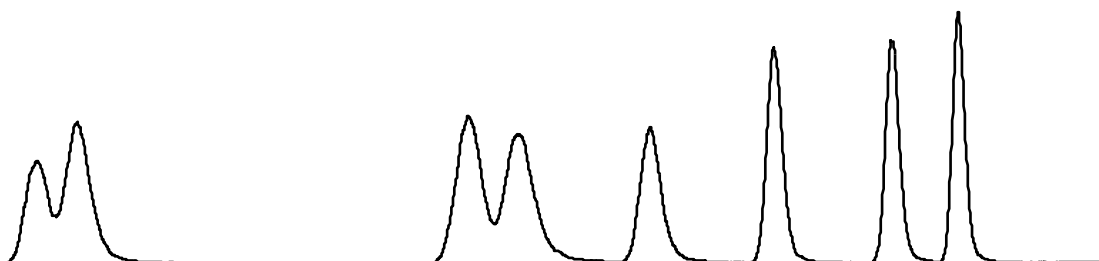


Unbeabsichtigtes Doping durch Lebensmittel

Ansätze zur Unterscheidung von Aufnahmewegen
dopingrelevanter Substanzen mittels HPLC-MS/MS



Aus dem Institut für Biochemie
der Deutschen Sporthochschule Köln
Geschäftsführender Leiter: Univ.-Prof. Dr. Mario Thevis

**Unbeabsichtigtes Doping durch Lebensmittel –
Ansätze zur Unterscheidung von Aufnahmewegen
dopingrelevanter Substanzen mittels HPLC-MS/MS**

An der Deutschen Sporthochschule Köln
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

angenommene Dissertation

vorgelegt von

Luisa Sophie Euler

geb. Seyerlein

aus Nürnberg

Köln 2023

Erster Gutachter: **Univ.-Prof. Dr. Mario Thevis**
Institut für Biochemie
Deutsche Sporthochschule Köln

Zweiter Gutachter: **Univ.-Prof. Dr. Uwe Karst**
Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Universität Münster

Vorsitzender des Promotionsausschusses: **Univ.-Prof. Dr. Mario Thevis**

Datum der Disputation: **03. November 2023**

**Eidesstattliche Versicherung gem. § 7 Abs. 2 Nr. 9 der Promotionsordnung
der Deutschen Sporthochschule Köln, 30.03.2020:**

Hierdurch versichere ich:

Ich habe diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und technischen Hilfen angefertigt; sie hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen. Wörtlich übernommene Textstellen, auch Einzelsätze oder Teile davon, sind als Zitate kenntlich gemacht worden.

Hierdurch erkläre ich, dass ich die „Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis“ der Deutschen Sporthochschule Köln eingehalten habe.

13.11.2023 *K. Fülbr*

Datum, Unterschrift

Hinweise zu dieser Arbeit

Aufgrund ihrer komplexen Strukturen werden die in der Arbeit beschriebenen Verbindungen nicht entsprechend der IUPAC-Nomenklatur, sondern mit den in der Fachliteratur üblichen Trivialnamen bezeichnet.

Nach dem *Leitfaden für die Nutzung gendersensibler Kommunikation* der Deutschen Sporthochschule Köln wird im deutschen Manteltext dieser Dissertation das Gender-Sternchen verwendet, um alle Geschlechter gleichermaßen zu berücksichtigen. Hierzu wird der Genderstern (*) zwischen dem männlichen Wortstamm und seiner weiblichen Endung eingefügt. Dies kann dazu führen, dass die grammatikalisch korrekte männliche Endung weggelassen wird.

An Stellen, in denen nur die männliche Form genannt wird, sind explizit nur Männer gemeint.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben. Zunächst danke ich Prof. Dr. Mario Thevis herzlich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für die Möglichkeit, am Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln zu promovieren: Ich durfte bei ihm sehr spannende Forschungsthemen adressieren, neue Arbeitsmethoden kennen und meistern lernen sowie viele eigene Ideen einbringen. Dabei konnte ich im Forschungsalltag immer auf seine Unterstützung zählen. Während meiner gesamten Promotion habe ich Herrn Prof. Thevis großes Vertrauen sowie das angenehme Miteinander an seinem Institut sehr geschätzt.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Uwe Karst für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation und für die zahlreichen Möglichkeiten, die er mir im Laufe meines Studiums eröffnet hat. Dabei denke ich an meine Spezialisierung auf die instrumentelle Analytik, die ich während meines Bachelor- und Masterstudiums in seinem Arbeitskreis an der Universität Münster ausbilden konnte. Zudem hatte Herr Prof. Karst maßgeblichen Anteil daran, dass ich ein Forschungssemester an der Monash University in Melbourne sowie letztendlich hier in Köln meine Promotion absolvieren durfte.

Ich bedanke mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kolleg*innen aus dem Institut für Biochemie und des Manfred Donike Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Thomas für seine zahlreichen praktischen Tipps und für die konstruktiven Fachdiskussionen.

Vielen Dank an all meine Kooperationspartner*innen, ohne deren Mitwirken meine Promotions-Projekte nicht möglich gewesen wären. Im Besonderen möchte ich mich bei Dr. Natalie Gillard, Dr. Gilles Pierret und Dr. Philippe Delahaut vom CER aus Belgien bedanken, die die Applikationsstudie an den Hühnern aus Studie 1 durchgeführt haben. Die Auswertung dieser Ergebnisse war ein Meilenstein auf meinem Weg zur Erlangung des Doktorgrads. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Dr. Thomas Mürdter, Georg Heinkele und Prof. Dr. Matthias Schwab vom IKP Stuttgart bedanken, durch deren Synthesen und Bereitstellung der Referenzstandards die Identifizierung der verschiedenen Markermetaboliten gelungen ist. Schließlich möchte ich mich bei Prof. Dr.

Christiane Ayotte vom INRS sowie bei Dr. Geoffrey Miller und Dr. Daniel Eichner vom SMRTL herzlich für die Bereitstellung von Dopingkontroll- bzw. Studienproben bedanken.

Ein großer Dank gilt außerdem meinen Co-Doktorand*innen, die über die vergangenen Jahre gute Freund*innen geworden sind und gerade während der Corona-Lockdowns ein ungemein wichtiger sozialer Anker für mich waren. Vielen Dank für die allgegenwärtige Hilfsbereitschaft, die aufbauenden Worte und die vielen schönen Momente.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Probanden, die motiviert an meinen Studien teilgenommen haben und bereit waren, Mikrodosen von Dopingsubstanzen einzunehmen, im Anschluss Urinproben zu sammeln und zur Verfügung zu stellen.

Weiter möchte ich mich bei meiner Familie – besonders bei meinen Eltern – für Ihre bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken. Abschließend gilt mein größter Dank meinem Mann Sebastian: Danke für deinen bedingungslosen Rückhalt, deine Geduld und dein Verständnis.

Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser kumulativen Dissertation wurden veröffentlicht in:

- **Seyerlein L**, Gillard N, Delahaut P, Pierret G, Thomas A, Thevis M. Depletion of clomiphene residues in eggs and muscle after oral administration to laying hens. *Food Additives and Contaminants: Part A*. **2021**; 38:1875-1882. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1949497>
- **Euler L**, Gillard N, Delahaut P, Pierret G, Mürdter T, Schwab M, Döhmen G, Thomas A, Thevis M. Assessing human urinary clomiphene metabolites after consumption of eggs from clomiphene-treated laying hens using chromatographic-mass spectrometric approaches. *Analytica Chimica Acta*. **2022**; 1202:339661. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339661>
- **Euler L**, Mürdter T, Heinkele G, Schwab M, Müller G, Eichner D, Thomas A, Thevis M. Identification of (Z)-3'-hydroxy clomiphene as a new potential doping-relevant metabolite of clomiphene. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2023**; 37:e9599. <https://doi.org/10.1002/rcm.9599>
- **Euler L**, Wagener F, Thomas A, Thevis M. Determination and enantioselective separation of zilpaterol in human urine after mimicking consumption of contaminated meat by HPLC-MS/MS techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2022**; 36:e9357. <https://doi.org/10.1002/rcm.9357>

Teilergebnisse wurden vorab in folgenden Tagungsbeiträgen veröffentlicht:

Vorträge

- **Seyerlein L**, Gillard N, Delahaut P, Mürdter T, Schwab M, Thomas A, Thevis M. Are contaminated eggs a potential source of minute amounts of clomiphene in doping control samples? *Manfred Donike Workshop, 39th Cologne Workshop on Dope Analysis 2021*, 22. März – 02. April 2021 [virtuell]
- **Euler L**, Gillard N, Delahaut P, Pierret G, Mürdter T, Schwab M, Döhmen G, Thomas A, Thevis M. Assessing human urinary clomiphene metabolites after consumption of eggs from clomiphene-treated laying hens. *32. Doktorandenseminar des Arbeitskreises Separation Science der GDCh-Fachgruppe Analytische Chemie*, 10. – 11. Januar 2022 [virtuell]
- **Euler L**, Wagener F, Ayotte C, Thomas A, Thevis M. Elimination profile of micro-dosed Zilpaterol mimicking consumption of contaminated cattle meat. *Manfred Donike Workshop, 40th Cologne Workshop on Dope Analysis 2022*, 28. März – 08. April 2022 [virtuell]
- **Euler L**, Wagener F, Thomas A, Thevis M. Determination and enantioselective separation of zilpaterol in human urine after mimicking consumption of contaminated meat by HPLC-MS/MS techniques. *DGMS Young Scientists Fall Meeting 2022*, Hünfeld, 28. – 30. September 2022

Poster

- **Seyerlein L**, Gillard N, Delahaut P, Mürdter T, Schwab M, Thomas A, Thevis M. Are contaminated eggs a potential source of minute amounts of clomiphene in doping control samples? *1st Partnership for Clean Competition Virtual Poster Session 2021*, 19. Mai 2021 [virtuell]
- **Euler L**, Wagener F, Ayotte C, Thomas A, Thevis M. Elimination profile of micro-dosed zilpaterol mimicking consumption of contaminated cattle meat. *24th International Mass Spectrometry Conference (IMSC)*, Maastricht, 27. August – 02. September 2022
- **Euler L**, Mürdter T, Schwab M, Miller G, Eichner D, Thomas A, Thevis M. Identification of (Z)-3'-hydroxy clomiphene as a new potential doping-relevant metabolite of clomiphene. *Manfred Donike Workshop, 41st Cologne Workshop on Dope Analysis 2023*, Köln, 27. Februar – 03. März 2023
- **Euler L**, Thomas A, Gillard N, Delahaut P, Pierret G, Mürdter T, Schwab M, Döhmen G, Wagener F, Thevis M. Foodborne Doping Substances – Chromatographic-mass spectrometric approaches to distinguish intentional from inadvertent doping. *HPLC 2023, 51st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Düsseldorf, 18. – 22. Juni 2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung.....	2
3	Hintergrund der Arbeit	4
3.1	Anfänge und Fortentwicklung der Dopinganalytik.....	4
3.2	Exposom von Athlet*innen	6
3.3	Vorkommen von Dopingsubstanzen in Lebensmitteln	7
3.4	Strategien zur Unterscheidung zwischen absichtlichem und unabsichtlichem Doping	9
3.5	Metabolismus und Pharmakokinetik in der Dopinganalytik	10
3.6	Clomifen	12
3.7	Zilpaterol	13
4	Übersicht über das Promotionsprojekt	16
4.1	Erste Publikation	16
4.2	Zweite Publikation.....	18
4.3	Dritte Publikation	20
4.4	Vierte Publikation.....	22
5	Depletion of clomiphene residues in eggs and muscle after oral administration to laying hens	24
6	Assessing human urinary clomiphene metabolites after consumption of eggs from clomiphene-treated laying hens using chromatographic-mass spectrometric approaches	25
7	Identification and synthesis of (Z)-3'-hydroxy clomiphene as a new potential doping-relevant metabolite of clomiphene	26
8	Determination and enantioselective separation of zilpaterol in human urine after mimicking consumption of contaminated meat using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry techniques	27
9	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	27
10	Literaturverzeichnis für Kapitel 1–4 und 9	34
11	Kurzzusammenfassung und Abstract	42
11.1	Kurzzusammenfassung.....	42
11.2	Abstract	44
12	Verzeichnisse	46
12.1	Abkürzungsverzeichnis	46
12.2	Abbildungsverzeichnis	48

1 Einleitung

Doping ist laut Welt Anti-Doping Agentur (WADA) die Verletzung der Anti-Doping-Regeln. Dazu zählt u. a. das Vorhandensein einer verbotenen Substanz oder ihrer Metaboliten oder Marker in der Dopingprobe eines*iner Athlet*in. Laut Artikel 2.1.1 des Welt Anti-Doping Codes (WADC) müssen weder Vorsatz, noch Verschulden, Fahrlässigkeit oder wissentliche Anwendung seitens des*der Athlet*in nachgewiesen werden, um einen Verstoß gegen die Anti-Doping-Bestimmungen festzustellen [1]. Dies wird auch als Prinzip der *strict liability* bezeichnet. Angesichts der sich stetig verbessernden analytischen Nachweismethoden der Anti-Doping-Labore müssen Athlet*innen daher sehr sorgsam auf ihre Umwelt und Nahrung achten, um nicht unbeabsichtigt Dopingsubstanzen aufzunehmen [2]. Das Prinzip der *strict liability* wird häufig kritisiert, weil dadurch auch Athlet*innen sanktioniert werden können, die eine Dopingsubstanz unbeabsichtigt und in so geringen Konzentrationen aufgenommen haben, dass von keiner pharmakologischen Wirkung ausgegangen werden kann [2, 3]. Das Strafmaß kann in solchen Szenarien durch die Beweislastumkehr auf eine Verwarnung oder eine Sperre von maximal zwei Jahren reduziert werden; jedoch nur, wenn der*die Athlet*in beweisen kann, dass er*sie nicht vorsätzlich, fahrlässig oder wissentlich gehandelt hat [1].

Als Teil der präventiven Dopingforschung gewinnt die Identifizierung von „Dopingfällen“, die zu unbeabsichtigtem Doping führen können, daher an Bedeutung [4]. Im Rahmen dieser Dissertation sollen zwei Dopingfällen in Zusammenhang mit Lebensmitteln untersucht werden, um Athlet*innen vor unbeabsichtigtem Doping zu schützen.

2 Zielsetzung

Grundlage der vorliegenden Dissertation sind vier Publikationen, die sich mit der Aufnahme von Dopingsubstanzen über Lebensmittel und deren Ausscheidung über den Urin beschäftigen. Die analytischen Verfahren hierzu basieren jeweils auf einer flüssigkeitschromatographischen (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) Trennung mit anschließender massenspektrometrischer (*mass spectrometry*, MS) Detektion. Untersucht wurden dabei der selektive Östrogenrezeptor-Modulator (*selective estrogen receptor modulator*, SERM) Clomifen und der β_2 -Adrenorezeptor-Agonist (β_2 -Agonist) Zilpaterol. Beide Substanzen stehen auf der Verbotsliste der WADA [5].

Die Forschungsfrage zum ersten Projekt dieser Dissertation entwickelte sich aus einer im Jahr 2016 veröffentlichten Studie: Darin wurde nachgewiesen, dass Clomifen zu einer erhöhten Eiproduktionsrate bei einer nigerianischen Hühnerart führt [6]. Gleichzeitig war die Zahl „positiver“ Analyseergebnisse (*adverse analytical findings*, AAFs) mit sehr niedrigen Clomifen-Konzentrationen in den Jahren vor Veröffentlichung der Studie wegen der verbesserten Sensitivität in der Dopingsanalytik gestiegen [7]. Das erste Projekt dieser Dissertation adressiert daher im Rahmen einer Tierstudie die Frage, ob eine Clomifen-Behandlung von Hühnern zu so hohen Clomifen-Rückständen in Hühnereiern und Hühnerfleisch führt, dass ein Clomifen-AAF in Dopingkontrollproben ausgelöst werden kann. Hierfür sollten zunächst 24 Legehennen vier Wochen lang mit 10 mg Clomifen behandelt werden. Anschließend sollte eine HPLC-Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)-Methode entwickelt und validiert werden, die es ermöglicht, die Eier und das Fleisch der Tiere auf Clomifen-Rückstände zu untersuchen.

