau

Um unter kontrollierten Bedingungen unterschiedliche Enantiomerenverhältnisse aus den genannten Quellen in einer Humanstudie zu applizieren, wurden vom Kooperationspartner RIKILT Wageningen UR zwei Kälber über einen Zeitraum von zwei Wochen mit unterschiedlichen Mengen Ventipulmin[®] Sirup (racemisches Clenbuterol; identisch mit dem in Kapitel 3.3 untersuchten Ventipulmin[®] Gel) behandelt und anschließend geschlachtet. Das Muskelfleisch (Entrecôte) sowie die Lebern der Tiere wurden jeweils nach Schlachtung und nach Zubereitung zur Applikation auf ihren Anteil S-Clenbuterol hin untersucht. Dabei zeigten die Gewebe tier- und gewebeabhängig höchst unterschiedliche Konzentrationen und stereochemische Zusammensetzungen (Tabelle 19).

Tier	Gewebeart	Clenbuterolkonzentration in µg/kg	Anteil S-Clenbuterol
I	Muskelfleisch	1,67	0,509±0,006
	Leber	41,79	0,635±0,004
II	Muskelfleisch	1,93	0,477±0,002
	Leber	33,67	0,602±0,001

Tabelle 19: Konzentrationen und stereochemische Zusammensetzung der Clenbuterolrückstände im Kalb (Mittelwert mit 95% KI; n=4); Daten vom Kooperationspartner RIKILT

Die beobachtete Anreicherung des S-Clenbuterols in den Lebern der Tiere steht dabei im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Beobachtungen der Clenbuterol-enantiomerenverhältnisse in den Organen von Schweinen, Hühnern und Ratten [18–20].

Vom Kooperationspartner RIKILT Wageningen UR wurden Daten aus einem vorangegangenen Projektteil (11A18SS) zur Enantiomerenanreicherung in Rindern übermittelt, die einen S-Clenbuterolanteil von 0,40 bis 0,43 angeben (Muskelfleisch) und damit die intra- und interindividuellen Unterschiede verdeutlichen.

Im Rahmen einer gemeinsam durchgeführten, einfach verblindeten (investigator-blind) Applikationsstudie (Genehmigung: KEBN-14-1-DK, siehe Anhang 7.6) wurden jeweils vier Probanden Clenbuterol aus dem Arzneimittel Spiropent[®] Tabletten, aus Muskelfleisch (Tier I) und aus Leber appliziert (Tier I). Um Rückschlüsse auf eine mögliche Racemisierung der Enantiomere im menschlichen Körper ziehen zu können, wurden zusätzlich jeweils einem Probanden S- bzw. R-Clenbuterolreferenzsubstanz verabreicht (näheres im Kapitel 6.5)

Tabelle 20 und Abbildung 60 zeigen die gemessenen mittleren S-Clenbuterolanteile im Urin der Probanden.

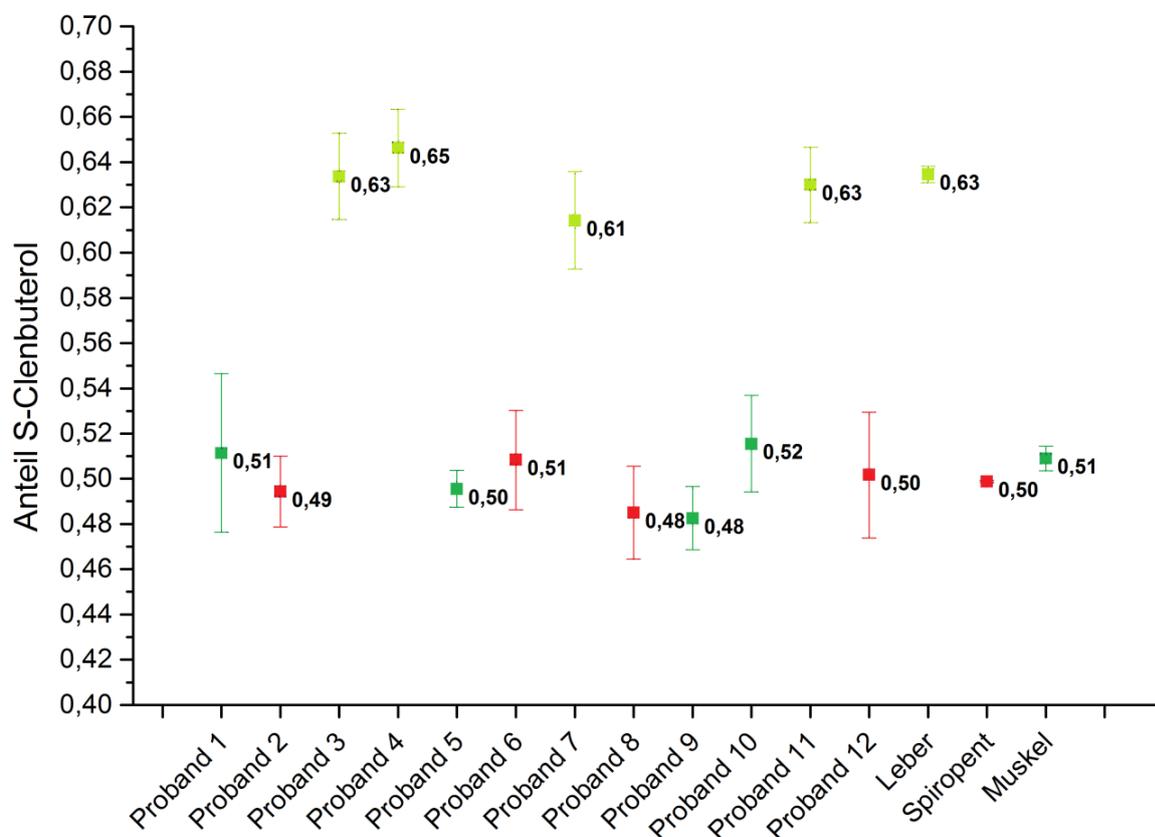


Abbildung 60: Gegenüberstellung der gemessenen Enantiomerenzusammensetzung im Urin der Probanden und der der applizierten Quellen (Mittelwert mit 95% KI)

Proband	mittlerer Anteil S-Clenbuterol im Urin	Quelle
1	0,511±0,035	Muskelfleisch
2	0,494±0,016	Spiropent®
3	0,634±0,020	Leber
4	0,646±0,017	Leber
5	0,495±0,008	Muskelfleisch
6	0,508±0,022	Spiropent®
7	0,614±0,022	Leber
8	0,485±0,021	Spiropent®
9	0,483±0,014	Muskelfleisch
10	0,516±0,021	Muskelfleisch
11	0,630±0,017	Leber
12	0,502±0,028	Spiropent®

Tabelle 20: Mittlerer S-Clenbuterolanteil im Urin der Probanden (Mittelwert mit 95% KI)

Anhand dieser Daten konnte auf Grundlage der Enantiomerenzusammensetzung im Urin klar zwischen denjenigen Probanden, die Leber (S-Clenbuterolanteil = $0,635 \pm 0,004$) und denjenigen, die Muskelfleisch (S-Clenbuterolanteil = $0,509 \pm 0,006$) bzw. eine Spiropent[®] Tablette (S-Clenbuterolanteil = $0,499 \pm 0,001$) erhalten hatten, unterschieden werden. Eine Unterscheidung zwischen der Applikation von Muskelfleisch und Tablette war in dieser Studie nicht möglich, da die Enantiomerenzusammensetzungen dieser Quellen zu ähnlich waren. Zwar konnten diese Probandengruppen aufgrund des gemessenen Clenbuterolkonzentrationsverlaufs (Abbildung 61 und 62) im Urin voneinander getrennt werden (die Probanden, denen Muskelfleisch verabreicht worden war, zeigten deutlich geringere Clenbuterolmengen im Urin), dies war aber nicht die Fragestellung. Im Folgenden sind die Ausscheidungsprofile (Abbildungen 61, 62 und 63) sortiert nach Clenbuterolquelle abgebildet. An den Zeitpunkten, bei denen in den Grafiken kein S-Clenbuterolanteil bzw. keine Konzentration angegeben ist, enthielt die Probe entweder kein Clenbuterol oder die Clenbuterolkonzentration lag unterhalb der Bestimmungsgrenze.

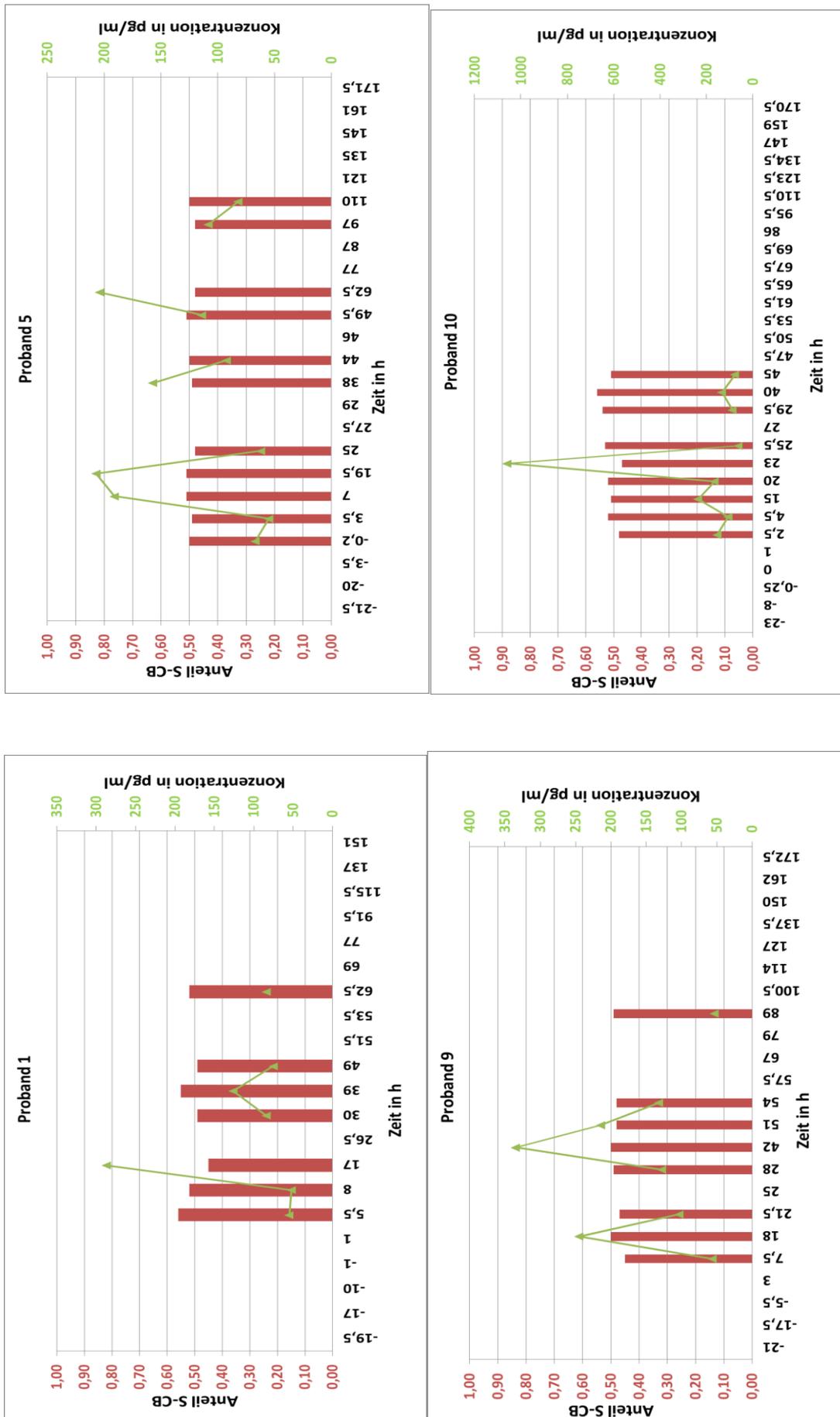


Abbildung 61: Ausscheidungsprofil nach Applikation von Muskelfleisch

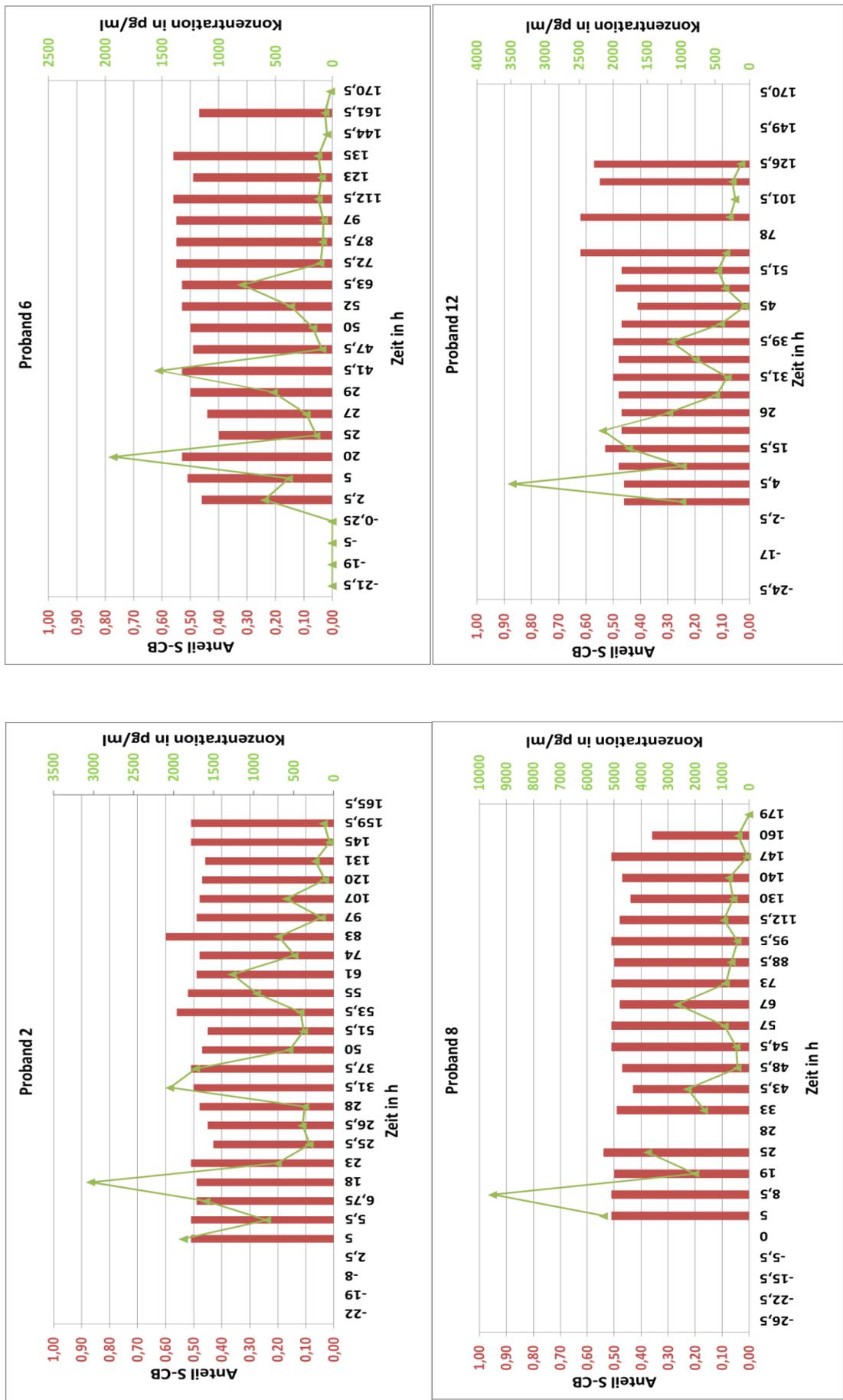


Abbildung 62: Ausscheidungsprofil nach Applikation einer Spiropent® Tablette

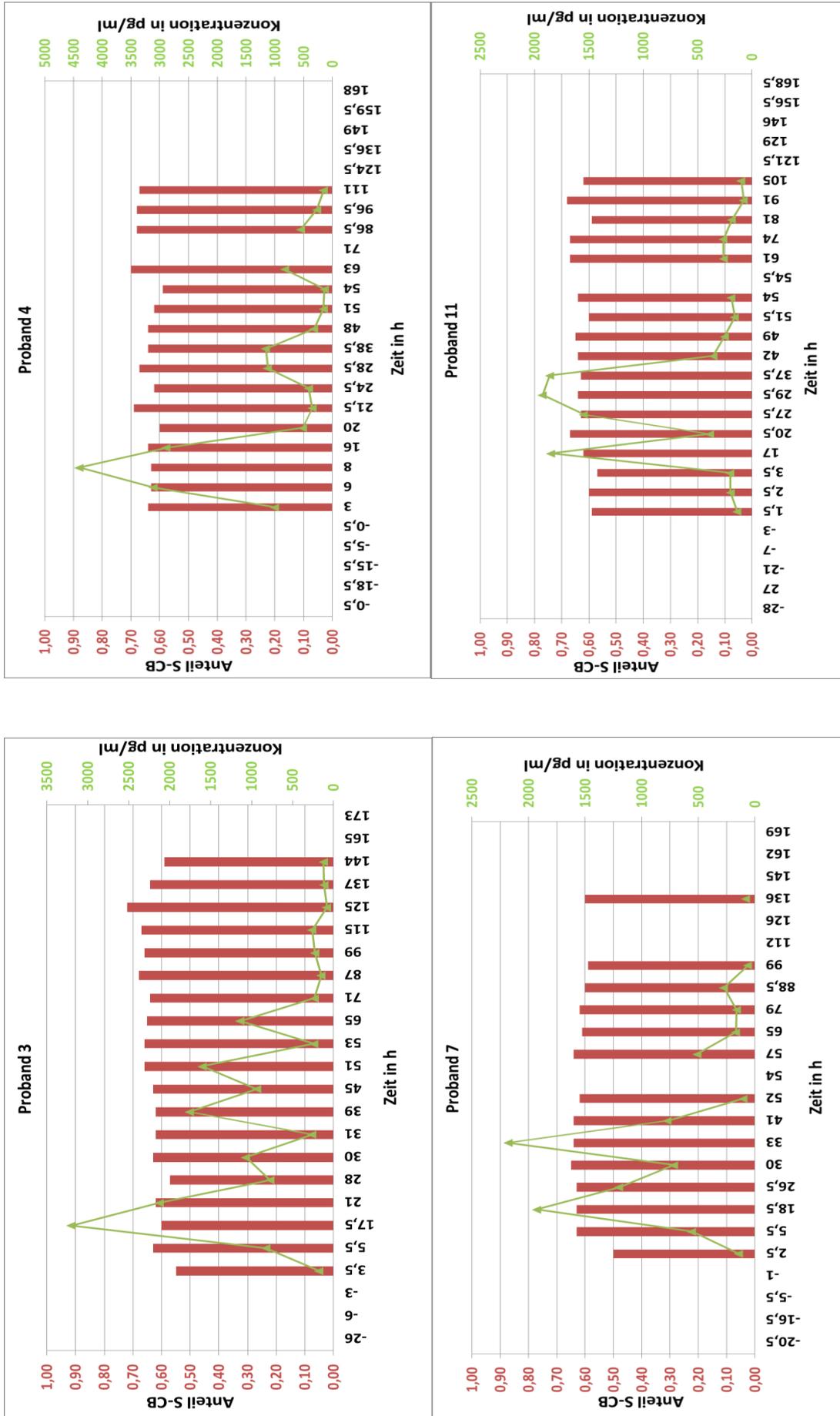


Abbildung 63: Ausscheidungsprofil nach Applikation von Leber

Bei den beiden Probanden, die S- bzw. R-Clenbuterol verabreicht bekamen, trat keine nennenswerte Racemisierung auf (Abbildung 64).