Nachdem im ersten Projekt im Fleisch und vor allem in den Eiern der Legehennen Clomifen-Rückstände gefunden worden waren, sollte im Rahmen des zweiten Projekts eine Verzehrstudie mit clomifenhaltigen Eiern durchgeführt werden. Die Verzehrstudie beschäftigte sich mit der Frage, ob die Clomifen-Konzentrationen in den Eiern aus dem ersten Projekt (10–20 μg pro Ei) ausreichen, um nach deren Verzehr im Urin Clomifen nachweisen zu können. Hierfür sollten insgesamt 18 männliche Probanden je zwei Eier essen. Zum Vergleich sollten mit je drei Probanden Mikrodosierungsstudien mit 1, 10 und 50 μg Clomifen-Citrat durchgeführt werden. Urinproben der Studienteilnehmer sollten im Anschluss mittels HPLC-MS/MS auf Clomifen und seine Metaboliten untersucht werden.

Im Urin aller Probanden konnten Clomifen-Rückstände nachgewiesen werden. Deswegen sollte zusätzlich eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, zwischen der Einnahme von Clomifen als Arzneistoff in Mikrodosierung und der Aufnahme der Substanz über clomifenhaltige Eier zu unterscheiden. Diese Methode sollte nach WADA-Richtlinien validiert und sowohl auf die Urinproben aus den Ausscheidungsstudien als auch auf Dopingkontrollproben mit Clomifen-AAFs angewendet werden. Bei der Anwendung dieser Methode auf die AAF-Proben wurde deutlich, dass sich die Metabolitenmuster dieser Urinproben nicht nur von den Urinproben der Probanden unterschieden, die clomifenhaltige Eier gegessen hatten, sondern auch von den Urinproben der Probanden, die Mikrodosen von Clomifen-Citrat eingenommen hatten.

In den AAF-Proben wurde ein bisher noch nicht identifizierter Hydroxy-Metabolit als abundantester detektiert. Dadurch ergab sich das Ziel des dritten Projekts dieser Dissertation: Der unbekannte mono-hydroxylierte Clomifen-Metabolit sollte identifiziert und synthetisiert sowie in die bereits bestehende Differenzierungsmethode implementiert werden. Mit dieser erweiterten Methode sollten dann Urinproben aus einer Langzeit-Applikationsstudie mit Clomifen analysiert werden, um das Eliminationsverhalten des neu identifizierten Metaboliten zu charakterisieren.

Schließlich führte ein aktueller Anlass zu einer weiteren relevanten Forschungsfrage, die im Rahmen eines vierten Projekts adressiert werden sollte: Im Jahr 2021 gab die WADA den *Technical Letter 23* heraus, der die Dopingkontrolllabore auf mögliche Rückstände der anabolen Substanzen Clenbuterol, Ractopamin, Zeranol und Zilpaterol in Fleisch aufmerksam machen sollte. Zudem führte die WADA darin ein sogenanntes *Minimum Reporting Level* (MRL) von 5 ng/mL in Urin für die aufgeführten anabolen Substanzen ein [8].

Das Eliminationsverhalten und der Metabolismus von Zilpaterol im Menschen sind nur wenig erforscht. Daher sollte mithilfe einer Mikrodosierungsstudie ein Kontaminations-szenario simuliert werden. Darin sollte untersucht werden, ob ein MRL von 5 ng/mL ausreicht, um Athlet*innen vor einem unabsichtlichen Zilpaterol-AAF durch Fleischverzehr zu schützen. Je fünf männliche Probanden sollten dafür 0.5 µg oder 3 µg einmalig oder fünf Tage in Folge einnehmen. Die über diese Zeiträume und bis zu einer Woche danach gesammelten Urinproben sollten mittels HPLC-MS/MS auf Zilpaterol und mögliche Metaboliten untersucht werden. Da Zilpaterol im Arzneimittel als Racemat vorliegt, sollte außerdem eine enantioselektive Methode entwickelt werden. Mithilfe dieser Methode sollte festgestellt werden, ob eine Diskriminierung eines Enantiomers im Körper stattfindet, wodurch sich das Eliminationsverhalten der beiden Enantiomere voneinander unterscheiden könnte.

3 Hintergrund der Arbeit

3.1 Anfänge und Fortentwicklung der Dopinganalytik

Doping mit dem Ziel, die Leistungsfähigkeit von Sportler*innen zu steigern, existiert bereits seit dem Altertum. Schon die Athleten der Antike verzehrten bestimmte Lebensmittel wie Stierhoden oder Alraunwurzeln, um ihre Kraft im Wettkampf zu steigern [9-11]. In Südamerika nutzten die Inka z. B. Koka-Blätter als stimulierendes Mittel, um schneller und länger laufen zu können [12]. Im Laufe der Zeit entwickelte sich jedoch der Fairnessgedanke im Sport, dem der Einsatz potenziell leistungssteigernder Mittel widerspricht. Lange konnte man betrügende Athlet*innen einzig dann überführen, wenn man sie auf frischer Tat ertappte. Heute ermöglicht es die moderne Dopinganalytik, Dopingvergehen aufzudecken, die zum Teil Wochen bis Monate vor der Probenahme stattgefunden haben [13-15]. Das erste veröffentlichte Doping-Nachweisverfahren aus dem Jahr 1930 wurde für den Nachweis von Alkaloiden in Pferdespeichel entwickelt. Es basierte auf dem Stas-Otto-Trennungsgang, gefolgt von Fällungs- und Farbreaktionen [10, 16]. Dennoch brauchte es danach mehrere Jahrzehnte und medienwirksame menschliche Tragödien, ehe man in den 1960er Jahren verstärkt in die Entwicklung analytischer Verfahren für den Nachweis von Doping in humanen Matrices investierte: Der dänische Radsportler Knud Enemark Jensen wurde während des Olympischen Radrennens 1960 infolge einer Amphetamineinnahme bewusstlos, fiel vom Rad und verstarb an den Folgen [17]. Ähnliches widerfuhr dem Briten Tom Simpson während der Tour de France 1967 [11]. Im Jahr 1965 etablierten Frankreich, Belgien und Italien ihre ersten Anti-Doping-Gesetze [18]. Das Internationale Olympische Komitee (*International Olympic Committee*, IOC) setzte infolge der oben genannten Tragödien eine medizinische Kommission ein und beschloss 1967 die Durchführung von Dopingtests [10]. Diese Kommission definierte die Dopingregeln bis zur Jahrtausendwende.

Im Jahr 1999 wurde die WADA gegründet, um die internationale Anti-Doping-Arbeit zu koordinieren und zu harmonisieren [19]. Ihr zentrales Element ist der WADC, ein weltweit gültiges und sportartenübergreifendes Regelwerk, unterschrieben von nahezu allen internationalen Sportfachverbänden der olympischen Bewegung, den Nationalen Anti-Doping-Organisationen und den Nationalen Olympischen Komitees [1]. Die detaillierten Ausführungsbestimmungen des WADC sind in insgesamt acht *International Standards* geregelt, wobei einer dieser Standards die jährlich aktualisierte Verbotsliste (*Prohibited*

List) ist. Darin sind die verbotenen Substanzen und Methoden in neun Substanzklassen und drei Methodenkategorien unterteilt. Die Kategorien S1–S5 sowie M1–M3 sind während und außerhalb des Wettkampfs verboten, die Gruppen S6–S9 nur während des Wettkampfs [5].

Der *International Standard for Laboratories* (ISL) beschreibt die regulatorischen Anforderungen an WADA-akkreditierte Anti-Doping-Labore. So wird sichergestellt, dass auch die angewendeten Testverfahren valide und harmonisiert sind [20]. Zum ISL gehören weitere technische Dokumente (*Technical Documents*), die die Anforderungen an die Methoden genauer formulieren. Das *Technical Document TD2022MRPL* regelt beispielsweise die seit 2022 geltenden Mindestanforderungen an die nachweisbaren Konzentrationen (*Minimum required performance levels*, MRPL) und die gültigen MRLs für Substanzen ohne Grenzwert, die mit chromatographisch-massenspektrometrischen Methoden analysiert werden [21]. Diese Mindestanforderungen werden regelmäßig überprüft sowie an aktuelle technische Entwicklungen und Forschungsergebnisse angepasst. Dadurch wurden beispielsweise die MRPLs im Vergleich zum Vorgängerdokument *TD2019MRPL* für anabole androgene Steroide und andere anabole Substanzen halbiert [21, 22]. Solche erhöhten Nachweisanforderungen stellen die Anti-Doping-Labore regelmäßig vor die Herausforderung, ihre Methoden zu verbessern. Dabei sind Instrumente wie z. B. moderne Massenspektrometer mit Nachweisgrenzen im pg/mL-Bereich essenziell.

Die analytische Sensitivität der Dopinganalytik hat sich in den vergangenen Jahren stark verbessert [10]. Dies hat nicht nur die Bandbreite der nachweisbaren Analyten erweitert, sondern auch für viele Analyten die Nachweiszeit enorm verlängert [23]. Dies ist ein großer Gewinn für die Anti-Doping-Arbeit, stellt die Akteure jedoch auch vor neue Herausforderungen [24]. Zum einen ist es so möglich, auch im Nachhinein Sportler*innen des Dopings zu überführen. Dies belegt z. B. das Re-Analyse-Programm des IOCs, das von der *International Testing Agency* (ITA) durchgeführt wurde: Allein durch die wiederholte Analyse von Proben der Olympischen Spiele 2012 in London wurden 31 Medaillen nachträglich aberkannt und 46 Medaillen neu verteilt [25].

Andererseits sind inzwischen bereits Kleinstmengen verbotener Substanzen nachweisbar, die keine messbare pharmakologische Wirkung auf den menschlichen Körper haben. Sie werden daher zwar z. B. bei Kontrollanalysen von Nahrungsergänzungs-, Lebens- oder Arzneimitteln als unbedenklich eingestuft, reichen jedoch für eine positive Dopingprobe aus [2]. Beispielsweise ist 2014 ein Sportler nach Einnahme erlaubter Tabletten positiv auf das verbotene Diuretikum Hydrochlorothiazid getestet worden, weil die Tabletten produktionsbedingt mit Spuren der Substanz kontaminiert waren [26]. Ein anderer Athlet

wurde positiv auf Dorzolamid getestet, nachdem er eine medizinisch notwendige Bluttransfusion von einem*einer Spender*in erhalten hatte, der*die das Diuretikum zu Therapie Zwecken einnahm [27]. Bekannt sind auch einige Fälle, die auf Rückstände des Wachstumsmittels Clenbuterol zurückzuführen waren [28, 29].

Bei den o. g. Beispielen ist es in der Vergangenheit gelungen nachzuweisen, dass es sich um Kontaminationen aus der Umwelt handelte. Der unterschiedliche Charakter dieser Szenarien zeigt jedoch, wie vielfältig die Umweltfaktoren sind, denen Athlet*innen ausgesetzt sind.

3.2 Exposom von Athlet*innen

Die Gesamtheit aller o. g. Umweltfaktoren wird Exposom genannt. Der Begriff Exposom wurde 2005 vom Epidemiologen Chris Wild eingeführt [30]. Seitdem beschreibt das Exposom in Anlehnung an das Genom die Gesamtheit aller Umweltbelastungen (Expositionen), denen ein Mensch ab Beginn im Mutterleib Zeit seines Lebens ausgesetzt ist [30]. Dabei werden sowohl endogene als auch exogene Faktoren einschließlich chemischer, physikalischer, biologischer und sozialer Faktoren betrachtet, die die menschliche Gesundheit beeinflussen können [31].

Im Allgemeinen fokussiert sich die Exposomforschung auf den Einfluss dieser Faktoren bei der Entstehung von Krankheiten. In Bezug auf Leistungssportler*innen muss das Exposom im Hinblick auf die geltenden Anti-Doping-Regeln näher betrachtet werden. Viele der Substanzen, die auf der Verbotsliste der WADA stehen, sind auch in der Umwelt zu finden. Die Untersuchung des Exposoms von Athlet*innen und die Unterscheidung zwischen absichtlichem Drogenkonsum und verschiedenen Kontaminationsszenarien ist daher zu einem zentralen Thema der Anti-Doping-Forschung geworden. Dieser muss es gelingen, das empfindliche Gleichgewicht zwischen den unverzichtbaren und sich ständig weiterentwickelnden Analysetechniken einerseits und andererseits dem Risiko des Exposoms von Athlet*innen zu erhalten, das zu AAFs führen kann [2].

Thevis *et al.* teilen das Exposom von Athlet*innen mit besonderem Fokus auf die Exposition mit im Sport verbotenen Substanzen in vier Kategorien ein: 1. Lebensmittel, die verbotene Substanzen enthalten; 2. Nahrungsergänzungsmittel, in denen Dopingsubstanzen vorkommen; 3. die Aufnahme dopingrelevanter Substanzen über erlaubte Medikamente, die sich entweder Metaboliten mit verbotenen Substanzen teilen oder kontaminiert sind und 4. der Transfer von Dopingsubstanzen von einer Person auf die

nächste [2]. Diese Einteilung ist in **Abbildung 3.1** mit Beispielen dargestellt. Im Folgenden wird auf diejenigen Risiken näher eingegangen, die von Lebensmitteln ausgehen.

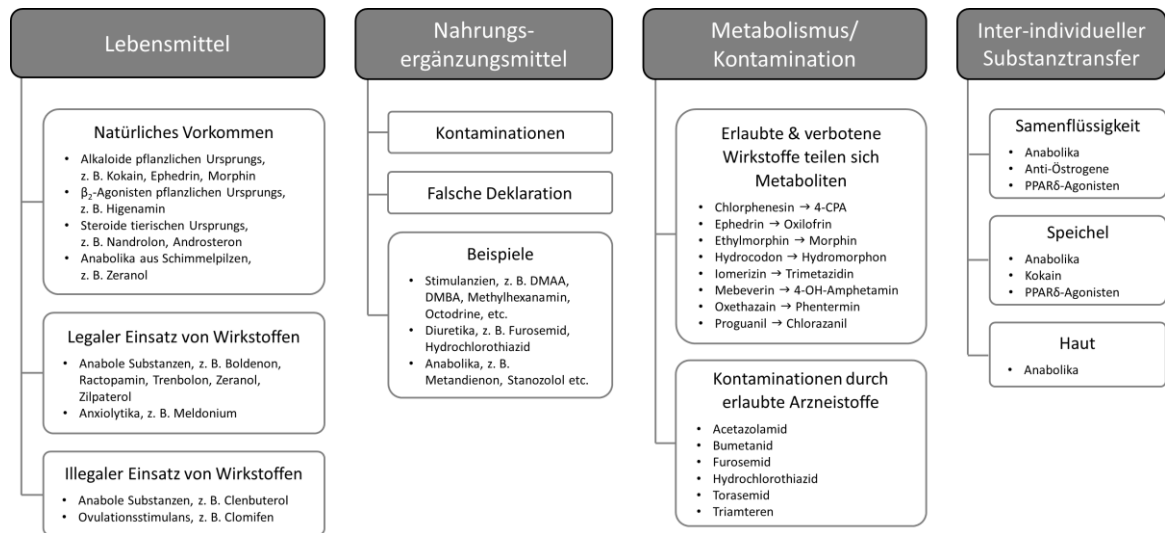


Abbildung 3.1 Ausgewählte Situationen, die zu einem AAF führen können, adaptiert von Thevis *et al.* 2020 [2].

3.3 Vorkommen von Dopingsubstanzen in Lebensmitteln

Einige lebensmittelbedingte „Dopingfallen“ sind allgemein bekannt: Beispielsweise kann ein übermäßiger Verzehr von Mohnkuchen zu nachweisbaren Spuren von Morphin im Urin führen [32]. Jedoch finden sich viele weitere Dopingsubstanzen in Lebensmitteln: Sie kommen sowohl natürlich vor als auch als Kontaminanten oder Rückstände durch den legalen und illegalen Einsatz der Substanzen in der industriellen Land- und Viehwirtschaft [2].

Einen Großteil der natürlich vorkommenden Dopingsubstanzen macht hier die Stoffgruppe der Alkaloide pflanzlichen Ursprungs aus. Darunter fallen u. a. die Stimulanzen Kokain, Ephedrin, Pseudoephedrin oder Synephrin sowie der β_2 -Agonist Higenamin [2, 33]. Oft finden sich diese bioaktiven Inhaltsstoffe z. B. in (Arznei-) Tees, Nahrungsergänzungsmitteln oder in tropischen Früchten [34, 35].

Auch der Verzehr tierischer Produkte kann dazu führen, dass natürlich vorkommende Dopingsubstanzen aufgenommen werden [36]. Beispielsweise sind bei nicht kastrierten männlichen Wildschweinen einige Steroidhormone natürlicherweise angereichert, sodass der Verzehr von Innereien solcher Tiere zu auffälligen Proben mit den Nandrolon-Metaboliten 19-Norandrosteron und 19-Noretiocholanolon führen kann [37, 38].

Zum legalen Einsatz dopingrelevanter Substanzen in der Viehwirtschaft zählt u. a. die Anwendung anaboler Steroide wie z. B. Trenbolon und die anabol wirkenden β_2 -Agonisten Ractopamin, Zeranol oder Zilpaterol [39]. Je nachdem, in welchen Mengen die Substanzen verabreicht wurden bzw. wie kurz die Administration vor der Schlachtung stattfand, kann es zu Rückständen im Fleisch der Tiere kommen. Viele dieser Wirkstoffe sind bei Nutztieren in einigen Ländern verboten und in anderen zugelassen. Deswegen kommen Rückstände davon im Fleisch von Nutztieren meist regional begrenzt vor [40].

Neben Wachstumsbeschleunigern gibt es weitere Tierarzneimittel, die zu Rückständen von Dopingsubstanzen in Lebensmitteln führen können. Das anti-hypoxische Mittel Emidonol, welches in der Nutztierhaltung zugelassen ist, wird sehr schnell zu Meldonium verstoffwechselt, das auf der WADA-Verbotsliste steht. In Milch von Kühen, die mit Emidonol behandelt wurden, konnten Rückstände von Meldonium nachgewiesen werden. Daher ist nicht auszuschließen, dass bei erhöhtem Milchkonsum ein AAF für Meldonium auftreten kann [41, 42].

Der illegale Einsatz pharmazeutischer Wirkstoffe in der Lebensmittelindustrie zählt in der Exposomforschung zu denjenigen Risiken für Athlet*innen, die am schwierigsten einzuschätzen sind. Es ist bekannt, dass einige Substanzen in manchen Ländern trotz Verbot angewendet werden. Besonders weit verbreitet ist z. B. der illegale Einsatz von Clenbuterol in China oder Mexiko. Eigentlich ist Clenbuterol zur Behandlung von Atemwegserkrankungen zugelassen. Durch seine zusätzliche anabole Wirkung führt es bei Rindern und Schweinen zu magererem Fleisch. Infolgedessen wurden bereits ganze Sportmannschaften positiv auf Clenbuterol getestet [28, 29]. Darüber hinaus gibt es Arzneistoffe, die illegal an Tieren eingesetzt werden, obwohl sie nie für Tiere zugelassen worden sind. In der Lebensmittelüberwachung wird nach diesen Substanzen daher selten gezielt gesucht.

Aus den vorgenannten Gründen betrachtet die Exposomforschung v. a. jene Substanzen der WADA-Verbotsliste, die nachweislich bestimmte Wirkungen in Nutztieren hervorrufen, um den Ertrag tierischer Lebensmittel (Fleisch, Milch, Eier) zu steigern. Clomifen beispielsweise konnte die Fertilität von Hühnern steigern und dadurch eine erhöhte Eiproduktionsrate hervorrufen [6, 43-45]. Um Athlet*innen vor einer positiven Dopingprobe zu schützen, die aus dem illegalen Einsatz von Wirkstoffen bei Tieren resultiert, müssen solche Kontaminationsszenarien in der präventiven Dopingforschung besonders beachtet und untersucht werden.

3.4 Strategien zur Unterscheidung zwischen absichtlichem und unabsichtlichem Doping

Da bereits in der Vergangenheit viele potenzielle Dopingfallen identifiziert wurden, gibt es verschiedene Strategien, um zwischen dem Missbrauch und der u. a. ernährungsbedingten Exposition verbotener Substanzen zu unterscheiden [2].

Der am einfachsten umsetzbare Ansatz zur Unterscheidung zwischen willentlichem und unbeabsichtigtem Doping ist die Implementierung von Grenzwerten (*decision limits*) oder MRLs. Grenzwerte werden eingesetzt, wenn es sich beispielsweise um Substanzen wie Morphin handelt, die nur im Wettkampf verboten sind [46]. MRLs werden genutzt, um für Substanzen, die nicht endogen vorkommen und während sowie außerhalb des Wettkampfs verboten sind, Kontaminationsursachen ausschließen zu können. Darunter fallen z. B. die anabol wirksamen Substanzen Clenbuterol, Ractopamin, Zeranol und Zilpaterol, die in einigen Ländern in der Rinderzucht und teilweise in anderer Viehzucht verwendet werden. Für diese Substanzen, die alle auf der Verbotsliste der WADA in der Kategorie „S1.2 Andere Anabole Substanzen“ zu finden sind, wurde 2021 ein MRL von 5 ng/mL festgelegt [8].

Bei Zeranol muss neben dem genannten Kontaminationsszenario noch ein zweites Szenario berücksichtigt werden: Zeranol kann auch *in vivo* aus dem Mykotoxin Zearalenon gebildet werden. Dieses Mykotoxin wird vom Schimmelpilz *Fusarium* bei falscher Lagerung von Getreide gebildet. Um zu unterscheiden, ob Zeranol als solches eingenommen oder als Metabolit von Zearalenon ausgeschieden wurde, können die Verhältnisse von Zearalenon und seinen Hauptmetaboliten α - und β -Zearalenol zu Zeranol als Marker hinzugezogen werden, da diese nur in kleinstmengen aus Zeranol gebildet werden [47, 48].

Ein anderes Beispiel, bei dem mehrere Kontaminationsszenarien betrachtet werden müssen, ist Meclofenoxat. Das Abbauprodukt 4-Chlorophenoxyessigsäure (4-CPA) wird als Marker für die Einnahme dieses Stimulans verwendet. Jedoch wird 4-CPA auch als Herbizid eingesetzt und kann daher als Rückstand in Lebensmitteln auftreten. Des Weiteren wurde festgestellt, dass 4-CPA auch ein Metabolit von Chlorphenesin ist, eine nicht verbotene Substanz, die z. B. in Kosmetika als Konservierungsmittel eingesetzt wird. Daher wird auch hier eine Kombination aus MRL und den Chlorphenesin-spezifischen Metaboliten (4-CPP, Chlorphenesin-Glucuronid oder Chlorphenesin-Sulfat) eingesetzt, um zwischen einer unbeabsichtigten und einer wissentlichen Einnahme zu unterscheiden [49-51].

Ein aktuelles Beispiel, bei dem die Ausscheidung verschiedener Stoffwechselprodukte zur Unterscheidung zwischen absichtlichem und unbeabsichtigtem Doping angewendet werden kann, zeigen Rubio *et al.* bei Higenamin. Higenamin ist ein β_2 -Agonist, der u. a. in tropischen Früchten der Familie der *Annonaceae* vorkommt, die roh, in Smoothies oder als Eiscreme verzehrt werden. Zur Unterscheidung zwischen der unbeabsichtigten Aufnahme von Higenamin durch Fruchterzeugnisse und der wissentlichen Einnahme der Substanz zu leistungssteigernden Zwecken wurden Zwischenprodukte des Benzylisochinolin-Alkaloid-Biosynthesewegs als vielversprechende Markersubstanzen identifiziert: Dieser Biosyntheseweg ist auf bestimmte Pflanzenfamilien wie die *Annonaceae* beschränkt und enthält Higenamin als erstes gemeinsames Zwischenprodukt. In den untersuchten Nahrungsergänzungsmitteln, die mit dem Ziel einer physiologischen Wirkung mit Higenamin versetzt wurden, konnten diese Markersubstanzen nicht detektiert werden [52].

3.5 Metabolismus und Pharmakokinetik in der Dopinganalytik

Da die meisten Fremdstoffe nicht in ihrer ursprünglichen Struktur renal wieder ausgeschieden werden, sondern eine Biotransformation durchlaufen, ist jeweils die Aufklärung ihres Metabolismus und ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften essenziell für die Dopinganalytik.

Die Biotransformation lässt sich in zwei relevante Phasen unterteilen: In Phase I finden sogenannte Funktionalisierungsreaktionen statt. Dabei werden funktionelle Gruppen in das Ausgangsmolekül eingeführt oder freigelegt. In Phase-II-Reaktionen werden die Phase-I-Metaboliten oder auch die Ausgangsmoleküle – sofern schon freie funktionelle Gruppen vorhanden sind – mit sehr polaren Gruppen konjugiert. Dies erhöht ihre Wasserlöslichkeit und inaktiviert den Fremdstoff in der Regel [53]. Je nach chemisch-physikalischen Eigenschaften der Ausgangsmoleküle wie z. B. Polarität und Enzymaffinität kommt es im Urin dann zu einer Vielzahl von Transformationsprodukten, die auch ein Gemisch aus Phase-I- und Phase-II-Metaboliten darstellen können [53]. Aus diesen Metaboliten werden für die Dopinganalytik meist die abundantesten und die am längsten nachweisbaren Metaboliten ermittelt und als Zielanalyten eingesetzt [54].

Die Bildung der Metaboliten hängt nicht nur vom Substrat selbst ab, sondern auch von der Substrat-Konzentration, von der zu katalysierenden Reaktion und von den Enzymen, die sie katalysieren. Daher gibt es Metaboliten, die schneller oder langsamer gebildet werden als andere und solche, die erst bei hohen Substrat-Konzentrationen in nennens-

werten Mengen gebildet werden [53]. Metaboliten, die ein verlängertes Ausscheidungs-fenster haben, werden Langzeit-Metaboliten genannt. Schon seit den 1990er Jahren werden diese explizit für Dopingsubstanzen gesucht [10, 55]. So ist es in manchen Fällen möglich, durch die unterschiedlichen Bildungskonstanten der Metaboliten und die sich dadurch zeitlich verändernden Metabolitenmuster Metabolitenverhältnisse zu berechnen. Über diese Metabolitenverhältnisse können dann Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Einnahme und/oder die Einnahmemenge gezogen werden. Eine solche Unterscheidung des Einnahmezeitraums ist beispielsweise beim selektiven Androgen-Rezeptor-Modulator LGD-4033 gelungen [56].

Eine besondere Chance in Bezug auf Metabolitenverhältnisse, die zur Aufklärung der Frage „Doping oder Kontamination?“ beitragen können, bieten Dopingsubstanzen, die als Stereoisomere vorliegen und als solche verabreicht werden: Zahlreiche Studien zeigen, dass sich die Halbwertszeiten von (*E*)- und (*Z*)-Isomeren unterscheiden können, wodurch eine Form deutlich länger nachweisbar als die andere ist. Auch die Enzymaffinität kann sich unterscheiden, sodass das (*E/Z*)-Verhältnis der Substanz oder eines Metaboliten im Urin vom (*E/Z*)-Verhältnis der Ursprungssubstanz im Medikament abweicht [57-60]. Dies kann in ähnlicher Weise für Enantiomere gelten [61-63].

Für tierische Lebensmittel, die Dopingsubstanzen enthalten, ist die Pharmakokinetik und der Metabolismus dieser Substanzen in Nutztieren ein weiterer Aspekt, den es zu betrachten gilt. Zwar gibt es viele Gemeinsamkeiten in der Biotransformation innerhalb von Vertebraten. Jedoch unterscheiden sich die Anzahl und Ausprägung der exprimierten Gene, die für beteiligte Enzyme codieren, stark voneinander [64, 65]. Dadurch gibt es beispielsweise Metaboliten, die charakteristisch für eine Spezies sind oder die Halbwertszeiten und Umsatzraten zu bestimmten Metaboliten unterscheiden sich [65-71]. Dies lässt im Idealfall Rückschlüsse auf den Ursprung der Dopingsubstanz zu.

Ein Beispiel aus dem Bereich der Dopinganalytik, bei dem die unterschiedliche Pharmakokinetik der Enantiomere, insbesondere auch die von Tieren, bereits betrachtet wurde, ist die Kontaminationsproblematik von Fleisch mit dem β_2 -Agonisten Clenbuterol: Es ist bekannt, dass Clenbuterol in einigen Ländern illegal als wachstumsförderndes Medikament in der Fleischindustrie eingesetzt wird. Rückstände von Clenbuterol verbleiben in so hohen Mengen im Fleisch, dass sie in Urinproben von Fleisch-Konsument*innen problemlos nachgewiesen werden können. Clenbuterol wird hauptsächlich unverändert ausgeschieden, sodass eine Differenzierung zwischen unbeabsichtigter und willentlicher Aufnahme anhand verschiedener Metabolitenmuster nicht möglich ist. Jedoch variiert in

Studien das Enantiomeren-Verhältnis signifikant zwischen Urinproben von Proband*innen, die Fleisch mit Clenbuterol-Rückständen verzehrt haben, und Urinproben von Proband*innen, die das Arzneimittel selbst eingenommen haben [72-74].

Auf ähnliche Weise sollen die Kontaminationsszenarien von Clomifen in Hühnereiern und Zilpaterol in Rindfleisch im Rahmen dieser Dissertation adressiert werden. Die beiden Substanzen werden im Folgenden vorgestellt.

3.6 Clomifen

Als SERM besitzt Clomifen sowohl östrogene als auch anti-östrogene Eigenschaften, je nachdem, welcher Rezeptortyp im Zielgewebe vorliegt, wie hoch der endogene Östrogenspiegel ist und welches seiner beiden Isomere an den Rezeptor bindet [75]. Die Struktur von Clomifen basiert auf einem Triphenylethylen-Gerüst und liegt als Gemisch von zwei Konfigurationsisomeren vor: (*E*)- und (*Z*)-Clomifen (**Abbildung 3.2**).

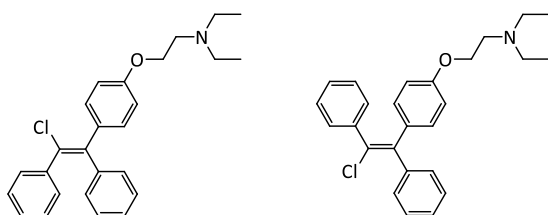


Abbildung 3.2 Strukturformeln von (*Z*)-Clomifen (links) und (*E*)-Clomifen (rechts).

Clomifen kann an die Östrogen-Rezeptoren im Hypothalamus und der Hypophyse binden. Dadurch greift es in den Rückkopplungsmechanismus endogenen Östrogens ein, sodass die Freisetzung des Gonadotropin-freisetzenden Hormons erhöht wird. Dies wiederum führt zu einer erhöhten Ausschüttung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH), was letztlich in einer gesteigerten Ovulation resultiert [75-77]. Deshalb wird Clomifen therapeutisch bei Frauen mit Kinderwunsch eingesetzt. Darüber hinaus wirkt Clomifen auch bei Männern: Dort kann die erhöhte Freisetzung von Gonadotropinen im Hypothalamus zu einer vermehrten Testosteronbildung im Hoden führen. Clomifen ist daher Gegenstand vieler Studien zur Behandlung männlicher Unfruchtbarkeit und wird *off-label* als Medikament zur Therapie von Hypogonadismus eingesetzt [78, 79].