Abbildung 64: Ausscheidungsprofil nach Applikation von S-Clenbuterol (oben) und R-Clenbuterol (unten)

Es ist also möglich, anhand der Enantiomerenzusammensetzung im Urin, zumindest diejenigen, die Leber aufgenommen haben, vom Rest zu separieren. Für den Fall eines Einsatzes dieses Verfahrens in der Dopinganalytik hieße dies, dass damit eine Entlastungsmöglichkeit zugunsten eines positiv getesteten Athleten bestünde, vorausgesetzt dass die in dieser Studie in der Leber vorhandene Enantiomerenzusammensetzung in

ähnlichen Größenordnungen auch in den Lebern oder anderen verzehrbaren Geweben weiterer Tiere zu beobachten wäre.

Es zeigte sich erneut bei keiner der drei Clenbuterolquellen eine Zeitabhängigkeit des ausgeschiedenen S-Clenbuterolanteils (Abbildung 65).

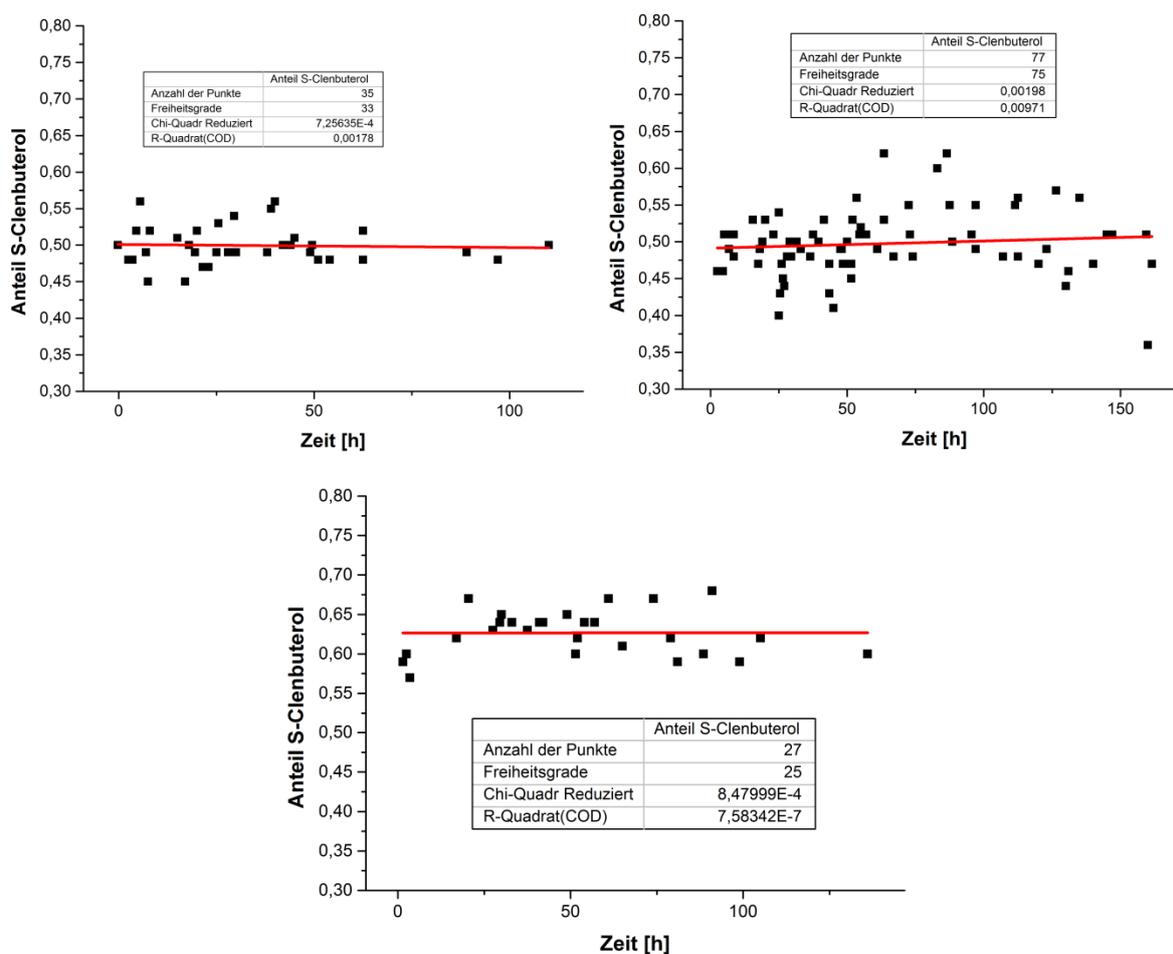


Abbildung 65: Lineare Regressionsmodelle für Muskelfleisch (oben links), Tabletten (oben rechts) und Leber (unten)

Anhand der Studiendaten kann mittels logistischer Regression die Wahrscheinlichkeit Clenbuterol über den Verzehr von Leber aufgenommen zu haben, in Abhängigkeit vom Anteil S-Clenbuterol im Urin darstellt werden (Abbildung 66).

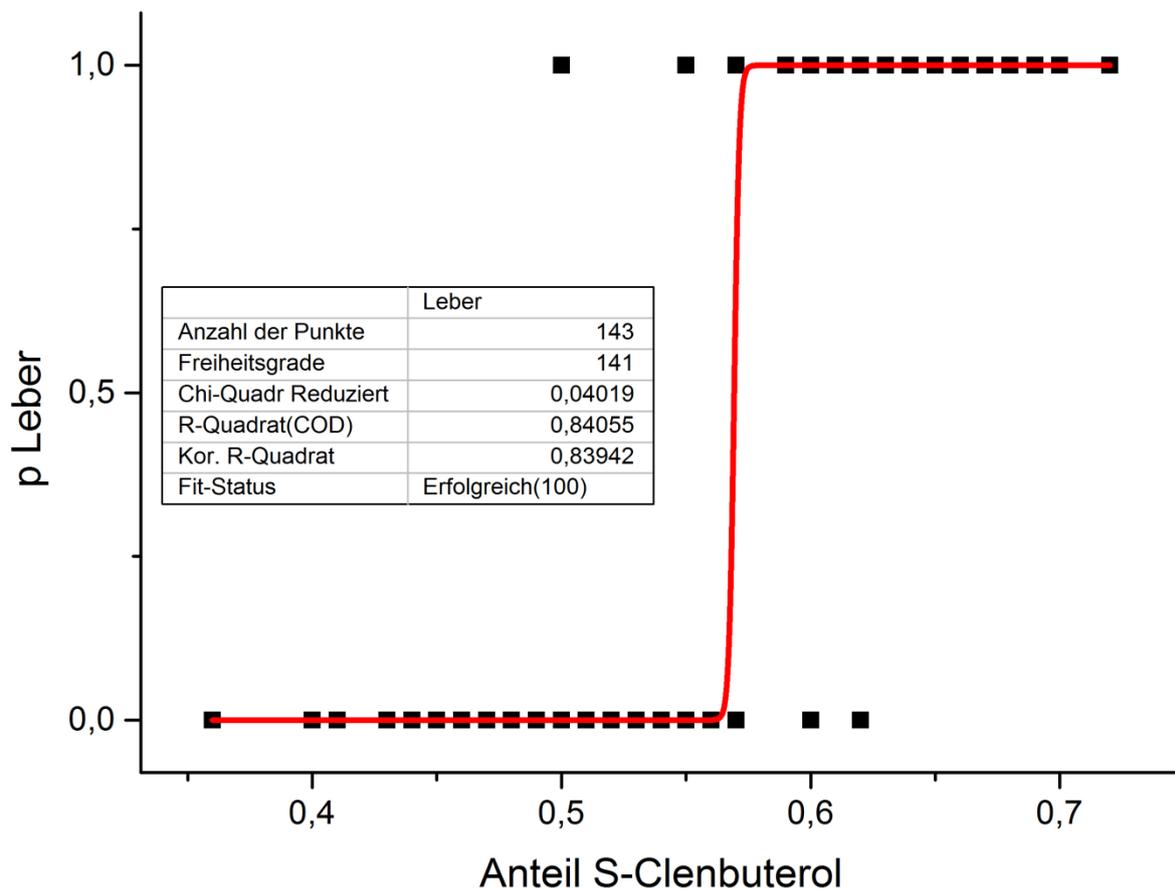


Abbildung 66: Wahrscheinlichkeit der Leberaufnahme vs. Anteil S-Clenbuterol im Urin

Dabei wäre ab einem S-Clenbuterolanteil von 0,572 in einer künftig gezogenen Urinprobe die Quelle des Clenbuterols mit 5% Irrtumswahrscheinlichkeit Leber und der Athlet damit entlastet. Alternativ könnte eine zukünftige Probe mittels Diskriminanzanalyse nach der Maximum-Likelihood-Methode einer der beiden Populationen zugewiesen werden. Die entsprechenden Dichtekurven dafür wurden mittels Kerndichteschätzung (Gaußkern, Bandbreite 0,05) approximiert und sind in Abbildung 67 dargestellt.

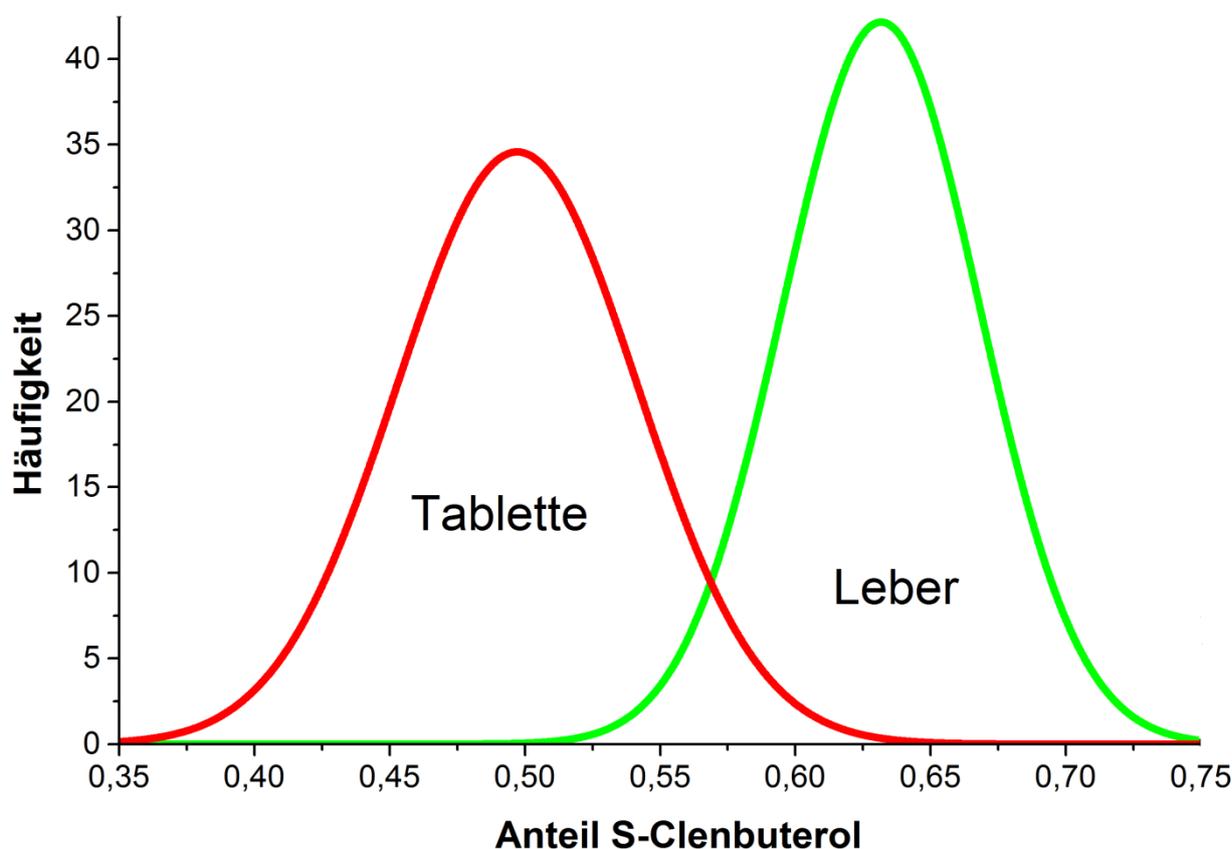


Abbildung 67: Dichtefunktionen der Tabletten- und Leberpopulation

Der Schnittpunkt der beiden Verteilungsfunktionen entspricht der Entscheidungsgrenze und liegt ebenfalls bei einem S-Clenbuterolanteil von ca. 0,57.

Beide Modelle gehen dabei von einem eingenommenen S-Clenbuterolanteil von 0,500 in den Arzneimitteln bzw. Schwarzmarktpräparaten und einem S-Clenbuterolanteil in der aufgenommenen Leber von 0,635 aus. Ersteres kann anhand der Ergebnisse aus Kapitel 3.3 als relativ gesichert angesehen werden. Bei den über Leber bzw. anderen tierischen Geweben aufgenommenen Enantiomerenzusammensetzungen muss allerdings hinterfragt werden, ob diese immer bei 0,635 liegen. Das vom RIKILT Wageningen UR behandelte zweite Rind zeigte einen signifikant anderen S-Clenbuterolanteil, sowohl in der Leber, als auch im Muskelfleisch (Tabelle 19). In der Literatur (vgl. Kapitel 2.2.1) finden sich darüber hinaus Angaben zu einem S-Clenbuterolanteil von ca. 73 % in Hähnchenleber nach Verabreichung unterschiedlicher Clenbuterolmengen (racemisch) über einen Zeitraum von zwei Wochen ohne Auswaschphase vor der Schlachtung [20]. Bei Schweinen liegen Daten in Abhängigkeit der Gewebeart und der Länge der Auswaschphase nach Verabreichung einer festgesetzten Clenbuterolmenge (racemisch) über eine Woche vor. Dabei zeigten sich in Schweinelunge S-

Clenbuterolanteile von 56 % bis 84 %, in Schweineniere von 57 % bis 84 % und in Schweineleber von 68 % bis 84 % [18]. Hier wären zusätzliche Daten zur spezies- und gewebeabhängigen Verteilung der Clenbuterolenantiomere im Tier hilfreich.

Für die Entlastung eines positiv getesteten Athleten wäre daher zukünftig eher die Frage entscheidend, ob sich der S-Clenbuterolanteil in seinen Proben signifikant von demjenigen der hier untersuchten Spiropent[®] Tabletten Gruppe unterscheidet. Dies könnte mit einem geeigneten Signifikanztest, z.B. mit einem Zweistichproben-t-Test, ggf. parameterfrei mittels U-Test geschehen oder unter Zugrundelegung der in Abbildung 67 dargestellten Dichtekurve der Tablettenpopulation (Mittelwert: 0,497, Standardabweichung: 0,087). Hierbei könnte ein Grenzwert festgelegt werden, bei dem eine Probe mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit der Tablettengruppe zuzuordnen wäre. Beispielsweise würde eine Probe mit 95 % Wahrscheinlichkeit der Tablettengruppe zugehören, wenn ihr Anteil S-Clenbuterol in einem Intervall des 1,96 fachen der Standardabweichung um den Mittelwert liegen würde.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Vor dem Hintergrund einer zunehmenden Zahl positiver Dopingkontrollproben auf Clenbuterol, die zum Teil auf den Verzehr verunreinigter Lebensmittel (Fleisch) zurückgingen, war es das Ziel dieser Arbeit, in Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner RIKILT Wageningen UR, die Möglichkeit zu eruieren, anhand der Enantiomerenzusammensetzung in einer Dopingkontrollprobe Rückschlüsse auf die Quelle der Substanz zu ziehen. Dazu wurden stereoselektive Analysemethoden für die Matrices Humanurin und Arzneimittel bzw. vom Kooperationspartner für Fleisch entwickelt und validiert. Die in der Literatur beschriebene Anreicherung des S-Enantiomers in den Organen von Schweinen, Hühnern und Ratten konnte für Rinderleber ebenso bestätigt werden, wie die vermutete racemische Zusammensetzung der clenbuterolhaltigen Arzneimittel bzw. Schwarzmarktprodukte.

Im Rahmen einer Applikationsstudie, in der diese drei Quellen mit ihren unterschiedlichen Enantiomerenverhältnissen appliziert wurden, konnte über die Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzung im Urin klar zwischen der Aufnahme der Leber und dem Arzneimittel unterschieden werden (Abbildung 68).