Eben weil Clomifen die körpereigene Testosteronproduktion stimuliert, wird es jedoch auch als Dopingmittel missbraucht [80-82]. Daher steht es seit 2004 auf der Verbotsliste der WADA in der Kategorie S4 „Hormon- und Stoffwechselmodulatoren“ [5]. Innerhalb dieser Substanzklasse war Clomifen nach Meldonium 2021 die Substanz mit den meisten

AAFs [83]. Dies ist u. a. darauf zurückzuführen, dass Clomifen sehr lange im Urin nachweisbar ist. In Studien konnte es in Urin nach therapeutischer Applikation bis zu zehn oder elf Monate in Spuren nachgewiesen werden [7, 84]. Auch der Metabolismus von Clomifen wurde in den vergangenen Jahren in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien untersucht. Dadurch konnten über 20 Metaboliten von Clomifen identifiziert werden [85-91]. Das Enzym CYP2D6 ist maßgeblich am Metabolismus von (*E*)- und (*Z*)-Clomifen beteiligt. Zudem besitzt das für dieses Enzym codierende Gen den größten genetischen Polymorphismus innerhalb der CYP-Familie. Die Untersuchung des Clomifen-Metabolismus der verschiedenen Phänotypen ist daher Gegenstand der Forschung, um den Einfluss der Phänotypen auf die Wirksamkeit des Medikaments genau zu untersuchen [59, 88, 92].

Vor den Studien, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, adressierten nur Meijer *et al.* die Möglichkeit, dass Rückstände von Clomifen aufgrund seines illegalen Einsatzes in der industriellen Viehwirtschaft in tierischen Lebensmitteln zu finden sein könnten [93]. In keiner der von Meijer *et al.* analysierten Rinder- und Schweineurinproben wurden Rückstände von Clomifen detektiert [93]. Die Prävalenz von Clomifen in der Hühnerzucht wurde bisher noch gar nicht untersucht. Da Studien jedoch auf die fertilitätssteigernde Wirkung und die daraus resultierende erhöhte Eiproduktionsrate aufmerksam gemacht haben [6, 43-45], sind Rückstände in Eiern und Hühnerfleisch nicht auszuschließen. Die Dopingrelevanz solcher möglichen Rückstände soll im Rahmen dieser Dissertation adressiert werden.

3.7 Zilpaterol

Zilpaterol ist ein β_2 -Adrenorezeptor-Agonist. Diese Substanzklasse wird bei Tier und Mensch v. a. zur Erweiterung der Bronchien bei pulmonalen Erkrankungen eingesetzt. Seit den 1980er Jahren wurde bei einigen β_2 -Agonisten bei einer höheren Dosierung jedoch auch eine anabole Wirkung festgestellt [94]. Daher werden einige Vertreter dieser Klasse teils legal und teils illegal als Wachstumsbeschleuniger in der Nutztierhaltung eingesetzt. Zilpaterol wurde einzig für den Einsatz als anabole Substanz von Intervet und Merck entwickelt und unter dem Namen ZilmaxTM für die Rinderzucht vermarktet. Zilpaterol besitzt zwei Stereozentren, wobei die Enantiomere (*R,R*)- und (*S,S*)-Zilpaterol im Arzneistoff racemisch vorliegen (**Abbildung 3.3**) [95]. Die Struktur von Zilpaterol ist innerhalb der β_2 -Agonisten besonders, da das für einen β_2 -Agonisten typische Strukturmerkmal in einem 3-Ringsystem fixiert ist [96]. Damit geht eine weitere Eigenschaft des Wirkstoffs

einher: In einer Studie mit Pferden konnte gezeigt werden, dass Zilpaterol oral zu 100 % bioverfügbar ist [97].

Während Zilpaterol in der EU verboten ist, ist es z. B. in den USA, Kanada, Mexiko und Südafrika als Futtermittelzusatzstoff für Rinder zugelassen, um die Futtermitteleffizienz zu erhöhen und eine erhöhte Magerkeit des Fleisches zu erreichen [98]. Eine Zulassung für die Anwendung am Menschen gibt es weltweit nicht. Trotzdem gibt es in Internetforen Diskussionen über den Einsatz von Zilpaterol als Dopingmittel [99]. Daher steht es seit 2005 auf der Verbotsliste der WADA in der Gruppe S1.2 „Andere anabole Substanzen“ [5].

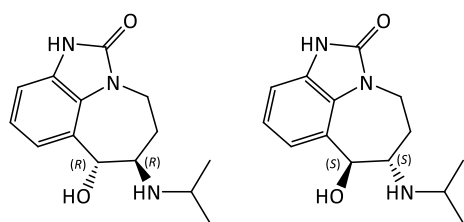


Abbildung 3.3 Strukturformeln von (*R,R*)-Zilpaterol (links) und (*S,S*)-Zilpaterol (rechts).

In der Rinderzucht wird Zilpaterol meist in den letzten 30–40 Tagen vor dem Schlachten verabreicht, mit einer sehr kurzen Auswaschphase von nur drei Tagen. Es ist bekannt, dass infolgedessen Zilpaterol-Rückstände im Fleisch solcher Tiere gefunden werden können. Um die Verbraucher*innen vor gesundheitlichen Risiken zu schützen, hat z. B. die US-amerikanische Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde (*Food and Drug Administration*, FDA) einen Rückstandshöchstgehalt von 10 µg Zilpaterol pro kg Rindfleisch festgelegt [100]. Einige Studien haben sich mit dieser Rückstandsproblematik befasst, indem sie Fleisch, Gewebe und Urin verschiedener Tiere mit LC-MS-Methoden untersucht haben [101–107]. Dabei wurde meist nur auf Zilpaterol und nicht auf etwaige Metaboliten untersucht. Die wenigen veröffentlichten Studien zum Metabolismus von Zilpaterol zeigten, dass es zum Großteil unverändert ausgeschieden wird [108].

In einer Studie aus den USA von 2016, in der die Urinproben von Patient*innen (n=370) mit Lungen- oder Brustkrebs auf die Prävalenz von β_2 -Agonisten untersucht wurden, wurden in 3 % der Proben Spuren von Zilpaterol nachgewiesen [109]. Dies kann als Hinweis auf eine hohe Verbreitung von Zilpaterol-Rückständen in tierischen Lebensmitteln aufgefasst werden [109]. Auch die WADA wurde auf dieses Problem aufmerksam. Sie führte 2021 ein MRL von 5 ng/mL für Zilpaterol ein, wonach Zilpaterol in Dopingproben erst ab einer Konzentration von 5 ng/mL als AAF gemeldet wird. Rückstände darunter werden seitdem als sogenanntes *atypical finding* (ATF) klassifiziert. Mit zwei AAFs im Jahr 2021 gehört Zilpaterol zu den Substanzen, die im Vergleich nur selten in höheren Konzentrationen in Dopingproben detektiert wird. Die Anzahl der ATFs (sechs Stück im selben Zeitraum) weist jedoch darauf hin, dass die Kontaminationsproblematik durchaus

ernst zu nehmen ist [83]. Vor dieser Dissertation wurden nur wenige Daten zum Eliminationsverhalten von Zilpaterol im Menschen veröffentlicht. Es lagen keine Daten vor, die eine Untersuchung ermöglichten, ob eine Diskriminierung eines Enantiomers stattfindet. Diese Lücke in der Erforschung des Athlet*innen-Exposoms sollte im Rahmen dieser Dissertation geschlossen werden.

4 Übersicht über das Promotionsprojekt

4.1 Erste Publikation

Seyerlein L, Gillard N, Delahaut P, Pierret G, Thomas A, Thevis M. Depletion of clomiphene residues in eggs and muscle after oral administration to laying hens. *Food Additives and Contaminants: Part A*. **2021**; 38:1875-1882.

Diese Publikation behandelt die Fragestellung, ob Clomifen-Rückstände in Hühnereiern und -fleisch nachweisbar sind, wenn Hennen das Mittel vorher als produktionssteigerndes Mittel verabreicht bekommen haben. Dazu wurden Hühner mit Clomifen behandelt und sowohl die im Rahmen der Studie gelegten Eier als auch das Fleisch der Tiere auf Rückstände der Substanz untersucht.

Clomifen ist als Medikament zugelassen, um den Eisprung bei Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch auszulösen. Diese Fertilitätssteigerung durch Clomifen konnte allerdings auch bei Tieren gezeigt werden [110]. Beispielsweise beschreibt eine Studie aus Nigeria, dass die dort heimischen Hennen deutlich mehr Eier legten, wenn sie täglich mit 10 mg Clomifen-Citrat behandelt wurden [6]. Die vorliegende Publikation beschäftigte sich folglich mit der Frage, ob bei einem industriellen Einsatz von Clomifen als Medikament für Legehennen Rückstände des Mittels in den Eiern oder im Fleisch der Hennen zu finden sind. Dies würde ein Doping-Risiko für „saubere“ Athlet*innen darstellen. Dafür wurden in einer kontrollierten Tierstudie jeden Tag für vier Wochen je 10 mg Clomifen-Citrat an 24 Legehennen verabreicht. Die während und bis zu zwei Wochen nach der Applikationsphase gelegten Eier wurden gesammelt und im Anschluss auf Clomifen-Rückstände untersucht. Nach der letzten Applikation wurden arbeitstäglich zwei der Tiere geschlachtet und ihr Fleisch auf Clomifen-Rückstände untersucht. Hierfür wurde zunächst eine Extraktions- und Detektionsmethode entwickelt: Die Eier und das Hühnerfleisch wurden homogenisiert und im Anschluss mit Acetonitril extrahiert. Der Überstand wurde verdünnt für die UHPLC-MS/MS-Analyse verwendet. Die Methode wurde nach VICH GL49-Richtlinien validiert [111]. Die Nachweisgrenze lag sowohl für Clomifen in Eiern als auch für Clomifen in Muskelfleisch bei 250 ng/kg. Die Bestimmungsgrenze lag für beide Matrices bei 1 µg/kg. Der dynamische Bereich lag zwischen 5 und 1000 µg/kg in Eiern und zwischen 0,5 und 20 µg/kg in Fleisch.

Insgesamt wurden über 250 Eier innerhalb dieser Studie analysiert. In den Eiern, die vor Beginn der Applikation gelegt wurden, wurde kein Clomifen nachgewiesen. In allen Eiern,

die während oder nach der Applikationsphase gelegt wurden, konnten Rückstände von Clomifen nachgewiesen werden. Die maximalen Clomifen-Konzentrationen lagen zwischen 221 und 312 µg/kg. Bei der separaten Analyse von Eiweiß und Eigelb konnte festgestellt werden, dass sich ca. 99 % der Rückstände im Eigelb befanden. Neben Clomifen wurde auch Hydroxy-Clomifen (HC) im Ei nachgewiesen. HC ist einer der Hauptmetaboliten von Clomifen, welcher ebenfalls am Östrogenrezeptor wirken kann. Im Verhältnis zu Clomifen wurden 5–10-fach geringere Mengen HC gefunden.

Auch im Fleisch der Hühner konnten Clomifen-Rückstände nachgewiesen werden, jedoch deutlich weniger als in ihren Eiern (Maximalkonzentration in Hühnerschenkeln: 150 µg/kg, in Hühnerbrust: 36 µg/kg). Über die graphische Abschätzung der Eliminationskonstanten konnten die experimentellen Halbwertszeiten für die Eliminierung von Clomifen bestimmt werden. Diese betrugen für Eier und Hühnerschenkel 1,3 Tage und für Brustmuskelfleisch 1,6 Tage.

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen, dass die Verabreichung von Clomifen an Hennen zu Clomifen-Rückständen in ihren Eiern und in ihrem Fleisch führen kann. Die Rückstände des Arzneimittels wurden mittels der in dieser Studie entwickelten und charakterisierten UHPLC-MS/MS-Methode bestimmt. Umgerechnet wurden zwischen 10 und 20 µg Clomifen pro Ei gefunden. Diese Mengen sind weniger als ein Tausendstel einer therapeutischen Dosis und haben daher beim Verzehr wahrscheinlich keine pharmakologische Wirkung. Allerdings ernähren sich Athlet*innen oftmals proteinreich, wodurch eine erhöhte Aufnahme von Clomifen durch clomifenhaltige Eier denkbar ist. Dies wiederum könnte zu Clomifen-Rückständen im Urin der Athlet*innen führen, was bei einer Dopingkontrolle zu einem AAF führen könnte. Daher sind weitere Studien notwendig: Diese sollten sich zum einen darauf konzentrieren, ob und in welchem Umfang Clomifen in der Eier-produzierenden Landwirtschaft eingesetzt wird. Ein weiterer Fokus sollte darauf liegen, das Risiko unbeabsichtigter Clomifen-AAFs in Dopingkontrollproben von Sportler*innen abzuschätzen und zu minimieren.

4.2 Zweite Publikation

Euler L, Gillard N, Delahaut P, Pierret G, Mürdter T, Schwab M, Döhmen G, Thomas A, Thevis M. Assessing human urinary clomiphene metabolites after consumption of eggs from clomiphene-treated laying hens using chromatographic-mass spectrometric approaches. *Analytica Chimica Acta*. **2022**; 1202:339661.

Im vorausgehenden Projekt wurde festgestellt, dass bei der täglichen Gabe von 10 mg Clomifen an Legehennen die gelegten Eier im Schnitt 10–20 µg Clomifen enthielten. Die zweite Publikation dieser Dissertation baut auf diesen Ergebnissen auf: Sie befasst sich mit der Frage, ob ein Clomifen-Rückstand von 10–20 µg je Ei bereits zu einem AAF in einer Dopingkontrollprobe führen kann. Dafür wurde eine vergleichende Ausscheidungsstudie durchgeführt: Eine Gruppe männlicher Probanden (n=18) verzehrte einmalig zwei hart gekochte clomifenhaltige Eier, während eine männliche Referenzgruppe unmittelbar Mikrodosierungen des Medikaments von 1 µg, 10 µg und 50 µg einnahm. Der Urin aller Probanden wurde auf Clomifen-Rückstände untersucht. Im Anschluss wurde eine Methode zur Unterscheidung der Aufnahmewege entwickelt und auf Realproben angewendet.

Die Urinproben der Probanden wurden einem Routine-Doping-Protokoll folgend aufgearbeitet und analysiert. Dabei wurde zunächst eine enzymatische Hydrolyse der Glucuronid-Konjugate und im Anschluss eine Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt. In den Urinproben beider Probanden-Gruppen konnten Spuren von Clomifen nachgewiesen werden. Clomifen ist laut WADA eine verbotene Substanz ohne Grenzwert und ohne MRL [21]. Daher würde dieser Nachweis bereits für ein AAF in einer Dopingkontrollprobe ausreichen.