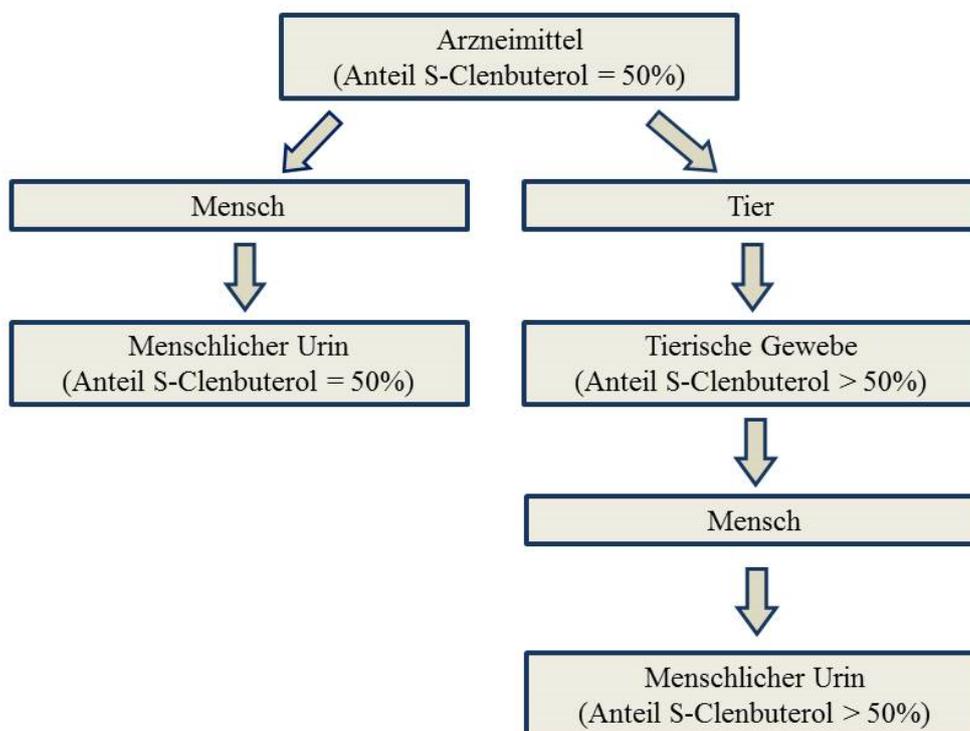


Abbildung 68: Unterscheidung der Clenbuterolquelle anhand der Enantiomerenzusammensetzung im Urin

Es bestünde somit bei einem positiven Clenbuterolbefund eine Entlastungsmöglichkeit zugunsten eines Athleten.

Anhand der Studienergebnisse konnte ein statistisches Modell erstellt werden, das die Festlegung eines Grenzwertes des S-Enantiomerenanteils im Urin ermöglichen würde, vorausgesetzt, die applizierte Enantiomerenzusammensetzung in der Leber des Versuchstieres ließe sich bei anderen Tieren bestätigen. Alternativ könnte mittels eines geeigneten Signifikanztests geprüft werden, ob sich die Proben eines positiv getesteten Athleten signifikant von denen der Gruppe unterscheiden, die das Arzneimittel eingenommen hatten.

Zudem wurde die Anwendbarkeit der HPLC-Modellingssoftware DryLab[®] für chirale Trennungen mit der für die Analytik der Clenbuterolenantiomere verwendeten Säule erfolgreich getestet.

Es wäre sicherlich nützlich mehr über intra- und interindividuelle sowie speziesabhängige Unterschiede in der Enantiomerenzusammensetzung der Gewebe der Tiere zu wissen. Darüber hinaus wäre auch der zeitliche Verlauf der Enantiomerenzusammensetzung in den Geweben der Tiere interessant. Insbesondere die Fragestellung, wann sich das Gleichgewicht zwischen den beiden Enantiomeren einstellt und ob bei unterschiedlichen Schlachtzeitpunkten nach Verabreichung auch unterschiedliche Enantiomerenzusammensetzungen auftreten können (Länge der Wash-out-Phase). Da auch Milch bzw. Milchprodukte als Quelle für Clenbuterolverunreinigungen in Lebensmitteln denkbar sind, sollten in diesem Zusammenhang auch Daten zur Enantiomerenzusammensetzung gesammelt werden.

Die Testung von DryLab[®] für chirale Trennungen mittels HPLC lieferte annehmbare Modelle und sollte anhand weiterer stationärer Phasen überprüft werden.

5 Summary and Outlook

Against the backdrop of an increasing number of positive doping control samples on Clenbuterol, which could partly clearly traced back to the consumption of contaminated food (meat), it was the aim of this work, in cooperation with our partner RIKILT Wageningen UR, to study the possibility whether the enantiomeric composition in a doping control sample allows for a distinction between the sources of Clenbuterol. Therefore stereoselective analytical methods for the matrices human urine and drugs, respectively for meat (cooperation partner) were developed and validated.

The enrichment of the S-enantiomer described in literature for the organs of pigs, chickens and rats could be confirmed for bovine liver as well as the assumed racemic composition of Clenbuterol containing drugs and black market products.

In an application study in which these three sources with their different enantiomeric compositions were applied, an indubitable distinction between the sources bovine liver and drug formulation could be achieved based on the determination of the enantiomeric composition in the urine samples of subjects (Abbildung 69).

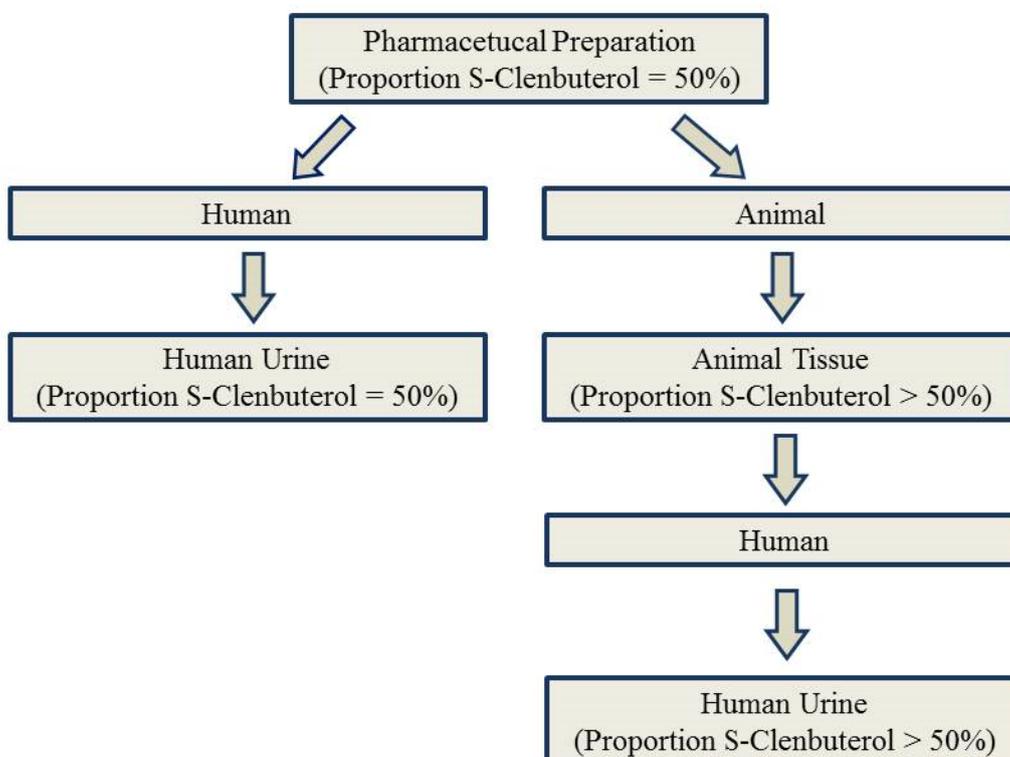


Abbildung 69: Discrimination of the source of Clenbuterol based on the determination of the enantiomeric composition in urine samples

So in cases of positive test results for Clenbuterol the opportunity of exoneration in favour of the athletes would now be given.

Based on the study results, a statistical model was build up which would allow for the setting of a limit of S-Clenbuterol in urine samples, provided that the applied enantiomeric composition in the liver of the experimental animal could be confirmed in that amount in other animals. Alternatively, an appropriate statistical hypothesis test could be used to test whether the samples of an athlete tested positive differ significantly from those of the group who had received the drug.

In addition, the applicability of the HPLC Modelling Software DryLab[®] has been successfully tested for chiral separations, with the column used for the analysis of the Clenbuterol enantiomers.

It would certainly be useful to know more about intra- and inter-individual and species dependent differences in the enantiomeric composition in the tissues of animals. In addition, it has to be clarified whether the enrichment of S-Clenbuterol in the organs of animals is in a temporal relation to the time of administration. In particular, at which point the equilibrium between the two enantiomers is reached and if slaughtering at different time points after administration of Clenbuterol to the animals lead to different enantiomeric ratios in tissues (length of the wash-out phase). Since milk and milk products are conceivable as a source of Clenbuterol in foodstuffs, additional data should be collected in this context for enantiomeric compositions.

The testing of DryLab[®] for chiral separations leads to acceptable models and should be verified on other stationary phases.

6 Material und Methoden

6.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wiesen mindestens p.a. Qualität auf.

Acetonitril	Fisher, Schwerte VWR International GmbH, Dresden
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniak 25%	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumformiat	Carl Roth, Karlsruhe
Clenbuterolhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
² H ₉ -Clenbuterol	Ehrenstorfer, Augsburg
R-(-)-Clenbuterol	Biozol, Eching
S-(+)-Clenbuterol	Biozol, Eching
Eisessig	Merck, Darmstadt
Hochdisperses Siliciumdioxid	Caelo, Hilden
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kohlenstoffdioxid	Air Liquide, Düsseldorf
Lactose-Monohydrat	Meggle, Wasserburg
Magnesiumstearat	Caelo, Hilden
Mefloquinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Maisstärke	Caelo, Hilden
Methanol	Fisher, Schwerte VWR International GmbH, Dresden
Povidon K25	BASF, Ludwigshafen
Promethazinhydrochlorid	Caelo, Hilden
R-(+)-Propranololhydrochlorid	Santa Cruz, Heidelberg

Salzsäure	Merck, Darmstadt
tert-Butylmethylether	Applichem, Darmstadt
Triethylamin	Merck, Darmstadt
Warfarin	Fluka, Neu-Ulm

6.2 Geräte und Software

6.2.1 Urinanalytik

	HPLC	SFC
Chromatographisches System	Waters Acquity H-Class [®]	Waters Acquity UPC ^{2®}
Säule	Astec Chirobiotic [®] V2 (150 mm x 4,6 mm; 5µm)	
Detektor	Waters Acquity TQD [®]	
Software	Empower 2 bzw. Empower 3	
Mobile Phase	A: 95 % Methanol mit 10 mM Ammoniumformiat B: 5 % Acetonitril	A: CO ₂ B: Methanol mit 0,1 % Ammoniak (25 % aq.) und 0,1 % Ameisensäure Linaren Gradient (50 % zu 60 % B in vier Minuten)
Temperatur	40 °C	50 °C
Fluss	0,6 ml/min	2 ml/min
MS-Parameter	ESI+, MRM Capillary Voltage: 3 kV Cone Voltage: 30 V Source Temperature: 150 °C Desolvation Temperature: 350 °C Desolvation Gas Flow: 700 l/h Cone Gas Flow: 50 l/h Cone und Desolvation Gas: Stickstoff Collision Energy: 17 V Collision Gas Flow: 0,25ml/min Collision Gas: Argon Clenbuterol MS/MS: 277 → 203 D ₉ -Clenbuterol MS/MS: 286 → 204	

Tabelle 21: Methodenparameter der Urinanalytik

6.2.2 Präparateanalytik

Chromatographisches System:	Waters Acquity UPLC [®]
Säule:	Astec Chirobiotic V2 (150 mm x 2,1 mm; 5 µm)
Detektoren:	Waters Synapt G2-S HDMS [®] ACQUITY-UPLC [®] -Photodiodenarray- Detektor
Software:	MassLynx 4.1
Mobile Phase:	Methanol mit 0,02 % v/v Additivgemisch aus Triethylamin und Eisessig (65 %:35%); isokratisch
Temperatur:	30 °C
Fluss:	0,5 ml/min
MS Parameter:	ESI+, MS/MS Mode
	Capillary Voltage: 3 kV
	Cone Voltage: 40 V
	Source Temperature: 80 °C
	Desolvation Temperature: 150 °C
	DesolvationGas/Flow: Stickstoff (500 l/h)
	Cone Gas Flow: 0 l/h
	Collision Energy: 16 eV
	Collision Gas Flow: 0,25 ml/min
	Collision Gas: Argon
	Clenbuterol MS/MS: 277 → 203 (Quantifier) 277 → 132 (Qualifier)
	Propranolol MS/MS: 260 → 183 (Quantifier) 260 → 74 (Qualifier)
	Low Mass Resolution: 4,7
UV-Detektion:	Clenbuterol UV: 244 nm
	Propranolol UV: 292 nm

6.2.3 Sonstige Geräte und Software

Analysenwaage Sartorius CPA225D	Sartorius, Göttingen
DryLab [®] 2010	Molnar Institut, Berlin
Eppendorf Research Kolbenhubpipette 10 µl -100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research Kolbenhubpipette 100 µl -1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research Kolbenhubpipette 1 ml -5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Festphasenextraktionssystem SupelMIP [®] (53225-U)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Flüssig-Flüssig Extraktion Extrelut [®] NT 3	Merck, Darmstadt
Flüssig-Flüssig Extraktion Isolute [®] SLE+ 2ml	Biotage, Uppsala (Schweden)
HPLC-Vials (Artikelnummer: 548-0081)	VWR International GmbH, Dresden
HS-Vials (Artikelnummer: 548-0151)	VWR International GmbH, Dresden
LiChrolut [®] Absaugeinheit	Merck KGaA, Darmstadt
Mehrfachdispenser HandyStep [®] electronic	Brand, Wertheim
Mendeley Desktop	Mendeley Ltd., New York (USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
OriginPro 9.0	OriginLab Corporation, Northampton (USA)
Probenkonzentrator Techne Sample Concentrator	Bibby Scientific, Stone (UK)
Reinstwassersystem LaboStar [®] 2-DI/ -UV	SG Wasseraufbereitung, Barsbüttel
Rotationsvakuumverdampfer Genevac [®] EZ-2	Genevac Inc, Stone Ridge (USA)
Rotationsvakuumverdampfer Speedvac [®] AES1000-240	Savant Instruments Inc., Farmingdale (USA)
Schüttelmaschine LS 10	Gerhardt, Bonn
Trocknungseinheit Techne Dri-Block [®] DB-3	Bibby Scientific, Stone (UK)
Ultraschallbad Sonorex TK 52	Bandelin, Berlin

6.3 Modellierung chiraler Trennungen mittels DryLab®

Alle Eckpunkts- und Verifizierungsläufe erfolgten auf einem Hewlett-Packard HP 1100 Flüssigchromatographiesystem mit G1315A DAD, unter Verwendung einer Astec Chirobiotic V2 Säule (150 mm x 2,1 mm, 5 µm) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min (Ausnahme Clenbuterol: Parameter wie in Kapitel 6.2.2). Das Injektionsvolumen betrug 1,0 µl die Konzentrationen der untersuchten Arzneistoffe lagen bei ca. 1 mg/ml.

Clenbuterol: Additivkonzentration

Eckpunkte	0,01 %	0,02 %	0,03 %
Verifizierung	0,015 %		0,025 %
Detektion	244 nm		

Tabelle 22: Eingabeläufe Clenbuterol: Additivkonzentration

Promethazin und Mefloquin: Ionenstärke gegen % B

Promethazin und Mefloquin			
Eckpunkte	40 % Wasser mit NH ₄ Ac (20 mM), 60 % Methanol	40 % Wasser mit NH ₄ Ac (30 mM), 60 % Methanol	40 % Wasser mit NH ₄ Ac (40 mM), 60 % Methanol
	20 % Wasser mit NH ₄ Ac (20 mM), 80 % Methanol	20 % Wasser mit NH ₄ Ac (30 mM), 80 % Methanol	20 % Wasser mit NH ₄ Ac (40 mM), 80 % Methanol
Verifizierung	30 % Wasser mit NH ₄ Ac (25 mM), 70 % Methanol	25 % Wasser mit NH ₄ Ac (25 mM), 75 % Methanol	
	30 % Wasser mit NH ₄ Ac (35 mM), 70 % Methanol	25 % Wasser mit NH ₄ Ac (35 mM), 75 % Methanol	
Temperatur	30 °C		
Detektion Promethazin	254 nm		
Detektion Mefloquin	220 nm		

Tabelle 23: Eingabeläufe Promethazin und Mefloquin: Ionenstärke gegen % B

Promethazin: Säulentemperatur gegen % B

Eckpunkte	40 % Wasser mit NH ₄ Ac (40 mM), 60 % Methanol, 20 °C	40 % Wasser mit NH ₄ Ac (40 mM), 60 % Methanol, 60 °C
	20 % Wasser mit NH ₄ Ac (40 mM), 80 % Methanol, 20 °C	20 % Wasser mit NH ₄ Ac (40 mM), 80 % Methanol, 60 °C
Verifizierung	30 % Wasser mit NH ₄ Ac (40 mM), 70 % Methanol, 40 °C	30 % Wasser mit NH ₄ Ac (40 mM), 70 % Methanol, 30 °C
	40 % Wasser mit NH ₄ Ac (35 mM), 60 % Methanol, 30 °C	
Detektion	254 nm	

Tabelle 24: Eingabeläufe Promethazin: Säulentemperatur gegen % B

Warfarin: pH

Fließmittel	70 % Wasser mit 0,5 % TEAA, 30 % Acetonitril		
Eckpunkte	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
Verifizierung	pH 4,5		pH 5,5
Temperatur	30 °C		
Detektion	280 nm		

Tabelle 25: Eingabeläufe Warfarin: pH

Warfarin: Säulentemperatur gegen % B

Eckpunkte	70 % Wasser mit 0,5 % TEAA (pH 4,0), 30 % Acetonitril, 30 °C	90 % Wasser mit 0,5 % TEAA (pH 4,0), 10 % Acetonitril, 30 °C
	70% Wasser mit 0,5% TEAA (pH 4,0), 30% Acetonitril, 60 °C	90 % Wasser mit 0,5 % TEAA (pH 4,0), 10 % Acetonitril, 60 °C
Verifizierung	85 % Wasser mit 0,5 % TEAA (pH 4,0), 15 % Acetonitril, 50 °C	80 % Wasser mit 0,5 % TEAA (pH 4,0), 20 % Acetonitril, 40 °C
Detektion	280 nm	

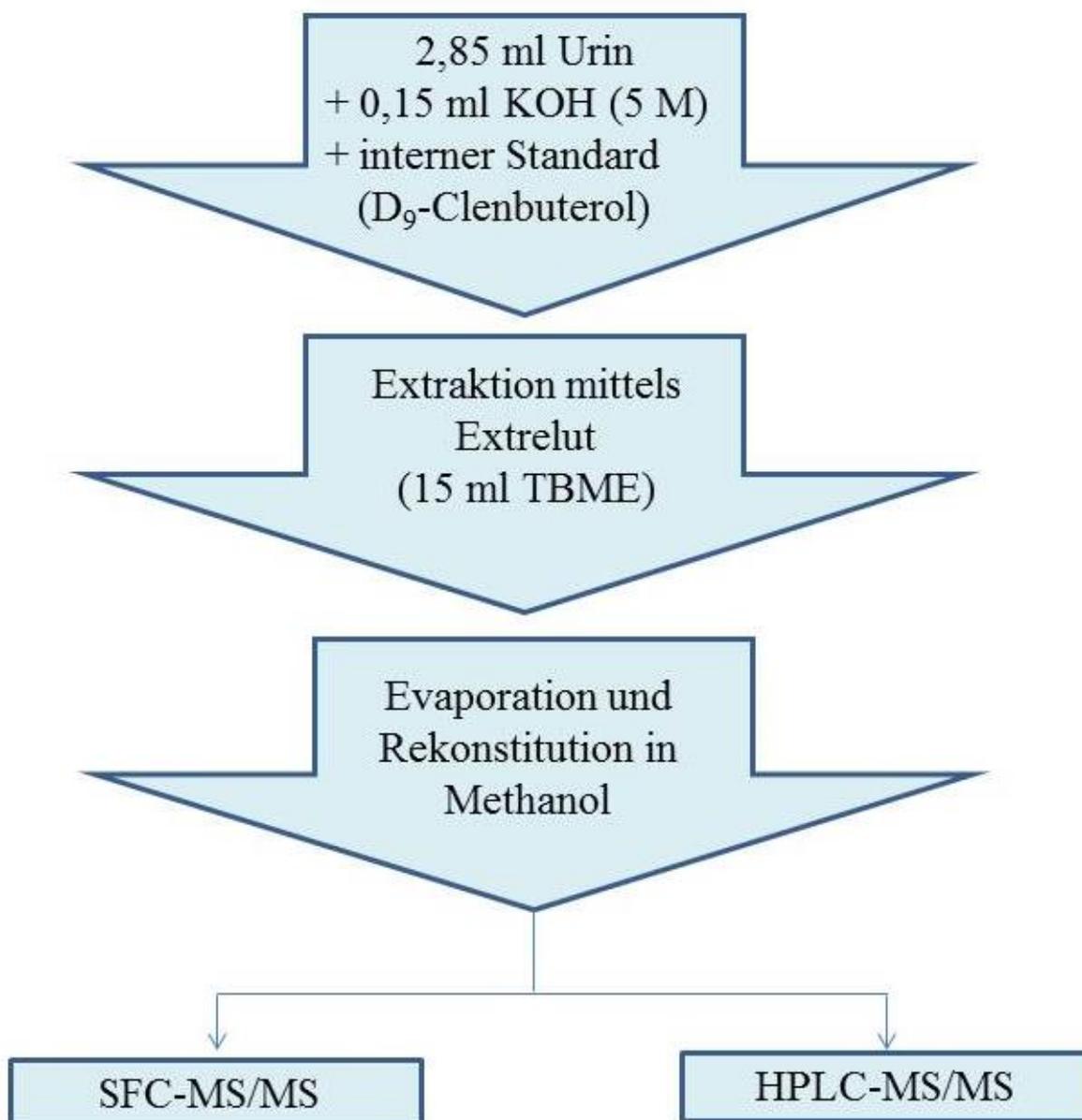
Tabelle 26: Eingabeläufe Warfarin: Säulentemperatur gegen % B

Der pH wurde eingestellt mit Eisessig bzw. Triethylamin.

6.4 Probenvorbereitung

6.4.1 Probenvorbereitung Urin mittels Extrelut[®] NT 3

Es werden je 2,85 ml Urin mit 0,15 ml wässriger Kaliumhydroxidlösung (5 M) und 60,0 µl methanolischer D₉-Clenbuterollösung (10 ng/ml) versetzt und sorgfältig durchmischt. Anschließend wird der Urin auf eine Extrelut[®] NT 3 Kartusche aufgegeben. Nach 10 min, in denen sich die Probe in der Kartusche verteilt, erfolgt die Elution mit 15,0 ml TBME in ein HS-Vial. Die Probe wird im Vakuum zur Trockne eingedampft. Zur Messung wird sie in 200,0 µl Methanol aufgenommen und in ein HPLC-Vial überführt. Vom Rekonstitut werden 10,0 µl ins chromatographische System eingespritzt (Fließschema: Abbildung 70).

Abbildung 70: Schema der Probenvorbereitung Urin mittels Extrelut[®] NT 3

6.4.2 Probenvorbereitung Urin mittels LLE

In Anlehnung an eine Prozedur nach [96]. Zu einem Aliquot von 5,0 ml Urin werden in ein verschließbares Reagenzglas 100,0 µl methanolische D₉-Clenbuterollösung (10 ng/ml) und 50,0 µl wässrige Kaliumhydroxidlösung (5M) hinzugefügt. Die Extraktion erfolgt mit 5,0 ml Diethylether für 15 Minuten durch Schütteln der Reagenzgläser in einem Reagenzglasschüttler. Nach Phasentrennung wurde die organische Phase in einen Scheidetrichter überführt und mit 400,0 µl Salzsäure (0,05 M) reextrahiert, wovon 10,0 µl ins chromatographische System eingespritzt werden.

6.4.3 Probenvorbereitung Urin mittels Isolute® SLE+ 2ml Kartuschen

Die Probenvorbereitung erfolgt nach Herstellerangaben. Ein Urinvolumen von 1,0 ml wird eins zu eins mit wässriger Ammoniaklösung (0,5 M) verdünnt, durchmischt und auf eine Kartusche aufgegeben, indem für zwei bis fünf Sekunden Vakuum angelegt wird (LiChrolut® Absaugeinheit). Nach fünf Minuten Wartezeit erfolgt die Elution mit zweimal 5,0 ml TBME, wobei jeweils nach fünf Minuten ein Vakuum zur Vervollständigung der Elution angelegt wird. Die Probe wird im Vakuum zur Trockne eingedampft. Zur Messung wird sie in 200,0 µl Methanol aufgenommen und in ein HPLC-Vial überführt. Vom Rekonstitut werden 10,0 µl ins chromatographische System eingespritzt.

6.4.4 Probenvorbereitung Urin mittels SupelMIP® Kartuschen

Die Probenvorbereitung erfolgt nach Herstellerangaben. Ein Urinvolumen von 1,0 ml wird eins zu eins mit Wasser verdünnt und auf pH 7 eingestellt (wässrige Kaliumhydroxidlösung (0,1 M)). Nach Konditionierung der Kartusche mit jeweils 1,0 ml Acetonitril und Wasser wird die Probe auf selbige aufgegeben (LiChrolut® Absaugeinheit). Anschließend wird die Probe dreimal mit 1,0 ml Wasser gewaschen, für zwei Minuten durch Anlegen eines Vakuums getrocknet und erneut mit 1,0 ml Acetonitril und 1,0 ml einer Mischung aus 60 % Acetonitril und 40 % Wasser gewaschen. Im Anschluss wird wiederum durch Anlegen eines Vakuums für zwei Minuten getrocknet. Sodann erfolgt die Elution des Analyten mit zweimal 1,0 ml einer einprozentigen Lösung von Ameisensäure in Acetonitril. Die Probe wird im Vakuum zur Trockne eingedampft. Zur Messung wird sie in 200,0 µl Methanol aufgenommen und in ein HPLC-Vial überführt. Vom Rekonstitut werden 10,0 µl ins chromatographische System eingespritzt.

6.4.5 Probenvorbereitung Präparate

Die Arzneiform wird abgewogen und -falls nötig- im Mörser homogenisiert. Die Einwaage wird so gewählt, dass die zu erwartenden Signale eines Aliquots innerhalb der Kalibriergeraden (vgl. Kapitel 6.5.3.1) liegen. Es werden fünf Aliquote abgenommen, in je ein Reagenzglas überführt und mit 2,0 ml Salzsäure (0,05 M) versetzt. Nach kurzem Umschütteln sowie sieben Minuten im Ultraschallbad werden 40,0 µl wässriger Kaliumhydroxidlösung (5 M) zugesetzt und erneut umgeschüttelt. Nach weiteren sieben

Minuten im Ultraschallbad wird die Probe auf eine Extrelut[®] NT 3 Kartusche überführt, wobei das Reagenzglas zweimal mit 400,0 μ l wässriger Kaliumhydroxidlösung (0,05 M) nachgespült wird. Nachdem sich die Probe 10 min lang in der Kartusche verteilt hat, erfolgt die Elution mit 15,0 ml TBME in ein HS-Vial. Die Probe wird unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Zur Messung wird sie in 100,0 μ l Methanol aufgenommen und in ein HPLC-Vial überführt (Fließschema: Abbildung 71). Davon werden 10,0 μ l der methanolischen Lösung ins chromatographische System eingespritzt.

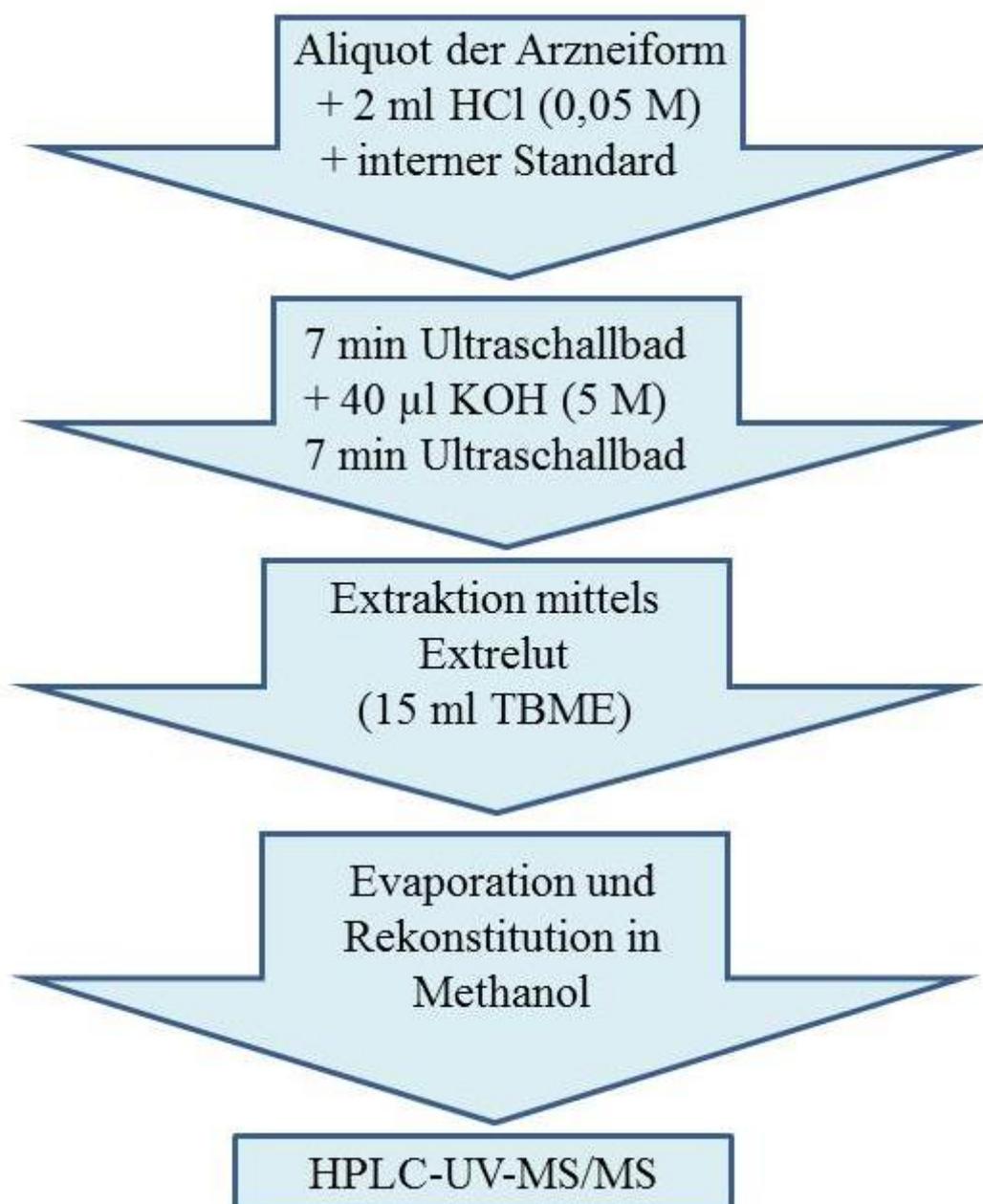


Abbildung 71: Schema der Probenvorbereitung zur Präparateanalytik

6.5 Methoden zur Validierung der Urin- und Präparateanalytik

6.5.1 Richtigkeit und Präzision

6.5.1.1 Präparateanalytik

Zu Kapitel 3.1.2.1. Da von den zugelassenen Arzneimitteln die Zusammensetzung nach Art und Menge über die Fachinformationen bekannt war, wurde vom Monopräparat Spiropent[®] eine Leermatrix, d.h. eine wirkstofffreie Mischung aller Hilfsstoffe, angefertigt (Tabelle 27).

Komponente	Anteil in %
Povidon K25	43,0
Lactose Monohydrat	37,0
Maisstärke	18,5
Magnesiumstearat	1,5

Tabelle 27: Zusammensetzung der Leermatrix

Anschließend wurde das Durchschnittsgewicht von zehn Spiropent[®] Tabletten ermittelt (Ergebnis: 162 mg). Weil immer fünf Aliquote aufgearbeitet werden sollten, um für jede einzelne der untersuchten Tabletten bzw. Arzneiformen eine statistisch gesicherte Aussage über die vorliegende Enantiomerenzusammensetzung treffen zu können, wurde dieser Wert durch sechs dividiert (27 mg, ein Verlustaliquot durch Homogenisieren der Arzneiform). Für jeden Anteil S-Clenbuterol (0,450, 0,500 und 0,555) wurden dann je fünfmal 27 mg Leermatrix abgewogen, mit den methanolischen Standardlösungen verschiedener S-Clenbuterolanteile versetzt und aufgearbeitet. Die Gesamtkonzentration an Clenbuterol pro Aliquot orientierte sich dabei an dem für einen Aliquoten einer Spiropent[®] Tablette zu erwartendem Wert (3,3 µg Clenbuterolhydrochlorid pro Aliquot).

6.5.1.2 Urinanalytik

Zu Kapitel 3.4.2.1. Zur Bestimmung wurden aus R- und S-Clenbuterol-Referenzsubstanz methanolische Standardlösungen, die S-Clenbuterolanteile von 0,444, 0,500 und 0,545 aufwiesen, hergestellt und Humanurin damit in der Gesamtkonzentration 33 pg/ml versetzt (Anteile S-Clenbuterol 0,545 und 0,444: n=6; Anteil S-Clenbuterol: n= 9). Mittels des in Kapitel 6.4.1 beschriebenen Extraktionsverfahrens erfolgte anschließend die Aufarbeitung.

Zum Vergleich der Matrices Wasser und Urin wurde Humanurin bzw. gereinigtes Wasser mit methanolischen Standardlösungen mit Anteilen S-Clenbuterol von 0,450 bzw. 0,550 versetzt ($n=3$, Gesamtkonzentration Clenbuterol 135 pg/ml Urin bzw. Wasser) und aufgearbeitet.

6.5.2 Wiederfindung

6.5.2.1 Präparateanalytik

Zu Kapitel 3.1.2.2. Die Wiederfindung wurde bestimmt, indem die Peakflächen der beiden Enantiomere einer mit racemischem Clenbuterol in der Konzentration 2,5 µg/Aliquot versetzten Leermatrixprobe nach Aufarbeitung (vgl. Kapitel 6.4.5, $n=3$), mit denen einer methanolischen Standardlösung entsprechender Konzentration verglichen wurden.

6.5.2.2 Urinanalytik

Zu Kapitel 3.4.2.2. Die Wiederfindung wurde bestimmt, indem die Peakflächen der beiden Enantiomere einer mit racemischem Clenbuterol in der Konzentration 33 pg/ml versetzten Urinprobe nach Aufarbeitung (vgl. Kapitel 6.4.1, $n=3$), mit denen einer methanolischen Standardlösung entsprechender Konzentration verglichen wurden.

6.5.3 Linearität

6.5.3.1 Präparateanalytik

Zu Kapitel 3.1.2.3. Es wurden immer 27 mg Leermatrix abgewogen und jeweils mit 0,1 µg, 1 µg, 2,5 µg, 5 µg und 10 µg racemischem Clenbuterolhydrochloridstandard (gelöst in Methanol) und mit 1 µg internem Standard R-Propranololhydrochlorid (gelöst in Methanol) versetzt und aufgearbeitet ($n=3$ für jeden Kalibrierpunkt).

6.5.3.2 Urinanalytik

Zu Kapitel 3.4.2.3. Zur Linearitätsbestimmung wurden an drei Tagen innerhalb einer Woche Kalibriergeraden aufgenommen. Dazu wurden jeweils „frische“ Urine mit unterschiedlichen Clenbuterolmengen (racemisch) versetzt und nach der Methode im Kapitel 6.4.1 aufgearbeitet. Nach Rekonstitution wurden die Proben geteilt und je ein Teil in das HPLC-MS/MS System und der andere in das SFC-MS/MS System injiziert (Abbildung 70).

Die Kalibriergerade reicht von 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 250 % bis 1000 % (n=3 für jeden Kalibrierpunkt), wobei der 100 % Wert 33 pg Clenbuterol (racemisch) pro ml Urin entspricht.

6.5.4 Spezifität

6.5.4.1 Präparateanalytik

Zu Kapitel 3.1.2.5. Es wurden drei Leermatrixproben und mit Clenbuterolhydrochlorid aufgestockte Proben aufgearbeitet und die Chromatogramme auf Interferenzen während der Retentionszeiten der Clenbuterolenantiomere hin untersucht.

6.5.4.2 Urinanalytik

Zu Kapitel 3.4.2.5. Zur Bestätigung der Spezifität wurden zwei Urinproben unterschiedlicher Personen halbiert und ein Teil ohne Zugabe, der andere nach Zugabe von racemischem Clenbuterol (33 pg/ml Urin) aufgearbeitet und vermessen.

6.5.5. Nachweis und Bestimmungsgrenze Urin

Zu Kapitel 3.4.2.4. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN 32645:2008-11 „Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung“ aus den Kalibriergeraden der einzelnen Enantiomere berechnet.

6.5.6 Probenstabilität der Urinproben während der Lagerung

Zu Kapitel 3.4.2.6. Sowohl das R- als auch das S-Enantiomer wurden vom Kooperationspartner RIKILT Wageningen UR in neutraler (Wasser), alkalischer (einprozentige Ammoniaklösung) und saurer (1 M Essigsäure) Lösung bei -20 °C, 4 °C und 37 °C über verschiedene Zeiträume inkubiert (0 Tage, 2 Tage, 7 Tage, 2 Wochen, 4 Wochen, 8 Wochen und 12 Wochen). Die Proben „Tag 0“ wurden sofort bei -80 °C gelagert, nach zwei Tagen wurden die Proben „Tag 2“ bei -80 °C eingelagert, nach sieben Tagen wurden die

Proben „Tag 7“ bei – 80 °C eingelagert, usw. Nach 12 Wochen wurden dann alle Proben analysiert.