Da Clomifen als (E)- und (Z)-Isomer vorkommt und die beiden Isomere sich in ihrer Pharmakokinetik unterscheiden, wurden auch die Eier auf die isomerspezifischen Rückstände von Clomifen untersucht. In den Eiern lag der Anteil des (Z)-Isomers sowohl von Clomifen als auch von 4-HC bei über 90 %. Die Menge an HC war dabei 5–10-fach geringer als von Clomifen. Daher wurden die Urinproben zudem auf unterschiedliche Isomere von HC untersucht. Bei der Messung der HC-Glucuronid-Konjugate wiesen die abundantesten Signale der Mikrodosierungsgruppe im Vergleich zur Ei-Verzehrgruppe eine leichte Verschiebung der Retentionszeiten auf. HC trägt nur eine Hydroxygruppe, an der das Glucuronid konjugiert sein kann. Die unterschiedlichen Retentionszeiten waren daher ein Hinweis darauf, dass es sich bei den Hauptmetaboliten der beiden Studiengruppen um

verschiedene HC-Isomere handelt. Eine massenspektrometrische Aufklärung der hydroxylierten Position war nicht möglich, da HC wie auch Clomifen bei einer kollisionsinduzierten Dissoziation lediglich Produktionen der unveränderten Seitenkette aufwies. Über die Derivatisierung mit Dansylchlorid und die Optimierung des Gradienten konnten die beiden Analyten getrennt werden. Durch den Vergleich mit neuem Referenzmaterial wurden (Z)-3-HC in den Proben der Mikrodosierung und (Z)-4-HC in den Proben der Eier-Gruppe jeweils als Hauptmetabolit identifiziert. Die hier neu entwickelte Methode zur Trennung der Dansylderivate von (E)- und (Z)-3-HC sowie (E)- und (Z)-4-HC wurde nach WADA-Richtlinien validiert. Es wurden Nachweisgrenzen zwischen 3 und 4 pg/mL erreicht.

Die Methode wurde in einem nächsten Schritt auf sechs reale Dopingproben angewendet, für die ein AAF mit Clomifen vorlag. Die Kombination der Messdaten der Proben mit und ohne Derivatisierung ergab, dass der hauptsächlich ausgeschiedene Hydroxy-Metabolit in diesen Proben keiner der in die Methode integrierten HCs war. Daraufhin wurden die Stoßquerschnitte (*collision cross section*, CCS) der verschiedenen HC-Isomere über Ionenmobilitätsspektrometrische (IMS) Experimente und anhand der gemessenen Mobilitäten berechnet. Diese experimentell bestimmten CCS-Werte wurden mit computersimulierten CCS-Werten für die möglichen HC-Strukturen verglichen. Mit diesen Ergebnissen konnte zwischen wahrscheinlicheren und unwahrscheinlicheren HC-Strukturen differenziert werden. Jedoch konnte die endgültige Struktur auch durch diese Experimente nicht aufgeklärt werden. Für die Identifizierung dieses Metaboliten waren daher weitere Experimente und Studien notwendig, einschließlich der Synthese mutmaßlicher Referenzverbindungen.

Die im Rahmen des hier beschriebenen Projekts entwickelte Methode kann dazu beitragen, zwischen drei Formen der Aufnahme von Clomifen zu unterscheiden: erstens über kontaminierte Eier, zweitens über eine kürzlich direkt eingenommene Mikrodosis Clomifen und drittens über eine frühere Clomifenaufnahme in therapeutischer Dosierung z. B. zu Dopingzwecken. Die Ionenmobilitätsexperimente haben außerdem gezeigt, dass die Unterscheidung der HC-Isomere nicht nur durch Flüssigkeitschromatographie nach Derivatisierung möglich ist, sondern auch durch die Ionenmobilität. Dies ermöglicht eine ergänzende und schnelle Differenzierungsmethode, wenn das erforderliche IMS-MS-Gerät zur Verfügung steht.

4.3 Dritte Publikation

Euler L, Mürdter T, Heinkele G, Schwab M, Miller G, Eichner D, Thomas A, Thevis M. Identification of (Z)-3'-hydroxy clomiphene as a new potential doping-relevant metabolite of clomiphene. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2023**; 37:e9599.

Diese Publikation beschreibt die Identifizierung, Synthese und Charakterisierung eines möglichen Langzeit-Metaboliten von Clomifen.

Im Rahmen des zweiten Projekts dieser Dissertation wurde eine Methode entwickelt, mit der unterschieden werden kann, ob Clomifen in seiner pharmazeutischen Form in Mikrodosierung oder als Rückstand in Eiern eingenommen wurde. Infolgedessen wurde bei der Re-Analyse von Dopingkontrollproben mit Clomifen-AAF ein bisher unbekanntes HC-Isomer als abundantestes HC entdeckt. Da dieser Metabolit weder in den Urinproben nach Eiverzehr noch in den Proben nach der mikrodosierten Einnahme von Clomifen auftrat, sollte er im Rahmen einer Folgestudie identifiziert und hinsichtlich seines Langzeitcharakters untersucht werden.

In der vorausgehenden Studie wurden Ionenmobilitätsexperimente und Computersimulationen durchgeführt, um wahrscheinlichere Strukturen des HC-Metaboliten zu identifizieren. Auf Grundlage dieser Daten wurden (E/Z)-3'-HC und (E/Z)-4'-HC über eine McMurry-Reaktion synthetisiert. Über den Vergleich mit den Realproben konnte (Z)-3'-HC als der gesuchte Metabolit identifiziert werden. Die Stereochemie wurde dabei über *in vitro*-Inkubationsversuche mit Lebermikrosomen und isomerenreinem (E)- und (Z)-Clomifen bestimmt. Die chromatographische Trennmethode der mit Dansylchlorid derivatisierten HC-Isomere wurde um die neuen Referenzverbindungen auf nun acht HC-Isomere erweitert.

Mit dieser aktualisierten Methode wurden Proben aus einer früheren Studie von Miller *et al.* erneut analysiert, in der männliche Studienteilnehmer 30 Tage lang therapeutische Dosen von 50 mg Clomifen-Citrat pro Tag erhalten hatten [84]. Die Ausscheidungsprofile von zwei Probanden wurden dabei als Machbarkeitsnachweis untersucht. In beiden Fällen war das zuvor beschriebene (Z)-3-HC der abundanteste Metabolit zu Beginn der Ausscheidungsstudie. Der neu beschriebene Metabolit (Z)-3'-HC konnte ebenfalls in Proben beider Probanden nachgewiesen werden. Die relative Konzentration des Metaboliten stieg jedoch erst nach Absetzen der Clomifen-Therapie an: Drei Wochen nach der letzten Clomifen-Gabe war (Z)-3'-HC der abundanteste Hydroxy-Metabolit in den Urinproben beider Probanden. Damit wurde (Z)-3'-HC als potenzieller Langzeit-Metabolit bestätigt.

Dieser könnte somit zukünftig herangezogen werden, um zwischen unbeabsichtigtem und absichtlichem Doping zu unterscheiden. Um jedoch Rückschlüsse darauf zu ziehen, wann und wieviel Clomifen von dem*der Sportler*in eingenommen wurde, sind weitere, umfangreichere Studien erforderlich.

4.4 Vierte Publikation

Euler L, Wagener F, Thomas A, Thevis M. Determination and enantioselective separation of zilpaterol in human urine after mimicking consumption of contaminated meat by HPLC-MS/MS techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2022**; 36:e9357.

Die vierte Publikation dieser Dissertation beschreibt eine Ausscheidungsstudie, die den Verzehr von Rindfleisch simuliert, das Zilpaterol-Rückstände enthält. Es wird untersucht, ob Mikrodosen dieser Substanz zu einem AAF führen können.

Da Zilpaterol in einigen Ländern legal als Futtermittelzusatz eingesetzt wird, legte die FDA einen Rückstandshöchstgehalt von 10 µg/kg in Muskelfleisch von Rindern fest [100]. Auch die WADA erkannte das Risiko einer positiven Dopingprobe über Zilpaterol-Rückstände in Fleisch. Sie etablierte daher ein MRL von 5 ng/mL Zilpaterol, die eine Urinprobe enthalten muss, um als positiv berichtet zu werden [8].

Angesichts des Mangels an veröffentlichter Literatur zur Pharmakokinetik von Zilpaterol beim Menschen wurde eine Studie durchgeführt, in der die Aufnahme von Rindfleisch simuliert wurde, das unterhalb oder in Höhe der für Menschen erlaubten Tagesdosis (*acceptable daily intake*, ADI) von 0,04 µg/kg Körpergewicht [112] mit Zilpaterol kontaminiert war. Je fünf männliche, gesunde Freiwillige erhielten eine oder fünf orale Dosen von 0,5 oder 3 µg Zilpaterol. Sowohl vor als auch bis zu zehn Tage nach der Verabreichung wurden Urinproben gesammelt. Zur Analyse wurde eine HPLC-MS/MS-Methode optimiert und nach WADA-Kriterien validiert.

Die Maximalkonzentrationen von Zilpaterol im Urin wurden zwischen 1,5 und 12,5 h nach der Einnahme beobachtet. Bei einem der Studienteilnehmer wurde nach der Einnahme von 3 µg Zilpaterol an fünf aufeinanderfolgenden Tagen der MRL von 5 ng/mL einmalig überschritten. Die eingenommene Menge von 3 µg Zilpaterol entspricht einem 300 g-Rindersteak, das die Rückstandshöchstmenge von 10 µg/kg enthält. Demnach ist der Nachweis von Zilpaterol oberhalb des MRLs in einer Dopingkontrollprobe eines* einer Athlet*in infolge einer Fleischkontamination zwar möglich; dafür müssen aber die vorgenannten spezifischen Umstände bzw. Bedingungen erfüllt sein.

In den Urinproben der Probanden konnten keine Metaboliten von Zilpaterol detektiert werden. Daher wurde in einem nächsten Schritt eine enantioselektive Trennmethode entwickelt, um die beiden im Arzneimittel vorliegenden Enantiomere (*R,R*)- und (*S,S*)-Zilpaterol chromatographisch zu trennen und die enantioselektive Ausscheidung zu untersuchen. Dies gelang mithilfe einer chiralen Trennsäule und mittels chemischer Ionisierung

unter Atmosphärendruck (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). Im Vergleich zum racemischen Referenzstandard konnten keine signifikanten Unterschiede im Eliminationsverhalten der Enantiomere festgestellt werden. Auch die untersuchten realen Dopingproben, die eine Zilpaterolkonzentration unterhalb des MRLs aufwiesen, unterschieden sich nicht von den Proben aus der Studie.

Die vorliegende Studie bestätigt die Relevanz eines WADA-MRLs für einzelne Wirkstoffe zum Schutz von Athlet*innen. Sie weist jedoch auch darauf hin, dass in seltenen Fällen Urinkonzentrationen, die höher als das MRL sind, auch auf Kontaminationen von Lebensmitteln wie z. B. Fleisch zurückzuführen sein können. Daher sind künftige Studien wie die enantioselektive Analyse von Zilpaterol-Rückständen in Fleisch angezeigt. Damit lassen sich vermutlich weitere Strategien entwickeln und bewerten, die die Entscheidungsfindung in der Dopingbekämpfung verbessern können.

5 Depletion of clomiphene residues in eggs and muscle after oral administration to laying hens

Luisa Seyerlein^a, Nathalie Gillard^b, Philippe Delahaut^b, Gilles Pierret^b, Andreas Thomas^a, and Mario Thevis^{a,c}

^aInstitute of Biochemistry, Center for Preventive Doping Research, German Sport University Cologne, Germany

^bCER Groupe, Marloie, Belgium

^cEuropean Monitoring Center for Emerging Doping Agents (EuMoCEDA), Cologne/Bonn, Germany

Veröffentlicht in: *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2021**; 38:11, 1875-1882.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1949497>

Abstract

The selective oestrogen receptor modulator (SERM) clomiphene is therapeutically used to induce ovulation. While prohibited as a doping agent in sports, it is frequently detected in sports drug testing urine samples. Few reports exist on clomiphene's (illicit) use in the farming industry to increase the egg production rate of laying hens, which creates a risk that eggs as well as edible tissue of these hens contain residues of clomiphene. To investigate the potential transfer of clomiphene into eggs and muscle tissue, laying hens were orally administered with clomiphene citrate at 10 mg/day for 28 days. To determine clomiphene residues in eggs, chicken breast and chicken thigh, the target analyte was extracted from homogenised material with acetonitrile and subjected to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) analysis. The test method reached a limit of quantification (LOQ) of 1 µg/kg and was characterised concerning specificity, precision, trueness and linearity. Analyses were performed on whole egg, egg white and yolk separately, and chicken muscle from breast and thigh. Clomiphene was detectable in eggs two days after the beginning of the drug administration period. The drug concentrations increased to 10–20 µg per egg within one week, and after withdrawal of clomiphene, residues decreased after 4 days, but traces of clomiphene were still detectable until the end of the study (14 days after the last administration). In the chicken's muscle tissue, clomiphene levels up to 150 µg/kg (thigh) and 36 µg/kg (breast) were found. Six days after the last dose, tissue clomiphene concentrations fell below the LOQ. Overall, these results underline the concerns that clomiphene may be transferred into animal-derived food and future research will therefore need to focus on assessing and minimising the risk of unintentional adverse analytical findings in doping controls.

6 Assessing human urinary clomiphene metabolites after consumption of eggs from clomiphene-treated laying hens using chromatographic-mass spectrometric approaches

Luisa Euler¹, Nathalie Gillard², Philippe Delahaut², Gilles Pierret², Thomas Mürdter³, Matthias Schwab^{4,5}, Georg Döhmen⁶, Andreas Thomas¹, and Mario Thevis^{1,7}

¹ Institute of Biochemistry, Center for Preventive Doping Research, German Sport University Cologne, Germany

² CER Groupe, Marloie, Belgium

³ Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institute of Clinical Pharmacology and University Tübingen, Stuttgart, Germany

⁴ Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany

⁵ Department of Clinical Pharmacology, Department of Biochemistry and Pharmacy, University Tübingen, Germany

⁶ Fertility Center Niederrhein, Mönchengladbach, Germany

⁷ European Monitoring Center for Emerging Doping Agents (EuMoCEDA), Cologne/Bonn, Germany

Veröffentlicht in: *Analytica Chimica Acta*. **2022**; 1202:339661.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339661>

Abstract

The anti-estrogen clomiphene is prohibited in sports at all times. Yet, adverse analytical findings (AAFs) have increased since 2011. This is possibly due to improved analytical sensitivity, but also contamination of food of animal origin needs to be taken into consideration as a potential source of drug exposure. For instance, studies with laying hens that received orally administered clomiphene have shown a significantly increased egg production rate but, as a consequence, eggs were found to incorporate residues of clomiphene.

In order to evaluate if the consumption of clomiphene-contaminated eggs can cause an AAF of a doping control sample, eggs obtained from an animal administration study with clomiphene were consumed by human volunteers. Each volunteer ate two eggs, and urine samples were collected and analyzed using routine doping control procedures. Subsequently, additional volunteers received a microdosed clomiphene capsule to compare the excretion profiles.

Maximum urinary concentrations of hydroxy-clomiphene (HC) between 80 and 300 pg/mL were detected following the consumption of clomiphene-containing eggs, which would constitute AAFs if observed in athletes' doping control samples. In order to support the differentiation of potential routes of drug exposure, a method was developed which allows for the chromatographic separation of (*E*)-3-, (*Z*)-3-, (*E*)-4-, and (*Z*)-4-HC using a derivatization step. By comparing the peak areas of these metabolites, characteristic relative distribution patterns were found that assist in identifying AAFs resulting from clomiphene ingested via contaminated eggs and, thus, enable to distinguish clomiphene intake via contaminated eggs from the intake of microdoses or therapeutic dosages, e.g. for doping purposes.

7 Identification and synthesis of (Z)-3'-hydroxy clomiphene as a new potential doping-relevant metabolite of clomiphene

Luisa Euler¹, Thomas Mürdter^{2,3}, Georg Heinkele^{2,3}, Matthias Schwab^{2,4}, Geoffrey D. Miller⁵, Daniel Eichner⁵, Andreas Thomas¹, Mario Thevis^{1,6,*}

¹Institute of Biochemistry/Center for Preventive Doping Research, German Sport University Cologne, Germany

²Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany

³University of Tübingen, Tübingen, Germany

⁴Departments of Clinical Pharmacology and of Biochemistry and Pharmacy, University Tübingen, Tübingen, Germany

⁵Sports Medicine and Research Testing Laboratory, South Jordan, Utah, USA

⁶European Monitoring Center for Emerging Doping Agents (EuMoCEDA), Cologne/Bonn, Germany

*Correspondence: m.thevis@biochem.dshs-koeln.de

Veröffentlicht in: *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. **2023**; 37:e9599.
<https://doi.org/10.1002/rcm.9599>

Abstract

Rationale: A recent study addressed the possibility of unintentional ingestion of clomiphene through residues in chicken eggs. The method developed here helped to distinguish between microdose intake of (E/Z)-clomiphene citrate and consumption of clomiphene-containing eggs by the urinary pattern of four mono-hydroxylated clomiphene metabolites. However, reanalyses of doping-control samples, which showed an adverse analytical finding for clomiphene, revealed a hydroxy clomiphene (HC) isomer that was not found after microdose intake or after consumption of clomiphene-containing eggs and could not be assigned to any of the available reference compounds. The aim of the present follow-up study was to identify this HC isomer and to characterize this metabolite with respect to its potential properties as long-term metabolite in doping controls.

Methods: (E/Z)-3'-HC and (E/Z)-4'-HC were synthesized involving the McMurry reaction. An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was developed and optimized after a derivatization step with dansyl chloride to separate eight HC isomers. Using this method, urine samples from a controlled clomiphene administration study were analyzed, in which male study participants received therapeutic doses of clomiphene for 30 days and collected urine samples for up to 8 months. Thus, isomer-specific HC elimination profiles could be monitored.

Results: The metabolite previously found in doping-control samples was identified as (Z)-3'-HC. The elimination profiles of the different HC confirmed previous results, with (Z)-3-HC being the most abundant urinary hydroxy metabolite shortly after administration. A new finding was that the data suggest that (Z)-3'-HC is excreted at higher relative concentrations only several weeks after drug intake.

Conclusion: These findings might be of particular importance in sport drug testing as they can assist in the decision-making process to distinguish between intentional doping and inadvertent exposure to clomiphene via food contamination.

8 Determination and enantioselective separation of zilpaterol in human urine after mimicking consumption of contaminated meat using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry techniques

Luisa Euler¹, Felicitas Wagener¹, Andreas Thomas¹, and Mario Thevis^{1,2}

¹Institute of Biochemistry, Center for Preventive Doping Research, German Sport University Cologne, Germany

²European Monitoring Center for Emerging Doping Agents (EuMoCEDA), Cologne/Bonn, Germany

Veröffentlicht in: *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. **2023**; 37:e9599.
<https://doi.org/10.1002/rcm.9357>

Abstract

Rationale: The synthetic β -adrenoreceptor agonist zilpaterol is legitimately used as an animal feed supplement in selected countries due to its known effects on lipolysis and protein biosynthesis. These pharmacological characteristics of zilpaterol have contributed to its classification as doping agent in sport by the World Anti-Doping Agency. However, the use as a feed supplement can lead to residues of the drug in edible tissues and, possibly, also in the urine of consumers.

Methods: To provide urinary elimination profiles of microdosed zilpaterol and to determine whether the ingestion of zilpaterol below or at the acceptable daily intake level of 0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bodyweight can result in an adverse analytical finding (AAF) in doping controls, healthy volunteers were administered single or multiple oral doses of 0.5 μg or 3 μg zilpaterol to mimic ingestion of contaminated cattle meat. Urine samples were collected and analyzed using a validated high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) method and a newly developed chiral high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-APCI-MS/MS) method.

Results: Urinary peak concentrations of zilpaterol were observed for all volunteers 1.5–12.5 h after ingestion, and maximum levels >5 ng/mL, which would constitute an AAF in doping controls, were found after the intake of 3 μg of zilpaterol on five consecutive days in one out of five study participants. Noteworthy, the enantiomeric ratio of excreted zilpaterol remained constant over time.

Conclusion: This study provides first insights into the urinary excretion of microdosed zilpaterol. Furthermore, a method was successfully developed and applied for the separation of the zilpaterol enantiomers with mass spectrometric detection.

9 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Die in den vergangenen Jahren stark verbesserte analytische Sensitivität im Bereich der Dopinganalytik ermöglicht es, Dopingsubstanzen lange im Urin nachzuweisen und Dopingsünder dadurch auch retrospektiv zu überführen. Dies stellt die Anti-Doping-Akteure vor neue Herausforderungen: Inzwischen sind Kleinstmengen verschiedener Dopingsubstanzen in Urin nachweisbar, welche auf Kontaminationen oder Rückstände in der Umwelt zurückzuführen sein können. Daher birgt das Exposom der Athlet*innen vermehrt Gefahren für einen positiven Dopingtest nach unbeabsichtigter Einnahme verbotener Substanzen. Innerhalb der präventiven Dopingforschung ist daher in den vergangenen Jahren ein neues Forschungsfeld entstanden, das sich mit möglichen Expositionen mit Dopingsubstanzen beschäftigt, um Athlet*innen vor unbeabsichtigtem Doping zu schützen. Lebensmittel stellen dabei eines der Expositionsrisiken dar. Hier setzt die vorliegende Dissertation an, indem mögliche Kontaminationsszenarien genauer untersucht werden.

Im ersten Kontaminationsszenario wurde Hennen Clomifen verabreicht, um eine erhöhte Eiproduktionsrate zu erzielen. In Ländern, in denen die Eiproduktion industrialisiert worden ist, werden fast ausschließlich sogenannte Legehybride eingesetzt. Dies sind auf eine hohe Eiproduktionsrate spezialisierte Legehennen, die bis zu 330 Eier pro Jahr legen [113]. Da ein Ei 24–26 h vom Eisprung bis zum Eierlegen benötigt, ist hier durch Züchtung bereits das biologische Maximum erreicht [114]. Daher ist in diesem Bereich der Eiproduktion der Einsatz von Clomifen unwahrscheinlich. Jedoch ist in weniger entwickelten Ländern die Artenvielfalt heimischer Hühner noch deutlich höher; die Eiproduktionsrate einer Durchschnittshenne liegt dort bei deutlich unter einem Ei pro Tag [115]. In Nigeria und Äthiopien sind beispielsweise 80 % und 99 % der gesamten Hühnerpopulation einheimische Hühnerrassen [116-118]. Hier kann die Eiproduktion noch gesteigert werden. Folglich überrascht es nicht, dass eine Studie aus Nigeria den Einsatz von Clomifen zur Erhöhung der Fertilität und Eiproduktionsrate bei einheimischen Hühnerrassen untersucht hat und empfiehlt [6]. Der Kauf von Clomifen-Citrat ist deutlich günstiger als der Kauf gezüchteter Legehybride. Es ist daher denkbar, dass Clomifen in Entwicklungsländern bei einheimischen Hühnern tatsächlich angewendet wird. Um das daraus resultierende Doping-Risiko für Athlet*innen besser einschätzen zu können, sollten in Zukunft Studien durchgeführt werden, die untersuchen, ob und wie stark der

illegale Einsatz von Clomifen in der Eier-produzierenden Landwirtschaft in Entwicklungsländern verbreitet ist. Die im Rahmen des ersten Projekts dieser Dissertation entwickelte Methode kann dabei zur Analyse der Eier zum Einsatz kommen.

Wenn Clomifen in der Eiproduktion eingesetzt wird, weisen die Ergebnisse des ersten Projekts darauf hin, dass die dadurch entstehenden Clomifen-Rückstände ein ernst zu nehmendes Risiko für Athlet*innen darstellen könnten. Daher wurde in einer Folgestudie (zweites Projekt) untersucht, ob der Verzehr clomifenhaltiger Eier ein AAF in einer Dopingkontrollprobe auslösen kann.

Im Urin der Probanden konnte die Aufnahme von Clomifen bereits nach dem Verzehr von zwei clomifenhaltigen Eiern nachgewiesen werden. Zum Vergleich wurden Ausscheidungsstudien mit Mikrodosen von Clomifen (1, 10 und 50 µg) durchgeführt. Auch im Urin dieser Probanden konnten Clomifen-Rückstände nachgewiesen werden. Über das Ausscheidungsprofil verschiedener Hydroxy-Metaboliten konnte eine Differenzierungsmethode entwickelt werden, um zwischen der Aufnahme von Clomifen über kontaminierte Eier oder als Mikrodosis zu unterscheiden.

In dieser Studie wurde der einmalige Konsum von zwei clomifenhaltigen Eiern untersucht. Es ist jedoch denkbar, dass Athlet*innen täglich clomifenhaltige Eier verzehren. Allein auf Basis dieser Ergebnisse lassen sich daher zwar keine klaren Aussagen über etwaige Kumulationseffekte treffen. Allerdings ist nicht davon auszugehen, dass sich das Hydroxy-Metabolitenprofil bei täglicher Aufnahme stark verändert: In der vorliegenden Studie wurden die Peak-HC-Konzentrationen in Urin bereits nach wenigen Stunden erreicht. Zudem waren die aufgenommenen Clomifen-/HC-Mengen im µg-Bereich und damit noch deutlich geringer als die typische Enzymsättigungskonzentration von CYP-Enzymen [119].

Neben der Aufnahme von Clomifen über Eier kann die Verunreinigung von Nahrungsergänzungsmitteln ein Kontaminationsszenario darstellen. Dies zeigten Torres *et al.* in einer Studie aus dem Jahr 2023: In zwei von 140 Präparaten, die in Folge von AAFs in Dopingkontrollproben untersucht wurden, konnten Clomifen-Verunreinigungen nachgewiesen werden. Der Gehalt lag bei 0,02 µg/g und 1,1 µg/g Kapselinhalt [120]. Dieses Szenario war keine primäre Fragestellung dieser Dissertation, wurde im Rahmen des zweiten Projekts aber dennoch durch die Mikrodosierungsstudie simuliert. Durch das Hydroxy-Clomifen-Ausscheidungsmuster konnte das Szenario klar vom Eiverzehr sowie von den untersuchten realen Dopingproben abgegrenzt werden. Dies erhöht und erweitert die Relevanz und das Anwendungsspektrum der entwickelten Methode.

In den AAF-Proben, die im Rahmen der Vergleichsstudie des zweiten Projekts untersucht wurden, wurde ein bisher unbekannter Hydroxy-Metabolit als abundantester entdeckt.

Dieser Metabolit wurde weder in den Proben nach Eiverzehr noch in den Proben nach der Einnahme der Mikrodosis detektiert. Er hatte daher das Potenzial, charakteristisch für die Einnahme von Clomifen in höheren Mengen über einen längeren Zeitraum z. B. in Form von willentlichem Doping zu sein. Daher wurde dieser Metabolit im dritten Projekt dieser Dissertation identifiziert und näher charakterisiert. Über die Synthese wurde bestätigt, dass es sich beim vorgenannten Metaboliten um (Z)-3'-HC handelt. Durch die Re-Analyse von Urinproben aus einer Ausscheidungsstudie von Miller *et al.* [84] mit therapeutischen Clomifen-Dosen ließ sich zudem zeigen, dass (Z)-3'-HC im Vergleich zur Gesamt-HC-Ausscheidung nach Absetzen von Clomifen zunahm. Es wurden lediglich die Urinproben von zwei Probanden untersucht. Bereits zwischen diesen beiden Profilen wurden inter-individuelle Unterschiede sichtbar.

Zu allen Ausscheidungsstudien wurden aus medizinisch-ethischen Gründen nur Männer zugelassen. Daher ist unbekannt, ob sich die geschlechtsspezifischen Unterschiede im CYP-Metabolismus auf die Metabolitenverteilung in diesen Szenarien auswirken. Die hauptsächlich am Metabolismus beteiligten CYP-Enzyme liegen alle auf autosomalen Chromosomen, sodass keine Geschlechterunterschiede durch Allelvariationen erwartet werden. Trotzdem können aufgrund von Unterschieden in der Regulierung ihrer Expression und der Aktivität, die wahrscheinlich auf endogene hormonelle Einflüsse zurückzuführen sind, geschlechtsspezifische Unterschiede auftreten [121, 122]. Die zu erwartenden geschlechtsspezifischen Unterschiede im Metabolismus sind jedoch gering im Vergleich zu den zu erwartenden Unterschieden durch verschiedene pharmakokinetische Phänotypen. Beispielsweise sind für das CYP2D6-Gen 63 verschiedene Allelvarianten bekannt. Gleichzeitig ist CYP2D6 eines der Enzyme, die am Metabolismus der meisten Xenobiotika beteiligt sind (rund 25 %), wovon rund 50 % von Polymorphismen beeinträchtigt werden [123]. Auch die Umwandlung von Clomifen zu HC wird mitunter von CYP2D6 katalysiert und der Metabolismus von den verschiedenen Phänotypen beeinflusst [59, 88].

Bei der bisherigen Gesamtanzahl der Probanden und der statistischen Verteilung der verschiedenen Phänotypen in Mitteleuropa (5–10 % ultraschnell Metabolisierende, 65–80 % schnell Metabolisierende, 10–15 % intermediär Metabolisierende und 5–10 % langsam Metabolisierende) [124, 125] ist es möglich, dass bereits alle Phänotypen in einer der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Studien berücksichtigt wurden. Daher ist es valide anzunehmen, dass sich die Methode auf alle Phänotypen übertragen lässt. Bevor das HC-Metabolitenprofil jedoch in der Dopinganalytik zur Abgrenzung zwischen Kontamination und Doping herangezogen werden kann, sollte anhand einer umfassenderen Studie, die die Phänotypen der Proband*innen berücksichtigt, überprüft werden, ob sich

(Z)-3'-HC als Dopingmarker für alle Phänotypen eignet. Im Rahmen einer solchen Studie kann gleichzeitig untersucht werden, ob z. B. durch ein Metaboliten-Verhältnis von (Z)-3'-HC zu (Z)-Clomifen Rückschlüsse auf den Einnahmezeitpunkt gezogen werden können.

Im zweiten Kontaminationsszenario (vierte Publikation) wurde das Ausscheidungsprofil von Zilpaterol in Mikrodosierung untersucht. Zilpaterol ist als wachstumsförderndes Mittel in Ländern wie den USA, Kanada, Mexiko, Brasilien und Südafrika in der fleischproduzierenden Industrie zugelassen. Es wird dort v. a. in der sogenannten Endmastphase von Rindern mit einer Auswaschzeit von nur 72 h vor dem Schlachten angewendet. Rückstände von Zilpaterol in Rindfleisch sind deshalb ein bekanntes Phänomen. Daher hat die WADA im Jahr 2021 ein MRL von 5 ng/mL für Zilpaterol festgelegt. Ab diesem Schwellwert muss eine Dopingprobe als AAF und bei Nachweisen unter diesem Schwellwert als ATF gemeldet werden.

Mit zwei AAFs im Jahr 2021 wird Zilpaterol vergleichsweise selten in Dopingkontrollproben detektiert. Die Anzahl der ATFs mit sechs im selben Jahr weist jedoch darauf hin, dass die Kontaminationsproblematik durchaus ernst zu nehmen ist [83]. Daher wurde eine Studie durchgeführt, in der die Aufnahme von mit Zilpaterol kontaminiertem Fleisch unterhalb oder in Höhe der zulässigen täglichen Aufnahmemenge für Menschen von 0,04 µg/kg Körpergewicht simuliert wurde. Gesunde männliche Freiwillige erhielten eine oder mehrere orale Dosen von 0,5 µg oder 3 µg Zilpaterol. Sowohl vor als auch nach der Verabreichung wurden Urinproben gesammelt und analysiert.