Zur Bestimmung der Lagerungseinflüsse auf die Enantiomerenanteile in Urinproben wurden 100,0 ml Urin mit methanolischer Standardlösung des S-Clenbuterolanteils 0,454 zu 135 pg/ml aufgestockt und in 5 Teile separiert. Ein Teil wurde gleich aufgearbeitet und vermessen, die anderen nach 24 bzw. 48 Stunden im Kühlschrank, sowie nach einem bzw. zwei Einfrier-Auftau Zyklen (n=4 für jede Bedingung).

6.6 Durchführung der Applikationsstudie

Die Probanden sammelten über mehrere Tage hinweg Urin, wobei von jedem Probanden bereits vor Applikation der jeweiligen Quelle mehrere Urinproben verlangt wurden, um die Abwesenheit von Clenbuterol sicherzustellen (Tabelle 28).

Tag	gesammelte Urinproben
0	zwei bis vier Proben (preapplikativ)
1 (Applikation)	zwei Proben (preapplikativ) zwei bis vier Proben (postapplikativ)
2	drei bis sechs Proben (postapplikativ)
3	drei bis sechs Proben (postapplikativ)
4	zwei Proben (postapplikativ)
5	zwei Proben (postapplikativ)
6	zwei Proben (postapplikativ)
7	zwei Proben (postapplikativ)
8	zwei Proben (postapplikativ)

Tabelle 28: Sammelschema zur Gewinnung der Urinproben

Die Probanden wurden zufällig in Gruppen aufgeteilt und erhielten die jeweiligen Clenbuterolquellen nach Tabelle 29.

Clenbuterol- quelle	Anzahl Probanden	Clenbuterol- konzentration im Produkt	Verabreichte Clenbuterolmenge	Anteil S- Clenbuterol
Muskelfleisch	4	1,67 µg/kg*	0,84 µg	0,509±0,006*
Leber	4	41,79 µg/kg*	8,36 µg	0,635±0,004*
Spiropent® Tablette	4	17,7 µg/Tablette	17,7 µg	0,499±0,001
R-Clenbuterol- referenzsubstanz	1	-	1,0 µg	0,024
S-Clenbuterol- referenzsubstanz	1	-	1,0 µg	0,997

Tabelle 29: Übersicht zur Applikationsstudie, *vom Kooperationspartner RIKILT bestimmt

Die gesammelten Urinproben wurden nach Probenahme zügig eingefroren und zur Analyse gesammelt nach Berlin transportiert. Die Proben wurden aufgetaut, mittels des Verfahrens gemäß Kapitel 6.4.1 aufgearbeitet und mittels SFC-MS/MS analysiert. Es erfolgte für jede Probe eine Doppelaufarbeitung, wobei jede Aufarbeitung auch doppelt injiziert wurde.

6.7 Durchführung der Präparateanalytik

Es wurden von jedem Präparat jeweils fünf Aliquote aufgearbeitet (vgl. Kapitel 6.4.5) und analysiert. Das Präparat Ventipulmin Gel[®] war so hochviskos, dass es sich nicht pipettieren ließ und daher abgewogen wurde. Ein Überblick ist in Tabelle 30 gegeben.

Präparat	ggf. Gewicht der Arzneiform in mg	Aliquot	Einwaage in mg/ Volumen in ml
Spasmo-Mucosolvan® Tablette	122,28	I	20,3 mg
		II	20,3 mg
		III	19,5 mg
		IV	19,6 mg
		V	19,6 mg
Spasmo-Mucosolvan® Saft		I	2,0 ml
		II	2,0 ml
		III	2,0 ml
		IV	2,0 ml
		V	2,0 ml
Ventipulmin Gel®		I	98,9 mg
		II	98,8 mg
		III	102,6 mg
		IV	111,0 mg
		V	98,3 mg
Ventipulmin Granulat®		I	202,1 mg
		II	200,8 mg
		III	200,3 mg
		IV	200,0 mg
		V	201,4 mg
Planipart®		I	0,10 ml
		II	0,10 ml
		III	0,10 ml
		IV	0,10 ml
		V	0,10 ml
Clenbuterol International Pharmaceuticals	166,24	I	20,0 mg
		II	20,0 mg
		III	19,7 mg
		IV	19,7 mg
		V	20,0 mg
Spiropent® Boehringer Ingelheim (vom Schwarzmarkt)	164,59	I	19,9 mg
		II	19,8 mg
		III	20,1 mg
		IV	19,7 mg
		V	19,8 mg
Spiropent® Comprimidos Euror	162,69	I	19,8 mg
		II	20,1 mg
		III	19,9 mg
		IV	19,9 mg
		V	20,2 mg
E.C.A	Kapsel mit Inhalt: 161,40 Inhalt: 121,90	I	19,7 mg
		II	20,3 mg
		III	20,8 mg
		IV	19,9 mg
		V	19,9 mg
Anabolic Burner	133,57	I	19,9 mg
		II	21,8 mg
		III	19,7 mg
		IV	19,7 mg
		V	20,2 mg
Clenbuterol Tabletten(vmtl. russisch)	163,70	I	20,4 mg
		II	20,9 mg
		III	20,0 mg
		IV	19,9 mg
		V	20,0 mg

Tabelle 30 Übersicht zur Analytik der Präparate

6.8 Formeln und statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung, Grubbs-Test auf Ausreißer, F-Test auf Varianzhomogenität und Einstichproben-t-Test zur Überprüfung der Übereinstimmung zwischen gemessenem Mittelwert und nominalem Wert bzw. Zweistichproben-t-Test zum Vergleich der Mittelwerte zweier Messreihen und Varianzanalyse (ANOVA) zum Vergleich der Mittelwerte mehrerer Messreihen. Lag Varianzhomogenität vor, wurde auf den U-Test, bei mehreren Stichproben auf den Kruskal-Wallis-Test zurückgegriffen. Die Überprüfung einer Zeitabhängigkeit bzw. einer Konzentrationsabhängigkeit des ausgeschiedenen S-Clenbuterolanteils erfolgte mittels linearer Regression und t-Test des Regressionskoeffizienten. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Origin Pro 9.0.

In der Arbeit wurde mit 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit gerechnet. Folgende Formeln wurden verwendet.

Mittelwert:
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Standardabweichung:
$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Relative Standardabweichung:
$$rels = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Konfidenzintervall:
$$KI = \bar{x} \pm t_{(1-\alpha; n-1)} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Logistische Regression: mit
$$p = \frac{e^{a+bx}}{1+e^{a+bx}}$$
 (anstelle der Standardfunktion in OriginPro 9.0)

Kerndichteschätzer:
$$f(x) = \frac{1}{n \cdot h} \sum_{i=1}^n k \cdot \left(\frac{x-x_i}{h} \right);$$

$$\text{Gaußkern } k = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-0,5x^2}$$

h ...Bandbreite

Präzision zwischen den Tagen:
$$s_T(\%) = \frac{\sqrt{s_t^2 + QSI}}{\bar{x}} \cdot 100$$

mit: $s_t^2 = \frac{QSZ - QSI}{n}$

$$QSI = \sum_{i=1}^k (N_i - 1) \cdot s_i^2$$

$$QSZ = \sum_{i=1}^k N_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$$

wobei: \bar{x} ... Mittelwert aller Bestimmungen
 k ... Anzahl betrachteter Gruppen (hier Tage)
 N_i ... Anzahl Messungen innerhalb der i-ten Gruppe
 \bar{x}_i ... Mittelwert der i-ten Gruppe
 \bar{x} ... Mittelwert aller Gruppen
 s_i ... Standardabweichung der i-ten Gruppe

Anteil S-Clenbuterol Urin:

$$\frac{(Fläche\ S-CB/Fläche\ S-D_9-CB)}{((Fläche\ S-CB/Fläche\ S-D_9-CB)+(Fläche\ R-CB/Fläche\ R-D_9-CB))}$$

Anteil S-Clenbuterol Präparate:

$$\frac{Fläche\ S - CB}{Fläche\ S - CB + Fläche\ R - CB}$$

Auflösung Rs:

$$1,18 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{HWB_2 + HWB_1}$$

Reststandardabweichung s_y : $\sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

a	Kohäsionsdruck
A	Eddy-Diffusion
a.u.	arbitrary unit
α	Selektivität
AKT	Aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
b	Kohäsionsvolumen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CB	Clenbuterol
CE	Kapillarelektrophorese
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element binding protein
D	Diffusivität
d _f	Filmdicke der stationären Phase
D _m	Diffusivität des Eluenten in der mobilen Phase
d _p	Partikeldurchmesser
D _s	Diffusivität des Eluenten in der stationären Phase
DC	Dünnschichtchromatographie
DIN	Deutsches Institut für Normung
4E-BP1	eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1
Epo	Erythropoetin
FOXO	forkhead box O transcription factors
γ	Volumenausdehnungskoeffizient

GC	Gaschromatographie
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H	Bodenhöhe
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HS	Head space
HSL	hormonsensitive Lipasen
HWB	Halbwertsbreite
IAAF	International Association of Athletics Federations
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IOC	International Olympic Committee
IRMS	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
k	Retentionsfaktor
κ	Kompressibilität
KI	Konfidenzintervall
KOH	Kaliumhydroxid
L	Lösungsvermögen
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion
MAFbx	muscle atrophy F-box
MLCK	Myosin-light-chain-kinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Massenspektrometrie

m-TOR	mechanistic Target of Rapamycin
MuRF1	muscle RING finger 1
n	Stoffmenge
NADA	Nationale Anti-Doping Agentur Deutschland
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NOR1	neuron-derived orphan receptor 1
NP-HPLC	Normalphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
p	Druck
p70 ^{s6K}	p70 ribosomal protein S6 kinase
PDA	Photodioden-array-Detektor
PKA	Proteinkinasen vom Typ A
Q-TOF	Quadrupole Time-of-Flight
R	universelle Gaskonstante
R-CB	R-(-)-Clenbuterol
rels	relative Standardabweichung
Rs	Auflösung
ρ	Dichte
s	Standardabweichung
s _y	Reststandardabweichung
S-CB	S-(+)-Clenbuterol
SLE	unterstützte Flüssig-Flüssig-Extraktion
SFC	supercritical fluid chromatography
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SPE	Festphasenextraktion
T	Temperatur

TBME	tert-Butylmethylether
TEAA	Triethylammoniumacetat
TGF- β	transforming growth factor β
TQD	Triple-Quadrupol-Detektor
t_r	Retentionszeit
u	Geschwindigkeit der mobilen Phase
UHPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
UV	ultraviolett
V	Volumen
WADA	Welt-Anti-Doping Agentur

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln der Clenbuterolenantiomere.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Fragestellung dieser Arbeit.....	3
Abbildung 3: Jährliches Aufkommen untersuchter A-Proben und Clenbuterolbefunde.....	6
Abbildung 4: Metabolismus des Clenbuterols beim Hund.....	8
Abbildung 5: G_{α_s} -vermittelte Bronchodilatation, ausgelöst durch Clenbuterol	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung der G_{α_s} bzw. G_{α_i} vermittelten Wirkungen von β_2 -	13
Abbildung 7: Signalweg der β -vermittelten Lipolyse in Adipozyten	14
Abbildung 8: Phasendiagramm von Kohlenstoffdioxid (nicht maßstabsgetreu)	15
Abbildung 9: Physikalische Eigenschaften der mobilen Phasen in der Chromatographie.....	16
Abbildung 10: Typische SFC Bedingungen für verschiedene Analyten.....	21
Abbildung 11: Schematische Darstellung des apparativen Aufbaus eines analytischen SFC-Systems.....	22
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Rückdruckregulators	23
Abbildung 13: Prinzip kinetischer (links) und dynamisch kinetischer (rechts) Racematspaltung	25
Abbildung 14: Struktur von Whelk-O1, einer typischen Pirkle Phase.....	26
Abbildung 15: Übersicht zu den Polysaccharidphasen	28
Abbildung 16: Strukturen der zur Chromatographie verwendeten Cyclodextrine	29
Abbildung 17: Strukturformel von Vancomycin	30
Abbildung 18: HPLC-UV Chromatogramme der Referenzstandards R-Clenbuterol (B), S-Clen-	
buterol (C) und UV- (D) sowie MS-Chromatogramme von D ₉ -Clenbuterol (E)	32
Abbildung 19: Produktionenspektrum vom Clenbuterol (Q-TOF, Mutterion: $M+[H]^+$, $m/z=277,2$)...33	
Abbildung 20: Genauigkeit der Bestimmung des S-Clenbuterolanteils mittels MS-MS- bzw. UV-.....	
Detektion (Mittelwert mit 95% KI; n=5)	35
Abbildung 21: Chromatogramm einer mit S-Clenbuterolanteil 0,450 gespikten Probe; oben MS-MS- ..	
Spur, unten UV-Spur	35
Abbildung 22: Chromatogramm einer mit S-Clenbuterolanteil 0,555 gespikten Probe; oben MS-MS- ..	
Spur, unten UV-Spur.....	36
Abbildung 23: Kalibriergeraden von UV- und MS-MS-Detektion	38
Abbildung 24: Overlaychromatogramme einer Leerprobe und einer aufgestockten Probe,	
Clenbuterolenantiomere (oben), R-(+)-Propranolol (unten)	40
Abbildung 25: Chromatogramme der Clenbuterolenantiomere bei verschiedenen Ionenstärken	
(2,5 mM Ammoniumformiat (oben) und 10 mM Ammoniumformiat (unten))	42
Abbildung 26: Chromatogramme bei 0,01 % (oben) und 0,03 % (unten) Additivzusatz	43
Abbildung 27: Resolution map für die Trennung mit unterschiedlichen Additivzusätzen	44
Abbildung 28: Vorhergesagtes (oben) und gemessenes Chromatogramm (unten) bei 0,025%	
Additivzusatz	45

Abbildung 29: Strukturformeln von S-Promethazin, R-Promethazin, (S,R)-Mefloquin und (R,S)- Mefloquin (v.l.n.r.)	46
Abbildung 30: Resolution maps zur Trennung der Promethazin- (oben) und Mefloquinenantiomere (unten); Ionenstärke gegen % B.....	47
Abbildung 31: Trennung der Promethazinenantiomere bei 35 mM Ammoniumacetat und 75% Methanol; von DryLab [®] vorhergesagt (oben) und experimentell ermittelt (unten)	49
Abbildung 32: Resolution map zur Trennung der Promethazinenantiomere; Säulentemperatur gegen % B	50
Abbildung 33: Strukturformeln von R-Warfarin (links) und S-Warfarin (rechts).....	51
Abbildung 34: Resolution map zur pH-abhängigen Trennung der Warfarinenantiomere	52
Abbildung 35: Vergleich gemessener (A, pH 5,5; C, pH 4,5) und vorhergesagter (B, pH 5,5; D, pH 4,5) Chromatogramme der Warfarinenantiomere bei unterschiedlichen pH-Werten der mobilen Phase.....	53
Abbildung 36: Resolution map zur Trennung der Warfarinenantiomere; Säulentemperatur gegen % B	54
Abbildung 37: Vergleich des bei 50 °C, 15 % Acetonitril gemessenen (oben) und vorhergesagten (unten) Chromatogramms der Warfarinenantiomere	55
Abbildung 38: Fotos einiger der untersuchten Schwarzmarkpräparate	56
Abbildung 39: Anteile S-Clenbuterol in den untersuchten Präparaten (Mittelwert mit 95% KI; n=5 für jedes Präparat).....	58
Abbildung 40: Chromatogramm eines Aliquots einer Spasmo-Mucosolvan Tablette (UV-Spur oben, MS/MS-Spur unten).....	59
Abbildung 41: Chromatogramm einer unverdünnten Probe des Präparates E.C.A.	60
Abbildung 42: Chromatogramm einer verdünnten Probe des Präparates E.C.A.	60
Abbildung 43: Overlay-Chromatogramm Clenbuterol gespikter Urinaliquote mit den verschiedenen Extraktionssystemen, gemessen mit SFC-MS/MS	63
Abbildung 44: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	64
Abbildung 45: Versuchsaufbau im Labor	65
Abbildung 46: Graphische Darstellung der Genauigkeit der beiden Verfahren (Mittelwert mit 95% KI).....	66
Abbildung 47: Plot der gemessenen Anteile S-CB in Abhängigkeit von der Konzentration (SFC oben, HPLC unten)	67
Abbildung 48: Vergleich der gemessenen S-Clenbuterolanteile nach Extraktion von aufgestocktem Wasser bzw. Urin (Mittelwert mit 95% KI; n=3)	68
Abbildung 49: Kalibriergeraden von HPLC und SFC	70
Abbildung 50: Overlaychromatogramm SFC.....	72
Abbildung 51: Overlaychromatogramm HPLC.....	72

Abbildung 52: Overlaychromatogramm von Leerproben der untersuchten Massenübergänge;	73
Abbildung 53: S-Clenbuterol (oben) und R-Clenbuterol (unten) nach verschiedenen Inkubations- zeiten in saurer Lösung, T=37 °C	74
Abbildung 54: Mechanismus der säurekatalysierten Racemisierung der Enantiomere	75
Abbildung 55: Einfluss von Lagerungsbedingungen auf die Enantiomerenzusammensetzung (Mittelwert mit 95% KI; n=4)	75
Abbildung 56: Overlaychromatogramme SFC zu Lagerung im Kühlschrank (oben) und Einfrier- Auftau-Zyklen (unten)	76
Abbildung 57: Beispielhaftes Ausscheidungsprofil von Proband S3 nach Applikation von 10 µg Clenbuterol	79
Abbildung 58: Mittlere Anteile S-Clenbuterol im Urin nach Aufnahme verschiedener Mengen Clenbuterol (Mittelwert mit 95% KI)	79
Abbildung 59: Beispielhafte lineare Regressionsmodelle für die Applikation von 1 µg Clenbuterol...80	
Abbildung 60: Gegenüberstellung der gemessenen Enantiomerenzusammensetzung im Urin der Probanden und der applizierten Quellen (Mittelwert mit 95% KI)	82
Abbildung 61: Ausscheidungsprofil nach Applikation von Muskelfleisch.....84	
Abbildung 62: Ausscheidungsprofil nach Applikation einer Spiropent® Tablette	85
Abbildung 63: Ausscheidungsprofil nach Applikation von Leber	86
Abbildung 64: Ausscheidungsprofil nach Applikation von S-Clenbuterol (oben) und R-Clenbuterol (unten)	87
Abbildung 65: Lineare Regressionsmodelle für Muskelfleisch (oben links), Tabletten (oben rechts).... und Leber (unten).....88	
Abbildung 66: Wahrscheinlichkeit der Leberaufnahme vs. Anteil S-Clenbuterol im Urin	89
Abbildung 67: Dichtefunktionen der Tabletten- und Leberpopulation.....90	
Abbildung 68: Unterscheidung der Clenbuterolquelle anhand der Enantiomerenzusammensetzung im Urin	92
Abbildung 69: Discrimination of the source of Clenbuterol based on the determination of the enantiomeric composition in urine samples	94
Abbildung 70: Schema der Probenvorbereitung Urin mittels Extrelut® NT 3	102
Abbildung 71: Schema der Probenvorbereitung zur Präparateanalytik	104