In dieser Studie konnten keine Metaboliten detektiert werden. Zilpaterol wurde hauptsächlich unverändert ausgeschieden. Bei einem von fünf Studienteilnehmern wurde nach der Einnahme von 3 µg Zilpaterol an fünf aufeinanderfolgenden Tagen das MRL von 5 ng/mL einmal überschritten. Ein Proband zeigte bereits nach ein- und zweimaliger Einnahme von 3 µg Werte nahe 5 ng/mL, blieb jedoch insgesamt unter dem MRL. Um 3 µg Zilpaterol aufzunehmen, müsste z. B. ein 300-g-Rindersteak den von der FDA festgelegten Rückstandshöchstgehalt von 10 µg/kg enthalten. Es ist daher zwar unwahrscheinlich, aber dennoch möglich, dass der Verzehr von kontaminiertem Fleisch ein AAF für Zilpaterol bewirkt.

Da im Fall von Zilpaterol keine Metaboliten detektiert werden konnten und auch die Ausscheidung der beiden Enantiomere simultan verläuft, war es im Rahmen dieser Studie nicht möglich, über Metabolitenprofile eine Unterscheidungsmethode zwischen Kontamination und Doping zu entwickeln. Das Kontaminationsszenario wurde im Rahmen der vorgestellten Studie allerdings nur simuliert. Daher sollte weiterhin untersucht werden,

ob die Zilpaterol-Rückstände im Rindfleisch ebenfalls in racemischer Form und ohne weitere Transformationsprodukte vorliegen. Dazu wäre es sinnvoll, zilpaterolhaltige Fleischproben aus Lebensmittelüberwachungsämtern der betreffenden Länder mit der entwickelten enantioselektiven Trennmethode zu analysieren. Ergänzend dazu wäre eine kontrollierte Verzehrstudie mit Fleisch aufschlussreich, das Zilpaterol-Rückstände enthält.

Es ist denkbar, dass es analytisch auch künftig nicht möglich sein wird, zwischen der unwissentlichen Aufnahme von Zilpaterol über kontaminierte Lebensmittel und wissentlichem Doping mit der Substanz zu unterscheiden. In diesem Fall erscheint das Anheben des MRLs für Zilpaterol zunächst als gangbare Option. Jedoch kann Zilpaterol in höheren Dosierungen starke Nebenwirkungen auslösen [98]. Es wäre daher für die WADA nur schwer vertretbar, das MRL zu erhöhen, da sie damit ein wesentliches Ziel der Anti-Doping-Arbeit unterwandern würde: die Gesundheit der Athlet*innen zu schützen.

In ebendiese Richtung argumentiert auch eine Studie von Zelenkin *et al.* aus dem Jahr 2023. Darin wird sogar der Rückstandshöchstgehalt von 0,5 µg/kg Muskelfleisch als gesundheitlich problematisch eingeschätzt, der vom Gemeinsamen FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, JECFA) vorgeschlagen wird [112, 126]. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass die derzeitige Vorgabe der FDA in den USA mit 10 µg/kg noch 20-mal höher liegt [100]. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Ausscheidungsstudien mit 0,5 µg Zilpaterol lassen den Schluss zu, dass keine auffälligen Dopingproben mehr zu erwarten sind, falls der von Zelenkin *et al.* vorgeschlagene Rückstandshöchstgehalt von 0,1 µg/kg oder niedriger weltweit umgesetzt würde [126]. Da jedoch bereits der von der JECFA vorgeschlagene Rückstandshöchstgehalt von vielen Ländern nicht umgesetzt wird, müssen alternative Strategien entwickelt werden, um Athlet*innen vor unbeabsichtigtem Doping mit Zilpaterol zu schützen.

Ein Ansatz, der im Fall von Zilpaterol-Kontaminationen sowie der meisten weiteren Expositionsszenarien von Dopingsubstanzen in Mikrodosierung helfen kann, wurde von Thevis *et al.* vorgeschlagen [127, 128]: Ein zu den regulären Dopingkontrollen komplementär durchgeführtes Dopingkontrollsystem, das auf getrockneten Blutstropfen (*dried blood spots*, DBS) basiert, kann dazu beitragen, Doping von Kontaminationen zu unterscheiden. Die DBS-Proben sollen dabei z. B. alle zwei Wochen abgenommen und langfristig gelagert werden. Eine Analyse soll nur dann stattfinden, wenn eine Dopingprobe positiv getestet wurde, die Konzentration der Dopingsubstanz aber so niedrig ist, dass eine Kontamination in Frage kommt.

Durch die Analyse der engmaschig abgenommenen DBS-Proben kann besser abgeschätzt werden, ob eine Kontamination vorgelegen hat [128]. DBS stellen hier eine vielversprechende Probenmatrix dar, weil die Probenahme minimalinvasiv ist und DBS kostengünstig sowie platzsparend gelagert werden können. In der Dopingkontrollanalytik sind DBS erst seit 2021 eine offizielle Probenmatrix [129]. Schon jetzt ist aber ein Großteil der verbotenen Substanzen durch die DBS-Analytik nachweisbar [130, 131]. Die Voraussetzungen für die Implementierung einer solchen Teststrategie sind demnach bereits gegeben. Jedoch ist es auch nach Implementierung einer solchen Teststrategie weiterhin nötig, das Exposom von Athlet*innen weiter zu erforschen: In der Entscheidungsfindung in Anti-Doping-Verfahren muss berücksichtigt werden, ob Kontaminationen mit der jeweiligen Substanz denkbar sind und ob Mikrodosierungen bereits eine Dopingwirkung hervorrufen können.

Im Ergebnis unterstreicht die hier vorgestellte Dissertation, wie ungemein individuell das Exposom von Athlet*innen ist. Es existiert keine Einheitslösung, um analytisch zwischen willentlichem Doping und der unbeabsichtigten Aufnahme von Dopingsubstanzen über Lebensmittel zu unterscheiden. Diese Dissertation leistet daher einen wichtigen Beitrag für den Fairnessgedanken im Sport: Ihre Forschungsergebnisse können „saubere“ Athlet*innen künftig vor unrechtmäßigen Dopingsperren infolge eines AAFs durch Clomifen- und Zilpaterol-kontaminierte Lebensmittel bewahren.

10 Literaturverzeichnis für Kapitel 1–4 und 9

1. [WADA] World Anti-Doping Agency. *World Anti-Doping Code*. **2021**. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_wada_code.pdf. Accessed: 2023/06/28.
2. Thevis M, Kuuranne T, Fedoruk M, Geyer H. Sports drug testing and the athletes' exposome. *Drug Test Anal*. **2021**; 13:1814-1821. <https://doi.org/10.1002/dta.3187>.
3. Chan DKC, Tang TCW, Yung PS-H, Gucciardi DF, Hagger MS. Is unintentional doping real, or just an excuse? *Br J Sports Med*. **2019**; 53:978-979. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2017-097614>.
4. Geyer H, Thevis M, Schänzer W. Dopinganalytik und Forschung - die Zukunft der Dopingbekämpfung. *pharmActuel - Doping im Sport*. Schweizerischer Apothekenverband, Bern, **2015**.
5. [WADA] World Anti-Doping Agency. *The Prohibited List*. **2004-2023**. <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list-documents>. Accessed: 2023/06/28.
6. Urom SMOC. Egg production performance of naturally mated Nigerian indigenous hens treated with clomiphene citrate (CLOMID®). *Niger J Agric Food Environ*. **2016**; 12:185-187.
7. Guddat S, Görgens C, Geyer H, Pfanner T, Thevis M. Clomiphene - targeting of the unchanged drug results in unusual prolonged detection windows in urine. In: Thevis M, Geyer H, Mareck U (Eds.) *Recent Advances In Doping Analysis*. Sportverlag Strauß, Hellenthal, **2018**; pp. 118-121.
8. [WADA] World Anti-Doping Agency. *WADA Technical Letter TL23 - Minimum Reporting Level for Certain Substances Known to be Potential Meat Contaminants*. **2021**. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/tl23_growth_promoters_eng_2021_0.pdf. Accessed: 2023/06/28.
9. Dreyer B. Ehrenplätze für Dopinghersteller—Die (Kranz-) Agone und ihre Bedeutung im Licht neuer Ausgrabungen von Magnesia am Mäander. *Vir doctus Anatolicus*. **2016**; 291-302.
10. Thevis M. History of Sports Drug Testing. In: Desiderio DM, Nibbering NMM (Eds.) *Mass Spectrometry in Sports Drug Testing*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, **2010**; pp. 1-43.
11. Conti AA. Doping in Sports in Ancient and Recent Times. *Medicina nei secoli. J Hist Med Med Humanit*. **2010**; 22:181-190.
12. Thevis M, Sigmund G, Geyer H, Schänzer W. Stimulants and Doping in Sport. *Endocrinol Metab Clin N Am*. **2010**; 39:89-105. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2009.10.011>.
13. Thevis M, Kuuranne T, Geyer H. Annual banned-substance review: Analytical approaches in human sports drug testing 2020/2021. *Drug Test Anal*. **2022**; 14:7-30. <https://doi.org/10.1002/dta.3199>.
14. Thevis M, Kuuranne T, Geyer H. Annual banned-substance review—Analytical approaches in human sports drug testing 2021/2022—. *Drug Test Anal*. **2023**; 15:5-26. <https://doi.org/10.1002/dta.3408>.
15. Thevis M, Kuuranne T, Geyer H. Annual banned-substance review – Analytical approaches in human sports drug testing. *Drug Test Anal*. **2020**; 12:7-26. <https://doi.org/10.1002/dta.2735>.
16. Lander GD. The micro-detection of alkaloids. *Analyst*. **1930**; 55:474-476. <https://doi.org/10.1039/AN9305500474>.
17. Ljungqvist A. Brief History of Anti-Doping. In: Pitsiladis Y, Rabin O (Eds.) *Acute Topics in Anti-Doping*. Karger, Basel, **2017**; pp. 1-20.
18. [EC] European Commission, Directorate-General for Education, Youth, Sport and Culture. *Study on doping prevention - A map of legal, regulatory and prevention practice provisions in EU 28*. **2015**. <https://doi.org/10.2766/86776>.

19. **Schänzer W.** Doping im Sport. In: Graf C (Ed.) *Lehrbuch der Sportmedizin*. Deutscher Ärzteverlag, Köln, 2012.
20. **[WADA]** World Anti-Doping Agency. *The International Standard for Laboratories*. 2021. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_2021.pdf. Accessed: 2023/06/28.
21. **[WADA]** World Anti-Doping Agency. *WADA Technical Document TD2022MRPL on Minimum Required Performance Levels and Applicable Minimum Reporting Levels for Non-Threshold Substances analyzed by Mass Spectrometry Analytical Methods*. 2022. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2022mrpl_v1.0_final_eng.pdf. Accessed: 2023/06/28.
22. **[WADA]** World Anti-Doping Agency. *WADA Technical Document TD2019MRPL on Minimum Required Performance Levels for Detection and Identification of Non-Threshold Substances*. 2019. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl_eng.pdf. Accessed: 2023/06/28.
23. **Thevis M**, Gorgens C, Guddat S, Thomas A, Geyer H. Mass spectrometry in sports drug testing- Analytical approaches and the athletes' exposome. *Scand J Med Sci Sports*. 2022. <https://doi.org/10.1111/sms.14228>.
24. **Thevis M**, Walpurgis K, Thomas A. Analytical Approaches in Human Sports Drug Testing: Recent Advances, Challenges, and Solutions. *Anal Chem*. 2020; 92:506-523. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04639>.
25. **[ITA]** The International Testing Agency. *IOC reanalysis programme London 2012*. 2020. <https://ita.sport/resource/ita-london-2012-sample-re-analysis-report/>. Accessed: 2023/06/28.
26. **Helmlin H-J**, Mürner A, Steiner S, et al. Detection of the diuretic hydrochlorothiazide in a doping control urine sample as the result of a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) tablet contamination. *Forensic Sci Int*. 2016; 267:166-172. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.08.029>.
27. **Kintz P**, Gheddar L, Raul J-S. Adverse analytical finding due to red blood cells transfusion: A rare case involving the diuretic dorzolamide. *Drug Test Anal*. 2022; 14:1785-1790. <https://doi.org/10.1002/dta.3342>.
28. **Thevis M**, Geyer L, Geyer H, et al. Adverse analytical findings with clenbuterol among U-17 soccer players attributed to food contamination issues. *Drug Test Anal*. 2013; 5:372-376. <https://doi.org/10.1002/dta.1471>.
29. **Guddat S**, Fussboller G, Geyer H, et al. Clenbuterol - regional food contamination a possible source for inadvertent doping in sports. *Drug Test Anal*. 2012; 4:534-538. <https://doi.org/10.1002/dta.1330>.
30. **Wild CP**. Complementing the Genome with an "Exposome": The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14:1847-1850. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-05-0456>.
31. **Daughton CG**. Illicit Drugs: Contaminants in the Environment and Utility in Forensic Epidemiology. In: Whitacre DM (Ed.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 210*. Springer New York, New York, NY, 2011; pp. 59-110.
32. **Thevis M**, Opfermann G, Schänzer W. Urinary Concentrations of Morphine and Codeine After Consumption of Poppy Seeds. *J Anal Toxicol*. 2003; 27:53-56. <https://doi.org/10.1093/jat/27.1.53>.
33. **Chen W**, Cheng X, Ma Y, Chen N. Foodborne doping and supervision in sports. *Food Sci Hum Wellness*. 2023; 12:1925-1936. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2023.03.001>.
34. **Jędrejko K**, Lazur J, Muszyńska B. Risk Associated with the Use of Selected Ingredients in Food Supplements. *Chem Biodiversity*. 2021; 18:e2000686. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000686>.
35. **Rangelov Kozhuharov V**, Ivanov K, Ivanova S. Higenamine in Plants as a Source of Unintentional Doping. *Plants*. 2022; 11:354. <https://doi.org/10.3390/plants11030354>.
36. **Walpurgis K**, Thomas A, Geyer H, Mareck U, Thevis M. Dietary Supplement and Food Contaminations and Their Implications for Doping Controls. *Foods*. 2020; 9:1012. <https://doi.org/10.3390/foods9081012>.