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fallberichte über das Auftreten clenbuterolkontaminierter Lebensmittel	1
Tabelle 2: Vergleich physikalischer Größen zwischen den Aggregatzuständen	15
Tabelle 3: Wiederfindung aus aufgestockter Leermatrix	37
Tabelle 4: Umfang der analytischen Validierung nach ICH Q2(R1).....	39
Tabelle 5: Übersicht zur Methodvalidierung der Präparateanalytik.....	41
Tabelle 6: Vergleich vorhergesagter und gemessener Retentionszeiten der Clenbuterolenantiomere ... bei 0,015 % und 0,025 % Additivkonzentration	45
Tabelle 7: Vergleich vorhergesagter und gemessener Retentionszeiten der Promethazin- und Mefloquinenantiomere bei unterschiedlichen Ionenstärken und Methanolanteilen..... der mobilen Phase.....	48
Tabelle 8: Vergleich vorhergesagter und gemessener Retentionszeiten der Promethazinenantiomere ... bei unterschiedlichen Säulentemperaturen und Methanolanteilen der mobilen Phase	50
Tabelle 9: Vergleich vorhergesagter und gemessener Retentionszeiten der Warfarinenantiomere..... bei unterschiedlichen pH Werten der mobilen Phase	52
Tabelle 10: Vergleich vorhergesagter und gemessener Retentionszeiten der Warfarinenantiomere bei unterschiedlichen Acetonitrilanteilen und Säulentemperaturen.....	54
Tabelle 11: Ergebnisse der Analytik der in Deutschland zugelassenen Arzneimitteln (mit* ge-..... kennzeichnet) und Schwarzmarktprodukte (Mittelwert mit 95% KI; n=5 für jedes Präparat).....	57
Tabelle 12: Mittels LLE selbst (oben) und von einer Mitarbeiterin aufgearbeitete Urinproben (unten).....	62
Tabelle 13: Genauigkeit der Messungen mittels SFC und HPLC (Mittelwert mit 95% KI; n=6 für 0,545 und 0,444; n=9 für 0,500)	66
Tabelle 14: Wiederfindung in Urinproben mittels HPLC und SFC.....	69
Tabelle 15: Bestimmtheitsmaße und Reststandardabweichungen der Kalibriergeraden	71
Tabelle 16: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645	71
Tabelle 17: Übersicht zur Methodvalidierung der Urinanalytik (Daten aus urinärer Matrix)	77
Tabelle 18: Mittlere Anteile S-Clenbuterol in Urinproben zweier Probanden nach Appli-..... kation racemischen Clenbuterols (Mittelwert mit 95% KI)	78
Tabelle 19: Konzentrationen und stereochemische Zusammensetzung der Clenbuterolrückstände im Kalb (Mittelwert mit 95% KI; n=4); Daten vom Kooperationspartner RIKILT	81
Tabelle 20: Mittlerer S-Clenbuterolanteil im Urin der Probanden (Mittelwert mit 95% KI).....	82
Tabelle 21: Methodenparameter der Urinanalytik	97
Tabelle 22: Eingabeläufe Clenbuterol: Additivkonzentration	100
Tabelle 23: Eingabeläufe Promethazin und Mefloquin: Ionenstärke gegen % B	100

7 Anhang

Tabelle 24: Eingabeläufe Promethazin: Säulentemperatur gegen %B.....	100
Tabelle 25: Eingabeläufe Warfarin: pH	101
Tabelle 26: Eingabeläufe Warfarin: Säulentemperatur gegen % B	101
Tabelle 27: Zusammensetzung der Leermatrix	105
Tabelle 28: Sammelschema zur Gewinnung der Urinproben.....	109
Tabelle 29: Übersicht zur Applikationsstudie	109
Tabelle 30: Übersicht zur Analytik der Präparate.....	111

7.4 Literaturverzeichnis

- [1] N.J. Rothwell, P.W. Emery, M.J. Stock, P.D. Winter, "Chronic effects of β 2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat", *Biosci. Rep.*, 4, (1984), p. 83–91.
- [2] C.A. Maltin, S.M. Hay, M.I. Delday, G.E. Lobley, P.J. Reeds, "The action of the beta-agonist clenbuterol on protein metabolism in innervated and denervated phasic muscles.", *Biochem. J.*, 261, (1989), p. 965–71.
- [3] Y.T. Yang, M.A. McElligott, "Multiple actions of β -adrenergic agonists adipose tissue", *Biochem. J.*, 261, (1989), p. 1–10.
- [4] H.-K. Kim, M.A. Della-Fera, D.B. Hausman, C.A. Baile, "Effect of clenbuterol on apoptosis, adipogenesis, and lipolysis in adipocytes.", *J. Physiol. Biochem.*, 66, (2010), p. 197–203.
- [5] E.F. Carrington, M. Desautels, J.M. Naylor, " β -Adrenergic stimulated lipolysis in pony adipocytes is exclusively via a β 2-subtype and is not affected by lactation", *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, 136, (2003), p. 311–320.
- [6] The Council of the European Union, Council Directive 96/22/EC, (1996).
- [7] Food Safety and Inspection Service-United States Department of Agriculture, "<http://www.fsis.usda.gov/Oa/background/clenbute.htm?redirecthttp=true>", (n.d.), p. Zugriff am 23.10.2013.
- [8] H. Bottemiller, "Amid Scandal, China Bans More Food Additives", *Food Safety News*. vom 26.04.2011.
- [9] S. Maistro, E. Chiesa, R. Angeletti, G. Brambilla, "Beta blockers to prevent clenbuterol poisoning", *Lancet.*, 346, (1995), p. 180.
- [10] G. Brambilla, T. Cenci, F. Franconi, R. Galarini, A. Macrì, F. Rondoni, et al., "Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy.", *Toxicol. Lett.*, 114, (2000), p. 47–53.
- [11] Martinez-Navarro, "Food poisoning related to consumption of illicit β -agonist in liver", *Lancet.*, 336, (1990), p. 1311.
- [12] L. Salleras, A. Domínguez, E. Mata, J.L. Taberner, I. Moro, P. Salvà, "Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain.", *Public Health Rep.*, 110, (1992), p. 338–42.
- [13] J. Barbosa, C. Cruz, J. Martins, J.M. Silva, C. Neves, C. Alves, et al., "Food poisoning by clenbuterol in Portugal.", *Food Addit. Contam.*, 22, (2005), p. 563–6.
- [14] D.J. Pulce C., Lamaison D., Keck G., Bostvironnois C., Nicolas J., "Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver", *Vet Hum Toxicol.*, 33(5), (1991), p. 480–481.

- [15] M. Thevis, L. Geyer, H. Geyer, S. Guddat, J. Dvorak, A. Butch, et al., "Adverse analytical findings with clenbuterol among U-17 soccer players attributed to food contamination issues.", *Drug Test. Anal.*, 5, (2013), p. 372–376.
- [16] MoniQA Emerging Issues Working Group, MoniQA Fact Sheet No 3 on Clenbuterol, (2009).
- [17] Pressemitteilung der NADA, "Clenbuterol-Warnung für Mexico" vom 04.04.2011.
- [18] D.J. Smith, "Stereochemical composition of clenbuterol residues in edible tissues of swine", *J. Agric. Food Chem.*, 48, (2000), p. 6036–6043.
- [19] I. Hirosawa, M. Ishikawa, M. Ogino, H. Ito, T. Hirao, H. Yamada, et al., "Enantioselective disposition of clenbuterol in rats", *Biopharm. Drug Dispos.*, 35, (2014), p. 207–217.
- [20] D.J. Smith, "Total Radioactive Residues and Clenbuterol Residues in Edible Tissues, and the Stereochemical Composition of Clenbuterol in Livers of Broilers after Exposure to Three Levels of Dietary [¹⁴C]Clenbuterol HCl and Three Preslaughter Withdrawal Periods", *J. Anim. Sci.*, 76, (1998), p. 3043–3053.
- [21] C. Gausepohl, G. Blaschke, "Stereochemical determination of clenbuterol in human urine by capillary electrophoresis.", *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 713, (1998), p. 443–6.
- [22] M. Verroken, "Drug use and abuse in sport", *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 14, (2000), p. 1–23.
- [23] W. Schänzer, M. Thevis, "Doping im Sport", *Med. Klin.*, 102, (2007), p. 631–46.
- [24] R. Junkes, Diplomarbeit: "Die Geschichte des Dopings im Sport und der Kampf gegen Doping am Beispiel der Sportart Leichtathletik," Deutsche Sporthochschule Köln, (2001).
- [25] L.D. Bowers, "Anti-dope testing in sport: the history and the science.", *FASEB J.*, 26, (2012), p. 3933–6.
- [26] International Olympic Committee, "The fight against doping and promotion of athletes' health," (2014).
- [27] Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, "Fachinformation Spiropent® 0,02 mg Tabletten," (2014).
- [28] Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Fachinformation Ventipulmin® Gel, (2007).
- [29] Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, "Fachinformation Planipart," (2008).
- [30] Morgan, "Clinical pharmacokinetics of beta-agonists", *Clin. Pharmacokinet.*, 18(4), (1990), p. 270–294.

- [31] I. Yamamoto, I. Kohji, M. Nakashima, "Pharmakokinetics of Plasma and Urine Clenbuterol in Msn, Rat and Rabbit", *J.Pharmacobio-Dyn.*, 8, (1985), p. 385–391.
- [32] EMEA-Committee for Veterinary Medicinal Products, "Clenbuterol Summary Report," (2000).
- [33] L.R. Soma, C.E. Uboh, F. Guan, P. Moate, Y. Luo, D. Teleis, et al., "Pharmacokinetics and disposition of clenbuterol in the horse.", *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 27, (2004), p. 71–7.
- [34] FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, "Residues of some veterinary drugs in animals and foods.," 1997.
- [35] D. Zalko, G. Bories, J. Tulliez, "Metabolic Fate of Clenbuterol in Calves", *J. Agric. Food Chem.*, 46, (1998), p. 1935–1943.
- [36] Waldeck B., "Steric aspects of agonism and antagonism at beta-adrenoceptors: experiments with the enantiomers of clenbuterol", *Acta Pharmacol Toxicol.*, 56, (1985), p. 221–227.
- [37] R. Fredriksson, M.C. Lagerström, L.-G. Lundin, H.B. Schiöth, "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.", *Mol. Pharmacol.*, 63, (2003), p. 1256–72.
- [38] J.P. Pin, "EMBO MEMBERS ' REVIEW Molecular tinkering of G protein-coupled receptors : an evolutionary success", *EMBO J.*, 18, (1999), p. 1723–1729.
- [39] M.J. Lohse, "G-Proteins and their regulators.", *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, 360, (1999), p. 3–4.
- [40] A.R. Gosmanov, "Duality of G protein-coupled mechanisms for β -adrenergic activation of NKCC activity in skeletal muscle", *Am J Physiol Cell Physiol.*, 283, (2002), p. C1025–C1032.
- [41] R.P. Xiao, "Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins.", *Sci. STKE.*, (2001).
- [42] R.-P. Xiao, P. Avdonin, Y.-Y. Zhou, H. Cheng, S.A. Akhter, T. Eschenhagen, et al., "Coupling of 2-Adrenoceptor to Gi Proteins and Its Physiological Relevance in Murine Cardiac Myocytes", *Circ. Res.*, 84, (1999), p. 43–52.
- [43] M. Johnson, "Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists.", *Paediatr. Respir. Rev.*, 2, (2001), p. 57–62.
- [44] R. Miller, J. Silver, T. Stull, "Role of Myosin Adrenergic Light Chain Kinase Relaxation of Tracheal Phosphorylation Smooth Muscle in Beta- calmodulin", *Mol. Pharmacol.*, 24, (1983), p. 235–242.
- [45] S. Kim, R. Sainz, P. Molenaar, R. Summers, "CHARACTERIZATION OF β 1 & β 2 ADRENOCEPTORS IN RAT SKELETAL MUSCLES", *Biochem. Pharmacol.*, 42, (1991), p. 1783–1789.

- [46] M.N. Sillence, M.L. Matthews, W.G. Spiers, G.G. Pegg, D.B. Lindsay, "Effect of clenbuterol, ICI118551 and sotalol on the growth of cardiac and skeletal muscle on β 2-adrenoreceptor density in female rats", *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, 344, (1991), p. 449–453.
- [47] R.T. Hinkle, K.M.B. Hodge, D.B. Cody, R.J. Sheldon, B.K. Kobilka, R.J. Isfort, "Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor.", *Muscle Nerve.*, 25, (2002), p. 729–34.
- [48] B. Mayr, M. Montminy, "Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB.", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, (2001), p. 599–609.
- [49] M.A. Pearen, S.A. Myers, S. Raichur, J.G. Ryall, G.S. Lynch, G.E.O. Muscat, "The orphan nuclear receptor, NOR-1, a target of beta-adrenergic signaling, regulates gene expression that controls oxidative metabolism in skeletal muscle.", *Endocrinology.*, 149, (2008), p. 2853–65.
- [50] M.A. Pearen, J.G. Ryall, M.A. Maxwell, N. Ohkura, G.S. Lynch, G.E.O. Muscat, "The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle.", *Endocrinology.*, 147, (2006), p. 5217–27.
- [51] A. McPherron, "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member", *Nature.*, 387, (1997), p. 83–90.
- [52] M. Schuelke, K.R. Wagner, L.E. Stolz, "Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child.", *N. Engl. J. Med.*, 350, (2004), p. 2682–8.
- [53] C. Murga, L. Laguinge, A. Cuadrado, R. Wetzker, J. Gutkind, "Activation of Akt / Protein Kinase B by G Protein-coupled Receptors", *J. Biol. Chem.*, 273, (1998), p. 19080–19085.
- [54] P. Schmidt, F. Holsboer, D. Spengler, " β 2-Adrenergic Receptors Potentiate Glucocorticoid Receptor Transactivation via G Protein β Subunits and the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway", *MOL ENDO.*, 15, (2001), p. 553–564.
- [55] H.B. Jefferies, S. Fumagalli, P.B. Dennis, C. Reinhard, R.B. Pearson, G. Thomas, "Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k.", *EMBO J.*, 16, (1997), p. 3693–704.
- [56] S. Welle, K. Burgess, S. Mehta, "Stimulation of skeletal muscle myofibrillar protein synthesis, p70 S6 kinase phosphorylation, and ribosomal protein S6 phosphorylation by inhibition of myostatin in mature mice.", *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 296, (2009), p. E567–72.
- [57] L. Beretta, A.-C. Gingras, Y. V Svitkin, M.N. Hall, N. Sonenberg, "Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation.", *EMBO J.*, 15, (1996), p. 658–64.
- [58] A.A. Sneddon, M.I. Delday, J. Steven, C.A. Maltin, R. Berdeaux, R. Stewart, et al., "Elevated IGF-II mRNA and phosphorylation of 4E-BP1 and p70 S6k in muscle showing clenbuterol-induced anabolism Elevated IGF-II mRNA and phosphorylation

- of 4E-BP1 and p70 S6k in muscle showing clenbuterol-induced anabolism", *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 281, (2001), p. E676–E682.
- [59] S.C. Bodine, E. Latres, S. Baumhueter, V.K. Lai, L. Nunez, B.A. Clarke, et al., "Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy.", *Science* 80, 294, (2001), p. 1704–8.
- [60] W.O. Kline, F.J. Panaro, H. Yang, S.C. Bodine, "Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol", *J Appl Physiol.*, 102, (2007), p. 740–747.
- [61] W.H. Biggs, J. Meisenhelder, T. Hunter, W.K. Cavenee, K.C. Arden, "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, (1999), p. 7421–6.
- [62] G. Rena, "Phosphorylation of the Transcription Factor Forkhead Family Member FKHR by Protein Kinase B", *J. Biol. Chem.*, 274, (1999), p. 17179–17183.
- [63] L. de Palma, M. Marinelli, M. Pavan, A. Orazi, "Ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx in human skeletal muscle atrophy.", *Jt. Bone Spine.*, 75, (2008), p. 53–57.
- [64] M. Sano, T. Yoshimasa, T. Yagura, I. Yamamoto, "Non-homogeneous distribution of β 1- and β 2-adrenoreceptors in various human tissues", *Life Sci.*, 52, (1993), p. 1063–1070.
- [65] D.L. Brasaemle, G. Dolios, L. Shapiro, R. Wang, "Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes.", *J. Biol. Chem.*, 279, (2004), p. 46835–42.
- [66] P. Bickel, J. Tansey, M. Welte, "PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1791, (2009), p. 419–440.
- [67] S. Collins, " β -Adrenoceptor Signaling Networks in Adipocytes for Recruiting Stored Fat and Energy Expenditure.", *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2, (2011), p. 102.
- [68] M. Perrut, "Advances in supercritical fluid chromatographic processes", *J. Chromatogr. A.*, 658, (1994), p. 293–313.
- [69] G. Guiochon, A. Tarafder, "Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography.", *J. Chromatogr. A.*, 1218, (2011), p. 1037–114.
- [70] J. Chrastil, "Solubility of Solids and Liquids in Supercritical Gases", *J. Phys. Chem.*, 86, (1982), p. 3016–3021.
- [71] M.L. Lee, P.A. Peadar, "Theoretical Treatment of Resolving Power in open Tubular Column Supercritical Fluid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 259, (1983), p. 1–16.
- [72] E. Katz, K. Ogan, R. Scott, "Peak dispersion and mobile phase velocity in liquid chromatography: the pertinent relationship for porous silica", *J. Chromatogr.*, 270, (1983), p. 51–75.

- [73] P. Sandra, *Supercritical Fluid Chromatography : Past, Present and Future*, E-Seminar, am 16.11.2011
- [74] K. De Klerck, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, "Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals.", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 69, (2012), p. 77–92.
- [75] P.S. Wells, S. Zhou, J.F. Parcher, "Unified chromatography with CO₂-based binary mobile phases.", *Anal. Chem.*, 75, (2003), p. 18A–24A.
- [76] M. Saito, "History of supercritical fluid chromatography: instrumental development.", *J. Biosci. Bioeng.*, 115, (2013), p. 590–9.
- [77] Waters Corporation, "Acquity UPC² Systemhandbuch Version A" (2012).
- [78] P.T. Anastas, "Handbook of Green Chemistry, Green Solvents, Supercritical Solvents", 64ff, John Wiley & Sons, 2014.
- [79] T.A. Berger, "The Past , Present , and Future of Analytical Supercritical Fluid Chromatography", *Chromatogr. Today.*, (2014), p. 26–29.
- [80] A.J. Alexander, T.F. Hooker, F.P. Tomasella, "Evaluation of mobile phase gradient supercritical fluid chromatography for impurity profiling of pharmaceutical compounds.", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 70, (2012), p. 77–86.
- [81] P.P. Desai, N.R. Patel, O.D. Sherikar, P.J. Mehta, "Development and Validation of Packed Column Supercritical Fluid Chromatographic Technique for Quantification of Chlorzoxazone , Paracetamol and Aceclofenac in their Individual and Combined Dosage Forms", *J. Chromatogr. Sci.*, 50, (2012), p. 769–774.
- [82] Agilent Technologies Inc., "Agilent 1260 Infinity Analytical SFC System User Manual" (2012).
- [83] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, "Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds.", *J. Chromatogr. A.*, 1266, (2012), p. 158–67.
- [84] A. Grand-Guillaume Perrenoud, C. Hamman, M. Goel, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, S. Fekete, "Maximizing kinetic performance in supercritical fluid chromatography using state-of-the-art instruments.", *J. Chromatogr. A.*, 1314, (2013), p. 288–97.
- [85] E.J.J. Grabowski, "Enantiopure drug synthesis: From methyl dopa to imipenem to efavirenz", *Chirality.*, 17, (2005), p. 249–259.
- [86] J.C. Ruble, H.A. Latham, G.C. Fu, "Effective Kinetic Resolution of Secondary Alcohols with a Planar - Chiral Analogue of 4-(Dimethylamino) pyridine. Use of the Fe(C₅Ph₅) Group in Asymmetric Catalysis", *J. Am. Chem. Soc.*, 119, (1997), p. 1492–1493.

- [87] R. Noyori, T. Saito, H. Kumobayashis, "Stereoselective Hydrogenation via Dynamic Kinetic Resolution", *J. Am. Chem. Soc.*, 111, (1989), p. 9134–9135.
- [88] K.K. Chandrul, B. Srivastava, "Enantiomeric separation in pharmaceutical analysis: A chromatographic approach", *J. Chem. Pharm. Res.*, (2010), p. 923–934.
- [89] K.J. Miller, "High-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers of 1-Phenyl-2-aminopropanes (amphetamines) with four chiral reagents", *J. Chromatogr.*, 307, (1984), p. 335–342.
- [90] W.H. Pirkle, R. Hauske, "Broad Spectrum Methods for the Resolution of Optical Isomers. A Discussion of the Reasons Underlying the Chromatographic Separability of Some Diastereomeric Carbamates", *J. Org. Chem.*, 42, (1977), p. 1839–1844.
- [91] J. Yang, D.S. Hage, "Chiral separations in capillary electrophoresis using human serum albumin as a buffer additive.", *Anal. Chem.*, 66, (1994), p. 2719–25.
- [92] P. Brocos, N. Díaz-Vergara, X. Banquy, S. Pérez-Casas, M. Costas, A. Piñeiro, "Similarities and differences between cyclodextrin-sodium dodecyl sulfate host-guest complexes of different stoichiometries: molecular dynamics simulations at several temperatures.", *J. Phys. Chem. B.*, 114, (2010), p. 12455–67.
- [93] Advanced Separation Technologies INC., "Chirobiotic Handbook", (2005), 5th edition.
- [94] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, "Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects", *J. Chromatogr. B.*, 877, (2009), p. 2198–2207.
- [95] B. Kierzkowska, J. Stańczyk, J.D. Kasprzak, "Myocardial infarction in a 17-year-old body builder using clenbuterol.", *Circ. J.*, 69, (2005), p. 1144–6.
- [96] S. Guddat, G. Fußhöller, H. Geyer, A. Thomas, H. Braun, N. Haenelt, et al., "Clenbuterol - regional food contamination a possible source for inadvertent doping in sports.", *Drug Test. Anal.*, 4, (2012), p. 534–8.
- [97] H. Hooijerink, R. Schilt, W. Haasnoot, D. Courtheijn, "Determination of clenbuterol in urine of calves by high-performance liquid chromatography with in series ultraviolet and electrochemical detection", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9, (1991), p. 485–492.
- [98] J.A. García Regueiro, B. Pérez, G. Casademont, "Determination of clenbuterol and salbutamol in urine by capillarygaschromatography with capillarycolumns of 100 μm ", *J. Chromatogr. A.*, 655, (1993), p. 73–76.
- [99] R. Nicoli, M. Petrou, F. Badoud, J. Dvorak, M. Saugy, N. Baume, "Quantification of clenbuterol at trace level in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A.*, 1292, (2013), p. 142–150.
- [100] Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Safety Data Sheet according to Regulation (EC) No 1907/2006 "Spiropent®, liquid (Bulk), $\leq 1\%$ ", (2013).

7.5 Publikationen

Posterpräsentationen:

Franz Liebetrau, Alexander H. Schmidt, Mijo Stanic, Saskia S. Sterk, Marco H. Blokland, Thijs Meijer, Maria K. Parr

“DISTINCTION OF MEAT CONTAMINATION FROM DRUG ABUSE VIA ANALYSIS OF CLENBUTEROL ENANTIOMERS”

Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft – Landesgruppe Berlin – Brandenburg:

Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor; Berlin 4.7.2014

Maria K. Parr, Alexander H. Schmidt, Franz Liebetrau, Marco H. Blokland, Mijo Stanic, Peter Witte, Saskia S. Sterk

„SEPARATION OF CLENBUTEROL ENANTIOMERS-A COMPARISON BETWEEN HPLC- AND SFC-MS/MS”

39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; Amsterdam 16.-20.6.2013

Saskia S. Sterk, Marco H. Blokland, Thijs Meijer, Franz Liebetrau, Alexander H. Schmidt, Maria K. Parr

„ENANTIOMERIC SEPARATION OF CLENBUTEROL AS ANALYTICAL STRATEGY TO DISTINGUISH ABUSE FROM MEAT CONTAMINATION”

6th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis; Prag 5.-8.11.2013

Artikel:

Maria K. Parr, Marco H. Blokland, Franz Liebetrau, Alexander H. Schmidt, Wilhelm Schänzer, Saskia S. Sterk

„ENANTIOMERIC SEPARATION OF CLENBUTEROL AS ANALYTICAL STRATEGY TO DISTINGUISH ABUSE FROM MEAT CONTAMINATION“

Recent advances in doping analysis (21), 2013, Sportverlag Strauß, Köln

Franz Liebetrau, Maria K. Parr

“DETERMINATION OF ENANTIOMERIC BIOACTIVES USING NEW ANALYTICAL SFC INSTRUMENTS”

Chimica Oggi - Chemistry Today, vol. 33(2), pp. 6–11, 2015

7.6 Genehmigung, Probandeneinweisung und Sammelprotokolle

Research Ethics Committee

Institute of Sport
01-982 Warsaw, 2/16 Trylogii St.

Opinion on conformity of planned research to the ethics rules

The Research Ethics Committee acquainted with the project submitted for assessment entitled:

Clenbuterol in meat. Development of a decision model for the discrimination between contaminated meat and pharmaceutical preparations. Part 2

Conducted in:

Institute of Sport in Warsaw – **Department of Anti-Doping Research**
Freie Universität Berlin - **Institute of Pharmacy**

Under supervision of:

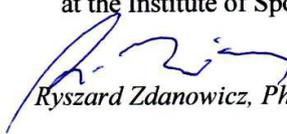
Dorota Kwiatkowska, Dr. Eng.

States that:

The submitted project is in accordance with ethics rules concerning research
Approval KEBN-14-1-DK

Warsaw, May 14, 2014

Chairman
of Local Research Ethics Committee
at the Institute of Sport


Ryszard Zdanowicz, Ph.D.

Volunteers instruction for Clenbuterol administration trial**Schedule**

Day	Date	Event	Sample
Day 0	07.01.2015	<ul style="list-style-type: none"> • Registration • Instruction • Distribution of sample tubes, labels, cups • Preadministration urine sampling 	<ul style="list-style-type: none"> • 2-4 preadministration samples
Day 1	08.01.2015	<ul style="list-style-type: none"> • Preadministration urine sampling • Administration of Clenbuterol • Postadministration sampling 	<ul style="list-style-type: none"> • Morning urine • 1 additional preadministration sample • 2-4 postadministration samples
Day 2	09.01.2015	<ul style="list-style-type: none"> • Postadministration sampling 	<ul style="list-style-type: none"> • Morning urine • 3-5 additional samples
Day 3	10.01.2015	<ul style="list-style-type: none"> • Postadministration sampling 	<ul style="list-style-type: none"> • Morning urine • 3-5 additional samples
Day 4	11.01.2015	<ul style="list-style-type: none"> • Postadministration sampling 	<ul style="list-style-type: none"> • Morning urine • 1 additional sample
Day 5	12.01.2015	<ul style="list-style-type: none"> • Postadministration sampling 	<ul style="list-style-type: none"> • Morning urine • 1 additional sample
Day 6	13.01.2015	<ul style="list-style-type: none"> • Postadministration sampling 	<ul style="list-style-type: none"> • Morning urine • 1 additional sample
Day 7	14.01.2015	<ul style="list-style-type: none"> • Postadministration sampling 	<ul style="list-style-type: none"> • Morning urine • 1 additional sample
Day 8	15.01.2015	<ul style="list-style-type: none"> • Postadministration sampling 	<ul style="list-style-type: none"> • Morning urine • 1 additional sample

Instruction for sampling

The urine of each single urination is divided into two samples.

Therefore collect the urine in the volumetric cup and note the urine volume together with the date, the time of urination and the time of your previous urination on the sample labels (two identical labels for two sample tubes) as well as on the sample list. Afterwards fill 40 ml of urine from the volumetric cup in each of two sample tubes. Carefully close the sample tubes and label the two tubes each with one sample label. Please keep samples frozen immediately.

The rest of the urine in the volumetric cup can be discarded afterwards.

Urine Sampling Clenbuterol

Code: 1
 Height: 200cm
 Sex: M
 Ingestion of: [REDACTED]
 Time of ingestion: 15³⁰ - 16³⁰

Age: 30
 Weight: 102kg
 Date of ingestion: 10.01.15r.

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0	1	22:50	20:00	450
	2	06:15	22:30	400
Day 1	1	6:10	0:15	520
	2	15:20	12	260
	3	17:50	15:20	180
	4	22:00	20:00	240
	5	00:30	23:15	550
Day 2	1	5:10	01:20	420
	2	19:00	17:20	300
	3	22:15	19:00	400
Day 3	1	7:00	23:00	500
	2	17:45	14:00	320
	3	20:00	17:45	180
	4	22:00	21:20	200

Day 4	1	7:00	22	500
	2	23:30	22	200
Day 5	1	7:20	23:30	480
	2	22	20	300
Day 6	1	22	20	320
Day 7	1	18:20	16	500
Day 8	1	8:30	0:00	450

Urine Sampling Clenbuterol

Code: 2
 Height: 176
 Sex: m
 Ingestion of: XXXXXXXXXX
 Time of ingestion: 15:30

Age: 28
 Weight: 110 kg
 Date of ingestion: 10.01.15

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0	1	19:30	15:30	320 ml
	2	22:24	19:30	290 -l
Day 1	1	7:15	22:12 (10:30)	220 -l
	2	19:00	7:15	200 -l
	3	20:18	19:00	310 -l
	4	21:00	20:18	270 ml
	5	22:45	21:00	300 -l
Day 2	1	4:35	3:30	600 -l
	2	14:35	9:25 13:00	260 -l
	3	17:30	14:35	280 -l
	4	19:00	17:00	380 -l
	5	19:25	18:00	260 -l
	6	22:50	19:25	250 -l
Day 3	1	5:00	22:50 (2h)	440 -l
	2	17:40	15:30	200 -l
	3	19:00	17:40	180 -l
	4	20:55	19:00	250 -l
	5	22:40	20:55	220 -l

Day 4	1	5:00	22:40 (1h)	300 -l
	2	17:50	15:30	180 -l
	3	-	-	-
	4	-	-	-
Day 5	1	5:00	22:00 (1h)	360 -l
	2	19:00	15:30	220 -l
	3	-	-	-
	4	-	-	-
Day 6	1	5:00	22:00 (5h)	180 -l
	2	18:00	15:00	210 -l
	3	-	-	-
	4	-	-	-
Day 7	1	5:00	22:00 (1h)	380 -l
	2	19:00	14:00	260 -l
Day 8	1	9:30	22:00 (2h)	640 -l
	2	15:41	13:00	220 -l

Urine Sampling Clenbuterol

Code: 3

Height: 177 cm

Sex: M

Ingestion of:

Time of ingestion:

15⁴⁵ - 15⁴⁵

Age: 24

Weight: 60 kg

Date of ingestion: 10/01/15

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0	1	13 ⁰⁵	06 ⁰⁰	500 ml
	2	15⁴⁵	06⁰⁰	500 ml
Day 1	1	9 ³⁰	23 ⁴⁰ 9/01/15	200 ml
	2	9³⁰	23⁴⁰ 9/01/15	200 ml
	2	12 ⁴⁰	9 ³⁰	150 ml
	3	19 ⁰⁵	12 ⁴⁰	400 ml
	4	21 ⁴⁰	19 ⁰⁵	280 ml
Day 2	1	8 ³⁰	23 ³⁰ 10/01/15	420 ml
	2	12 ²⁰	8 ³⁰	200 ml
	3	19 ⁴⁰	12 ²⁰	360 ml
	4	21 ²²	19 ⁴⁰	260 ml
	5	22 ⁰²	21 ²²	440 ml
Day 3	1	5 ³²	22 ⁰⁵ 11/01/15	400 ml
	2	11 ⁴⁰	5 ³²	420 ml
	3	17 ³⁰	11 ⁴⁰	240 ml
	4	19 ³⁰	17 ³⁰	380 ml

Day 4	1	7 ³⁰	22 ⁰⁰	360 ml
	2	13 ¹⁵	7 ³⁰	420 ml
Day 5	1	5 ⁴⁵	21 ³⁰ 11/01	600 ml
	2	18 ⁴⁰	13 ²⁰	320 ml
Day 6	1	8 ⁰⁰	21 ⁵⁰ 11/01	460 ml
	2	17 ³⁰	8 ⁰⁰	320 ml
Day 7	1	5 ³²	21 ³⁰ 15/01	320 ml
	2	12 ³⁵	5 ³²	440 ml
Day 8	1	9 ⁴⁵	23 ⁴⁵ 16/01	200 ml
	2	18 ¹⁵	9 ⁴⁵	480 ml

Urine Sampling Clenbuterol

Code: 4
 Height: 179 cm
 Sex: M
 Ingestion of: XXXXXXXXXX
 Time of ingestion: 15⁰⁰ - 16⁰⁰

Age: 26
 Weight: 85 kg
 Date of ingestion: 10.01.15

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0	1	18 ⁰⁰	14 ⁰⁰	200 ml
	2	21 ⁰⁰	19 ⁰⁰	200 ml
	3	23 ⁰⁰	21 ⁰⁰	550 ml
Day 1	1	10 ⁰⁰	7 ⁰⁰	580 ml
	2	15 ¹⁰	10 ⁰⁰	300 ml
	3	18 ⁵⁰	15 ¹⁰	400 ml
	4	23 ²⁰	19 ⁵⁰	220 ml
	5	1 ⁰⁰	23 ²⁰	100 ml
Day 2	1	9 ⁰⁰	11 ⁰⁰	540 ml
	2	13 ¹⁰	9 ³⁰	330 ml
	3	16 ⁴⁵	13 ¹⁰	500 ml
	4	17 ³⁰	16 ⁴⁵	450 ml
	5	21 ⁵⁵	17 ³⁰	
Day 3	1	8 ⁰⁰	5 ⁰⁰	200 ml
	2	12 ⁰⁰	11 ⁰⁰	600 ml
	3	22 ⁴⁰	18 ⁰⁰	280 ml
	4	23 ⁴⁰	20 ⁴⁰	280 ml

Day 4	1	9 ⁰⁰	2 ⁰⁰	180 ml
	2	17 ⁰⁰	14 ⁰⁰	270 ml
Day 5	1	8 ⁴⁰	2 ³⁰	240 ml
	2	18 ³⁰	16 ⁴⁰	320 ml
Day 6	1	9 ⁰⁰	2 ⁰⁰	320 ml
	2	23 ⁰⁰	20 ⁰⁰	
Day 7	1	10 ⁵⁰	8 ⁰⁰	160 ml
	2	23 ³⁰	21 ⁰⁰	210 ml
Day 8	1	9 ³⁰	1 ³⁰	270 ml
	2	18 ⁰⁰	12 ⁰⁰	270 ml

Urine Sampling Clenbuterol

Code: 5
 Height: 188cm
 Sex: M
 Ingestion of: [REDACTED]
 Time of ingestion: 15³⁰ - 16³⁰

Age: 25
 Weight: 78kg
 Date of ingestion: 10.01.15

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0	1	18 ⁰⁰	17 ⁰⁰	200 ml
	2	19 ³⁰	18 ⁰⁰	150 ml
Day 1 ⁰⁰	1	12 ⁰⁰	3 ³⁰	200 ml
	2	15 ³⁰	12 ⁰⁰	400 ml
	3	20 ⁰⁰	15 ³⁰	400 ml
	4	23 ³⁰	20 ⁰⁰	180 ml
Day 2 ⁰⁰	1	12 ⁰⁰	23 ³⁰	280 ml
	2	17 ³⁰	12 ⁰⁰	400 ml
	3	20 ⁰⁰	17 ³⁰	500 ml
	4	21 ⁰⁰	20 ⁰⁰	280 ml
Day 3 ⁰⁰	1	7 ⁰⁰	1 ⁰⁰	300 ml
	2	13 ⁰⁰	7 ⁰⁰	100 ml
	3	15 ⁰⁰	13 ⁰⁰	250 ml
	4	18 ³⁰	15 ⁰⁰	180 ml

Day 4 ⁰⁰	1	7 ³⁰	1 ⁰⁰	100 ml
	2	21 ³⁰	20 ³⁰	200 ml
Day 5 ⁰⁰	1	8 ⁰⁰	2 ⁰⁰	200 ml
	2	18 ⁰⁰	15 ⁰⁰	370 ml
Day 6 ⁰⁰	1	7 ⁰⁰	0 ³⁰	180 ml
	2	18 ⁰⁰	13 ⁰⁰	240 ml
Day 7 ⁰⁰	1	8 ⁰⁰	0 ⁰⁰	500 ml
	2	18 ⁰⁰	15 ³⁰	200 ml
Day 8 ⁰⁰	1	10 ⁰⁰	3 ⁰⁰	750 ml
	2	19 ⁰⁰	15 ³⁰	400 ml

Urine Sampling Clenbuterol

Code: 6
 Height: 193cm
 Sex: m
 Ingestion of: XXXXXXXXXX
 Time of ingestion: 15

Age: 26
 Weight: 80kg
 Date of ingestion: 10.01.15

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0	1	17:20	15:50	420 ml
	2	19:45	17:20	200 ml
Day 1	1	10:00	2:30	550 ml
	2	15:45	10:00	200 ml
	3	18:10	15:15	200 ml
	4	20:30	11:30	200 ml
Day 2	1	11:30	2:00	450 ml
	2	16:30	14:30	120 ml
	3	18:30	16:30	200 ml
	4	20:45	18:30	100 ml
Day 3	1	9:30	2:00	500 ml
	2	15:30	9:30	350 ml
	3	18:00	15:30	250 ml
	4	21:30	11:00	300 ml

Day 4	1	9:00	2:05	400 ml
	2	17:50	15:15	350 ml
Day 5	1	9:00	1:12	350 ml
	2	18:10	16:00	300 ml
Day 6	1	10:00	1:15	700 ml
	2	20:25	18:00	200 ml
Day 7	1	9:00	1:30	450 ml
	2	11:30	16:10	200 ml
Day 8	1	11:30	3:30	400 ml
	2	20:30	19:00	200 ml

Urine Sampling Clenbuterol

Code: 7
 Height: 180 cm
 Sex: MALE
 Ingestion of: [REDACTED]
 Time of ingestion: 13⁰⁰ - 13³⁰

Age: 29
 Weight: 88 kg
 Date of ingestion: 10.01.2015

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0	1	17 ³⁰	-	800 ml
	2	20 ⁴⁴	17 ³⁰	640 ml
Day 1	1	7 ⁴⁴	20 ⁴⁴	600 ml
	2	12 ⁰⁰	7 ⁴⁴	360 ml
	3	15 ⁴⁰	12 ⁰⁰	740 ml
	4	18 ²⁰	15 ⁴⁰	420 ml
Day 2	1	7 ⁴²	18 ²⁰	800 ml
	2	15 ⁵⁵	7 ⁴²	520 ml
	3	19 ⁴⁰	15 ⁴⁵	400 ml
	4	22 ⁰⁵	19 ⁴⁰	200 ml
Day 3	1	6 ⁰⁰	22 ⁰⁵	600 ml
	2	17 ¹⁵	6 ⁰⁰	420 ml
	3	19 ⁴⁰	17 ¹⁵	360 ml
	4	22 ⁰⁵	19 ⁴⁰	240 ml

Day 4	1	6 ⁰⁰	22 ⁰⁵	900 ml
	2	20 ²¹	6 ⁰⁰	280 ml
Day 5	1	6 ⁴⁰	20 ²¹	520 ml
	2	16 ⁵⁵	6 ²⁰	820 ml
Day 6	1	6 ⁴⁰	16 ⁵⁵	400 ml
	2	20 ¹⁰	6 ⁴⁰	300 ml
Day 7	1	6 ⁰⁷	20 ⁴⁰	780 ml
	2	15 ⁴⁰	6 ⁰⁷	460 ml
Day 8	1	8 ²⁰	15 ¹⁰	660 ml
	2	15 ⁰⁰	8 ²⁰	480 ml

Urine Sampling Clenbuterol

Code: 8

Height: 175

Sex: M

Ingestion of: [REDACTED]

Time of ingestion: 15

Age: 26
Weight: 84

Date of ingestion: 10.01.15

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0 08.01.	1	13:10	08:30	600
	2	17:10	13:10	550
	3	23:55	17:10	250
Day 1 10.01.	1	10:00	23:55	210
	2	15:30	10:00	230
	3	20:30	15:30	180
	4	23:59	20:30	160
Day 2 11.01.	1	10:45	23:59	580
	2	16:00	10:45	190
	3	19:00	16:00	120
	4	23:59	19:00	320
Day 3 12.01.	1	10:20	23:59	310
	2	15:45	10:20	410
	3	21:30	15:45	310
	4	23:55	21:30	270

Day 4 13.01.	1	10:00	23:55	400
	2	16:00	10:00	320
Day 5 14.01.	1	7:35	23:50	400
	2	14:45	7:35	600
Day 6 15.01.	1	7:20	23:50	420
	2	23:15	19:20	300
Day 7 16.01.	1	3:10	23:15	400
	2	16:10	13:15	200
Day 8 17.01.	1	5:00	23:00	300
	2	23:55	18:45	260

Urine Sampling Clenbuterol

Code: 9
 Height: 170cm
 Sex: m
 Ingestion c [redacted]
 Time of ingestion: 15³⁰ - 16³⁰

Age 25
 Weight 67
 Date of ingestion: 10.01.15

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0	1	18 ³⁰	8 ⁰⁰	300ml
	2	22 ⁰⁰	18 ³⁰	120ml
Day 1	1	10 ⁰⁰	22 ⁰⁰	300ml
	2	19 ³⁰	14 ²⁰	300ml
		23 ⁵⁰	22 ⁰⁰	200ml
Day 2	1	10 ³⁰	23 ⁵⁰	300 ml
	2	14 ⁰²	10 ³⁰	200ml
	3	16 ³⁰	14 ⁰²	250 ml
	4	19 ²⁰	16 ³²	300 ml
Day 3	1	8 ³⁰	23 ³⁰	250ml
	2	17 ³⁰	8 ³⁰	200ml
	3	20 ⁵⁰	17 ³⁰	150ml
	4	23 ⁵⁵	20 ²⁰	200ml

Day 4	1	9 ³⁰	23 ⁵⁰	200ml
	2	21 ⁴⁰	19 ²⁰	300ml
Day 5	1	7 ²⁰	1 ⁰⁰	400ml
	2	18 ⁴⁰	16 ²⁰	300ml
Day 6	1	8 ¹⁰	23 ⁵⁰	250ml
	2	21 ²⁰	17 ²⁰	150ml
Day 7	1	8 ¹⁰	23 ³⁰	200ml
	2	20 ³⁰	16 ⁰²	250ml
Day 8	1	8 ²⁰	2 ²⁰	200ml
	2	18 ³⁰	15 ²⁰	300ml

Urine Sampling Clenbuterol

Code: 10
 Height: 177 cm
 Sex: m
 Ingestion of: XXXXXXXXXX
 Time of ingestion: 15.30 - 16.15

Age: 34
 Weight: 82 kg
 Date of ingestion: 10.01.2015

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume mL
Day 0 9.01	1	16.20	15.00	200
Day 1 10.01	1	7.30	23.15	420
	2	15.15	12.30	230
	3	16.10	15.15	340
	4	17.25	16.10	220
	5	18.50	17.25	250
	6	21.00	18.50	360
Day 2 11.01	1	7.45	23.00	470
	2	12.50	8.30	260
	3	15.20	12.50	240
	4	17.00	15.20	320
	5	18.30	17.00	320
	6	21.00	18.30	280
Day 3 12.01	1	7.30	21.00	360
	2	12.30	7.30	240
	3	15.00	12.30	280
	4	18.00	15.30	360
	5	21.00	18.30	240

Day 4 13.01	1	5.00	21.00	450
	2	9.15	5.00	280
	3	11.00	9.15	220
	4	13.15	11.00	340
Day 5 14.01	1	5.30	23.00	360
	2	15.00	12.15	280
Day 6 15.01	1	6.00	22.30	360 mL
	2	18.00	14.30	340 mL
Day 7 16.01	1	6.00	22.00	380
	2	18.50	15.00	280
Day 8 17.01	1	7.00	21.00	360
	2	18.30	16.00	320

Urine Sampling Clenbuterol

Code: *AA*
 Height: *1,66 m*
 Sex: *M*
 Ingestion of: XXXXXXXXXX
 Time of ingestion: *15³⁰ - 16¹⁵*

Age: *24*
 Weight: *70 kg*
 Date of ingestion: *10.01.15*

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0	<i>1</i>	<i>12:35</i>	<i>9:40</i>	<i>480 ml</i>
	<i>2</i>	<i>13:45</i>	<i>12:35</i>	<i>620 ml</i>
	<i>3</i>	<i>19:50</i>	<i>16:10</i>	<i>220 ml</i>
Day 1	<i>1</i>	<i>9:40</i>	<i>00:20</i>	<i>460 ml</i>
	<i>2</i>	<i>13:15</i>	<i>9:40</i>	<i>320 ml</i>
	<i>3</i>	<i>17:40</i>	<i>14:40</i>	<i>310 ml</i>
	<i>4</i>	<i>18:50</i>	<i>17:40</i>	<i>500 ml</i>
	<i>5</i>	<i>20:00</i>	<i>18:50</i>	<i>480 ml</i>
Day 2	<i>1</i>	<i>9:30</i>	<i>00:10</i>	<i>740 ml</i>
	<i>2</i>	<i>13:15</i>	<i>12:10</i>	<i>360 ml</i>
	<i>3</i>	<i>20:00</i>	<i>17:30</i>	<i>260 ml</i>
	<i>4</i>	<i>22:15</i>	<i>20:00</i>	<i>200 ml</i>
Day 3	<i>1</i>	<i>6:20</i>	<i>22:50</i>	<i>320 ml</i>
	<i>2</i>	<i>10:40</i>	<i>8:30</i>	<i>480 ml</i>
	<i>3</i>	<i>17:50</i>	<i>15:30</i>	<i>480 ml</i>
	<i>4</i>	<i>19:35</i>	<i>17:50</i>	<i>340 ml</i>
	<i>5</i>	<i>22:50</i>	<i>19:35</i>	<i>490 ml</i>
	<i>6</i>	<i>23:25</i>	<i>22:50</i>	<i>400 ml</i>

Day 4	<i>1</i>	<i>6:15</i>	<i>23:25</i>	<i>660 ml</i>
	<i>2</i>	<i>23:15</i>	<i>19:30</i>	<i>320 ml</i>
Day 5	<i>1</i>	<i>6:05</i>	<i>23:15</i>	<i>410 ml</i>
	<i>2</i>	<i>16:15</i>	<i>14:10</i>	<i>280 ml</i>
Day 6	<i>1</i>	<i>6:20</i>	<i>23:00</i>	<i>640 ml</i>
	<i>2</i>	<i>22:50</i>	<i>18:00</i>	<i>420 ml</i>
Day 7	<i>1</i>	<i>6:30</i>	<i>22:50</i>	<i>700 ml</i>
	<i>2</i>	<i>23:30</i>	<i>19:40</i>	<i>760 ml</i>
Day 8	<i>1</i>	<i>10:15</i>	<i>1:10</i>	<i>840 ml</i>
	<i>2</i>	<i>22:30</i>	<i>20:00</i>	<i>340 ml</i>

Urine Sampling Clenbuterol

Code: 12
 Height: 173 cm
 Sex: M
 Ingestion of: 
 Time of ingestion: 15

Age: 30
 Weight: 72

Date of ingestion: 31.01.2015

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0	01 A/B 1	13:40	-	2x 45ml
	02 A/B 2	15:35	13:40	2x 45ml
	03 A/B 3	20:45	15:35	2x 45ml
Day 1	11 A/B 1	8:45	23:45	2x 45ml
	12 A/B 2	12:45	8:45	50ml, 45ml
	13 A/B 3	17:45	12:45	2x 45ml
	14 A/B 4	19:45	17:45	2x 35ml
	15 A/B 5	23:50	19:45	2x 45ml
Day 2	21 A/B 1	7:10	23:50	2x 45ml
	22 A/B 2	8:40	7:10	50ml, 45ml
	23 A/B 3	17:20	5:10	50ml, 45ml
	24 A/B 4	20:50	17:20	2x 45ml
	25 A/B 5	23:05	20:50	2x 45ml
Day 3	31 A/B 1	6:00	2:00	2x 45ml
	32 A/B 2	7:00	6:00	2x 45ml
	33 A/B 3	11:20	7:00	2x 50ml
	34 A/B 4	12:35	11:20	2x 45ml
	35 A/B 5	15:30	12:35	2x 45ml
	36 A/B 6	19:00	15:30	2x 45ml

Day 4 Pseudoephedrine	41 A/B 1	7:00	19:20	2x 45ml
	42 A/B 2	14:30	19:20	2x 45ml
Day 5 Pseudoephedrine	51 A/B 1	6:00	21:30	2x 45ml
	52 A/B 2	21:20	?	2x 37ml
Day 6 Pseudoephedrine	61 A/B 1	7:00	21:00	2x 45ml
	62 A/B 2	22:55	?	2x 45ml
Day 7 Pseudoephedrine	71 A/B 1	6:00	22:55	2x 45ml
	72 A/B 2	21:00	?	2x 45ml
Day 8 Pseudoephedrine	81 A/B 1	8:00	21:00	2x 45ml
	82 A/B 2	18:00	?	2x 45ml

Urine Sampling Clenbuterol

Code:

Age:

Height:

Weight:

Sex:

Ingestion of:

Date of ingestion:

Time of ingestion:

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0 <i>me</i>	1	11.45	6.45	220
	2	16.00	11.45	320
	3	19.30	16.00	250
	4	27.00	19.30	210
Day 1 <i>di</i> ⇒	5	6.20	27.00	230
	6	12.30	6.20	240
	7	16.00	12.30	300
	8	22.00	16.00	320
Day 2 <i>we</i>	9	7.00	22.30	400
	10	12.00	7.00	400
	11	17.30	12.00	320
Day 3 <i>de</i>	12	6.00	23.00	350
	13	16.00	14.00	200
	14	22.30	16.00	225

Day 4 <i>we</i>	15	6.20	23.00	250
	16	14.00	12.00	600
Day 5 <i>we</i>	17	9.00	00.30	300
	18	20.30	10.00	160
Day 6 <i>u</i>	19	7.00	23.00	400
	20	19.00	16.00	240
Day 7 <i>we</i>	19 21	6.30	22.30	350
	20 22	23.00	19.00	220
Day 8 <i>di</i>	21 23	6.20	23.00	400
	24	19.00	15.00	220

Urine Sampling Clenbuterol

Code: T
 Height: 1.85 m.
 Sex: male
 Ingestion of: Clen-5
 Time of ingestion: 12.30

Age: 34
 Weight: 75 kg
 Date of ingestion: 20-1-2015

Day/Date	Sample number	Time of urination	Time of previous urination	Urine volume
Day 0	1	10.25	7.00	200 ml
	2	13.15	10.25	350 ml
	3	22.00	17.00	350 ml
Day 1	4	6.30	23.30	400
	5	10.30	9.00	250
	6	16.00	10.30	250
	7	20.15	16.00	200
Day 2	8	6.30	23.15	450
	9	10.00	6.30	250
	+ 10	17.30	10.00	350
	+ 11	23.00	17.30	350
Day 3	12	7.00	23.00	250
	13	12.00		350
	14	23.30	12.30	200

Day 4	15 15	7.15	23.30	200
	16	17.30	11.30	250
Day 5	16	7.30	00.30	250
	17	16.00	13.15	200
Day 6	18	7.15	23.30	600
	19	11.15	7.15	300
Day 7	20	7.00	23.30	300
	21	13.45	12.00	250
Day 8	22	7.00	23.30	200
	23	15.30	12.00	300

7.7 Tabellarische Übersicht zur Analyse der Rückstellmuster

S3, 1 µg			S3, 5 µg			S3, 10 µg		
Zeit nach Applikation in h	Anteil S-CB	Konzentration CB in pg/ml	Zeit nach Applikation in h	Anteil S-CB	Konzentration CB in pg/ml	Zeit nach Applikation in h	Anteil S-CB	Konzentration CB in pg/ml
2	0,47	68	2	0,46	600	2	0,47	2754
4	0,50	378	4	0,47	228	3	0,49	2871
8	0,48	134	8	0,48	420	4	0,49	1222
15	0,48	214	10	0,47	858	8	0,48	2369
24	0,49	482	15	0,50	3298	11	0,49	3552
32	0,47	64	24	0,50	2371	13	0,49	3376
34	0,49	84	36	0,47	343	15	0,50	1242
39	0,50	202	41	0,50	974	24	0,49	3834
48	0,49	168	48	0,50	967	25	0,50	1881
53	0,50	152	52	0,50	863	38	0,49	2523
57	0,48	37	58	0,50	228	41	0,50	1528
58	0,46	56	59	0,48	250	48	0,49	1495
60	0,50	75	64	0,50	278	50	0,49	1168
72	0,50	118	72	0,51	493	52	0,48	730
96	0,50	50	96	0,49	145	57	0,49	412
144	0,45	150	120	0,50	66	58	0,48	256
			144	0,48	44	64	0,50	1067
						72	0,49	909
						73	0,49	1122
						96	0,50	225
						120	0,50	192
						144	0,47	94
S19, 1 µg			S19, 5 µg			S19, 10 µg		
Zeit nach Applikation in h	Anteil S-CB	Konzentration CB in pg/ml	Zeit nach Applikation in h	Anteil S-CB	Konzentration CB in pg/ml	Zeit nach Applikation in h	Anteil S-CB	Konzentration CB in pg/ml
2	0,50	36	2	0,46	804	0	0,49	50
4	0,45	54	10	0,48	351	2	0,47	1504
8	0,46	118	15	0,48	1159	4	0,47	1302
15	0,47	136	24	0,49	2716	8	0,48	1080
24	0,50	640	29	0,47	1531	11	0,46	928
29	0,49	291	31	0,51	738	13	0,49	2097
36	0,51	217	35	0,48	410	19	0,49	1341
40	0,47	131	39	0,39	145	24	0,50	4149
48	0,50	236	41	0,37	141	28	0,50	2486
56	0,49	80	44	0,47	460	34	0,47	776
72	0,50	130	48	0,51	1355	39	0,48	904
96	0,50	75	53	0,50	508	41	0,48	743
120	0,46	27	56	0,49	246	48	0,50	2277
			58	0,51	404	58	0,51	497
			61	0,50	196	60	0,50	812
			72	0,50	646	72	0,52	1288
			96	0,50	266	96	0,52	239
			120	0,51	165			
			144	0,50	94			

7.8 Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Berlin, den 11.12.2015

Franz Liebetrau

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.