37. **Hülsemann F**, Fußhöller G, Lehn C, Thevis M. Excretion of 19-norandrosterone after consumption of boar meat. *Drug Test Anal.* **2020**; 12:1581-1586. <https://doi.org/10.1002/dta.2958>.
38. **Le Bizec B**, Gaudin I, Monteau F, *et al.* Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profiles of nandrolone metabolites. I. Mass spectrometric detection and quantification of 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone in human urine. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2000**; 14:1058-1065. [https://doi.org/10.1002/1097-0231\(20000630\)14:12<1058::AID-RCM991>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0231(20000630)14:12<1058::AID-RCM991>3.0.CO;2-7).
39. **Stephany RW**. Hormonal Growth Promoting Agents in Food Producing Animals. In: Thieme D, Hemmersbach P (Eds.) *Doping in Sports: Biochemical Principles, Effects and Analysis*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2010**; pp. 355-367.
40. **Peters RJB**, Stolker AAM, Mol JGJ, *et al.* Screening in veterinary drug analysis and sports doping control based on full-scan, accurate-mass spectrometry. *Trends Anal Chem.* **2010**; 29:1250-1268. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.012>.
41. **Guddat S**, Görgens C, Sobolevsky T, Thevis M. Meldonium residues in milk: A possible scenario for inadvertent doping in sports? *Drug Test Anal.* **2021**; 13:1906-1910. <https://doi.org/10.1002/dta.3145>.
42. **Temerdashev A**, Azaryan A, Dmitrieva E. Meldonium determination in milk and meat through UHPLC-HRMS. *Heliyon.* **2020**; 6:e04771. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04771>.
43. **McGinnis CH**, Wallace LD. The Effect of Clomiphene Citrate in Chickens: 1. Androgenic and Estrogenic Activity. *Poult Sci.* **1971**; 50:1475-1480. <https://doi.org/10.3382/ps.0501475>.
44. **McGinnis CH, Jr.**, Wallace LD. The effect of clomiphene citrate in chickens. 2. Gonadotropic activity. *Poult Sci.* **1973**; 52:712-718. <https://doi.org/10.3382/ps.0520712>.
45. **Robinson B**, Shafir Z, Perek M, Snapir N. The effect of clomiphene-citrate on broody turkey hens. *Poult Sci.* **1984**; 63:2268-2270. <https://doi.org/10.3382/ps.0632268>.
46. **[WADA]** World Anti-Doping Agency. *WADA Technical Document TD2022_DL on Decision Limits for the Confirmatory Quantification of Exogenous Threshold Substances by Chromatography-based Analytical Methods.* **2022**. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/td2022dl_v1.0_final_eng_0.pdf. Accessed: 2023/06/28.
47. **Thevis M**, Fußhöller G, Schänzer W. Zeranor: doping offence or mycotoxin? A case-related study. *Drug Test Anal.* **2011**; 3:777-783. <https://doi.org/10.1002/dta.352>.
48. **[WADA]** World Anti-Doping Agency. *WADA Technical Letter TL04 - Analysis and Reporting of Zeranor.* **2021**. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/tl04_zeranor_eng_2021_1.pdf. Accessed: 2023/06/28.
49. **Apréa C**, Sciarra G, Bozzi N. Analytical Methods for the Determination of Urinary 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 2-Methyl-4-Chlorophenoxyacetic Acid in Occupationally Exposed Subjects and in the General Population. *J Anal Toxicol.* **1997**; 21:262-267. <https://doi.org/10.1093/jat/21.4.262>.
50. **Rubio A**, Görgens C, Krug O, *et al.* Chromatographic-mass spectrometric analysis of the urinary metabolite profile of chlorphenesin observed after dermal application of chlorphenesin-containing sunscreen. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2021**; 35:e9183. <https://doi.org/10.1002/rcm.9183>.
51. **[WADA]** World Anti-Doping Agency. *WADA Technical Letter TL01 - Meclofenoxate.* **2022**. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/tl01_meclofenoxate_v4.0.pdf. Accessed: 2023/06/28.
52. **Rubio A**, Thomas A, Euler L, *et al.* Investigations into Annona fruit consumption as a potential source of dietary higenamine intake in the context of sports drug testing. *Submitted for publication in Drug Test Anal.* **2023**.
53. **Wätjen W**, Fritsche E. Fremdstoffmetabolismus. In: Vohr H-W (Ed.) *Toxikologie*. Wiley-VCH, Weinheim, **2010**; pp. 43-74.
54. **Thieme D**, Büttner A. Doping und Dopinganalytik. *Rechtsmedizin.* **2015**; 25:323-336. <https://doi.org/10.1007/s00194-015-0033-6>.

55. Schänzer W, Delahaut P, Geyer H, Machnik M, Horning S. Long-term detection and identification of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B*. **1996**; 687:93-108. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00187-9).
56. Wagener F, Guddat S, Görgens C, *et al.* Investigations into the elimination profiles and metabolite ratios of micro-dosed selective androgen receptor modulator LGD-4033 for doping control purposes. *Anal Bioanal Chem*. **2021**. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03740-7>.
57. Jeong S-H, Jang J-H, Cho H-Y, Lee Y-B. Pharmacokinetic comparison with different assays for simultaneous determination of cis-, trans-cefprozil diastereomers in human plasma. *J Pharm Anal*. **2021**; 11:351-363. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.07.001>.
58. Yan J-h, Hubbard JW, McKay G, Midha KK. Stereoselective and simultaneous measurement of cis- and trans-isomers of doxepin and N-desmethyldoxepin in plasma or urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. **1997**; 691:131-138. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00451-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00451-3).
59. Mürdter TE, Kerb R, Turpeinen M, *et al.* Genetic polymorphism of cytochrome P450 2D6 determines oestrogen receptor activity of the major infertility drug clomiphene via its active metabolites. *Hum Mol Gen*. **2011**; 21:1145-1154. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr543>.
60. de Vos D, Slee PH, Stevenson D, Briggs RJ. Serum elimination half-life of tamoxifen and its metabolites in patients with advanced breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. **1992**; 31:76-78. <https://doi.org/10.1007/bf00695998>.
61. Coelho MM, Fernandes C, Remião F, Tiritan ME. Enantioselectivity in Drug Pharmacokinetics and Toxicity: Pharmacological Relevance and Analytical Methods. *Molecules*. **2021**; 26. <https://doi.org/10.3390/molecules26113113>.
62. Smith SW. Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different. *Toxicol Sci*. **2009**; 110:4-30. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp097>.
63. Thomas A, Thevis M. Stereoisomers in sports drug testing: Analytical strategies and applications. *J Chromatogr A*. **2022**; 1674:463154. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463154>.
64. Feng P, Liu Z. Complex gene expansion of the CYP2D gene subfamily. *Ecol Evol*. **2018**; 8:11022-11030. <https://doi.org/10.1002/ece3.4568>.
65. Machala M, Souček P, Neča J, *et al.* Inter-species comparisons of hepatic cytochrome P450 enzyme levels in male ruminants. *Arch Toxicol*. **2003**; 77:555-560. <https://doi.org/10.1007/s00204-003-0477-4>.
66. Hagedorn H-W, Meiser H, Zankl H, Schulz R. The isomeric metabolites of doxepin in equine serum and urine. *J Pharm Biomed Anal*. **2002**; 29:317-323. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00069-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00069-9).
67. Khalil WF, Saitoh T, Shimoda M, Kokue E. In vitro cytochrome P450-mediated hepatic activities for five substrates in specific pathogen free chickens. *J Vet Pharmacol Ther*. **2001**; 24:343-348. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2001.00349.x>.
68. Nandez S. Drug Metabolism in Veterinary Pharmacology. *J Clin Exp Pharmacol*. **2021**; 11:e162. <https://doi.org/10.35248/2161-1459.21.11.e162>.
69. Schelstraete W, Clerck LD, Govaert E, *et al.* Characterization of Porcine Hepatic and Intestinal Drug Metabolizing CYP450: Comparison with Human Orthologues from A Quantitative, Activity and Selectivity Perspective. *Sci Rep*. **2019**; 9:9233. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45212-0>.
70. Smith DJ. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock. *J Anim Sci*. **1998**; 76:173-194. <https://doi.org/10.2527/1998.761173x>.
71. van't Klooster GAE, Blaauboer BJ, Noordhoek J, van Miert ASJPAM. Cytochrome P450 induction and metabolism of alkoxyresorufins, ethylmorphine and testosterone in cultured hepatocytes from goats, sheep and cattle. *Biochem Pharmacol*. **1993**; 46:1781-1790. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90583-I](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90583-I).
72. He G, Sheng L, Zhang J, *et al.* Enantiomeric analysis of clenbuterol in Chinese people by LC-MS/MS to distinguish doping abuse from meat contamination. *Bioanalysis*. **2020**; 12:783-790. <https://doi.org/10.4155/bio-2020-0003>.

73. **Parr MK**, Blokland MH, Liebetrau F, *et al.* Distinction of clenbuterol intake from drug or contaminated food of animal origin in a controlled administration trial - the potential of enantiomeric separation for doping control analysis. *Food Addit Contam Part A*. **2017**; 34:525-535. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1242169>.
74. **Thevis M**, Thomas A, Beuck S, Butch A, Dvorak J, Schanzer W. Does the analysis of the enantiomeric composition of clenbuterol in human urine enable the differentiation of illicit clenbuterol administration from food contamination in sports drug testing? *Rapid Commun Mass Spectrom*. **2013**; 27:507-512. <https://doi.org/10.1002/rcm.6485>.
75. **Adashi EY**. Clomiphene citrate: mechanism(s) and site(s) of action--a hypothesis revisited. *Fertil Steril*. **1984**; 42:331-344. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)48069-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48069-6).
76. **Brown J**, Farquhar C. Clomiphene and other antioestrogens for ovulation induction in polycystic ovarian syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. **2016**; CD002249. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002249.pub5>.
77. **Kousta E**, White DM, Franks S. Modern use of clomiphene citrate in induction of ovulation. *Hum Reprod Update*. **1997**; 3:359-365. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.4.359>.
78. **Huijben M**, Lock MTWT, de Kemp VF, Beck JJH, De Kort LMO, van Breda HMK. Clomiphene citrate: A potential alternative for testosterone therapy in hypogonadal males. *Endocrinol Diabetes Metab*. **2023**; e416. <https://doi.org/10.1002/edm2.416>.
79. **Wheeler KM**, Smith RP, Kumar RA, Setia S, Costabile RA, Kavoussi PK. A Comparison of Secondary Polycythemia in Hypogonadal Men Treated with Clomiphene Citrate versus Testosterone Replacement: A Multi-Institutional Study. *J Urol*. **2017**; 197:1127-1131. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.10.068>.
80. **Bickelman C**, Ferries L, Eaton RP. Impotence related to anabolic steroid use in a body builder. Response to clomiphene citrate. *West J Med*. **1995**; 162:158-160.
81. **Handelsman DJ**. Clinical review: The rationale for banning human chorionic gonadotropin and estrogen blockers in sport. *J Clin Endocrinol Metab*. **2006**; 91:1646-1653. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2569>.
82. **Handelsman DJ**. Indirect androgen doping by oestrogen blockade in sports. *Br J Pharmacol*. **2008**; 154:598-605. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.150>.
83. **[WADA]** World Anti-Doping Agency. *Anti-Doping Testing Figures Report*. **2021**. <https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/anti-doping-testing-figures-report>. Accessed: 2023/06/28.
84. **Miller GD**, Moore C, Nair V, *et al.* Hypothalamic-Pituitary-Testicular Axis Effects and Urinary Detection Following Clomiphene Administration in Males. *J Clin Endocrinol Metab*. **2018**; 104:906-914. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01159>.
85. **Kroner P**, Heinkele G, Kerb R, Igel S, Schwab M, Mürdter TE. Stereoselective quantification of phase 1 and 2 metabolites of clomiphene in human plasma and urine. *Talanta*. **2021**; 221:121658. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121658>.
86. **Mazzarino M**, Biava M, de la Torre X, Fiacco I, Botre F. Characterization of the biotransformation pathways of clomiphene, tamoxifen and toremifene as assessed by LC-MS/(MS) following in vitro and excretion studies. *Anal Bioanal Chem*. **2013**; 405:5467-5487. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6961-7>.
87. **Mazzarino M**, Fiacco I, de la Torre X, Botre F. A mass spectrometric approach for the study of the metabolism of clomiphene, tamoxifen and toremifene by liquid chromatography time-of-flight spectroscopy. *Eur J Mass Spectrom*. **2008**; 14:171-180. <https://doi.org/10.1255/ejms.921>.
88. **Kim M-J**, Byeon J-Y, Kim Y-H, *et al.* Effect of the CYP2D6*10 allele on the pharmacokinetics of clomiphene and its active metabolites. *Arch Pharmacol Res*. **2018**; 41:347-353. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-1005-7>.

89. **Oueslati F**, Maatki M, Osman Z, Loueslati Z. Identification by LC-ESI-MS/MS of new clomifene metabolites in urine. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U (Eds.) *Recent Advances In Doping Analysis*. Sport und Buch Strauß, Köln, **2008**; pp. 333-336.
90. **Vitoriano B**, de la Torre X. Study of Clomiphene metabolism by LC/MS/MS. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U (Eds.) *Recent Advances In Doping Analysis*. Sport und Buch Strauß, Köln, **2007**; pp. 113-122.
91. **Vitoriano BC**, Carvalho LCR, Estevão MS, Sekera MH, Marques MMB. A Simple Route Toward New Clomiphene Metabolites. *Synlett*. **2010**; 2010:753-756.
92. **Kovar C**, Kovar L, Rüdeshheim S, *et al.* Prediction of Drug-Drug-Gene Interaction Scenarios of (E)-Clomiphene and Its Metabolites Using Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *Pharmaceutics*. **2022**; 14:2604.
93. **Meijer T**, Essers ML, Kaklamanos G, Sterk SS, van Ginkel LA. Determination and confirmation of selective estrogen receptor modulators (SERMs), anti-estrogens and aromatase inhibitors in bovine and porcine urine using UHPLC-MS/MS. *Food Addit Contam Part A*. **2017**; 34:641-651. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1274830>.
94. **Fiems LO**. Effect of beta-adrenergic agonists in animal production and their mode of action. *Annales de zootechnie*. **1987**; 36:271-290.
95. **Kern C**, Meyer T, Droux S, Schollmeyer D, Miculka C. Synthesis and pharmacological characterization of beta2-adrenergic agonist enantiomers: zilpaterol. *J Med Chem*. **2009**; 52:1773-1777. <https://doi.org/10.1021/jm801211c>.
96. **Machin J**, Brewer K, Morales-Briceno A, Fenger C, Maylin G, Tobin T. Sporadic worldwide “clusters” of feed driven Zilpaterol identifications in racing horses: a review and analysis. *Ir Vet J*. **2022**; 75:11. <https://doi.org/10.1186/s13620-022-00215-8>.
97. **Shelver WL**, Thorson JF, Hammer CJ, Smith DJ. Depletion of Urinary Zilpaterol Residues in Horses As Measured by ELISA and UPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem*. **2010**; 58:4077-4083. <https://doi.org/10.1021/jf904253t>.
98. **[EFSA]**, Arcella D, Baert K, *et al.* Review of proposed MRLs, safety evaluation of products obtained from animals treated with zilpaterol and evaluation of the effects of zilpaterol on animal health and welfare. *EFSA J*. **2016**; 14:e04579. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4579>.
99. **Forum Professional Muscle**. *Zilmax*. **2013**. <https://www.professionalmuscle.com/forums/index.php?threads/zilmax.105559/>. Accessed: 2023/06/29.
100. **[FDA]** Food and Drug Organization. *New Animal Drugs; Updating Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food*. **2019**. <https://www.federalregister.gov/d/2019-14098>. Accessed: 2023/06/29.
101. **Chakrabarty S**, Shelver WL, Smith DJ. Electrospray ionization rapid screening sans liquid chromatography column: A sensitive method for detection and quantification of chemicals in animal tissues and urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **2020**; 34:e8876. <https://doi.org/10.1002/rcm.8876>.
102. **Chakrabarty S**, Shelver WL, Smith DJ. Electrospray Ionization Inlet Tandem Mass Spectrometry: A Hyphenated Method for the Sensitive Determination of Chemicals in Animal Tissues and Body Fluids. *J Am Soc Mass Spectrom*. **2021**; 32:14-20. <https://doi.org/10.1021/jasms.9b00114>.
103. **Dolores-Hernández M**, Morales-Hipólito EA, Villaseñor A, López-Arellano R. Determination of zilpaterol in a residue depletion study using LC-MS/MS in cattle plasma, muscle, liver and kidney. *Food Chem*. **2022**; 382:132287. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132287>.
104. **Kim J-Y**, Chae Y-S, Moon J-A, Baek S-H. Establishment of a Method for Analyzing the Zilpaterol Residue in Beef Using Tandem Mass Spectrometry. *Food Sci Technol Res*. **2014**; 20:1165-1171. <https://doi.org/10.3136/fstr.20.1165>.
105. **Kyunghun J**, Md Akil H, Hae-Chul P, Seong-Wan S, Jeongwoo K. Simultaneous determination of β -agonists and monitoring in bovine tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Acta Vet Brno*. **2018**; 87. <https://doi.org/10.2754/avb201887010047>.

106. Li T, Cao J, Li Z, Wang X, He P. Broad screening and identification of β -agonists in feed and animal body fluid and tissues using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry combined with spectra library search. *Food Chem.* **2016**; 192:188-196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.104>.
107. Sung IK, Park SJ, Kang K, Kim MY, Cho S. Development and Application of a Method for Rapid and Simultaneous Determination of Three β -agonists (Clenbuterol, Ractopamine, and Zilpaterol) using Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *Korean J Food Sci Anim Resor.* **2015**; 35:121-129. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.1.121>.
108. [JECFA] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Residue evaluation of certain veterinary drugs – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 78th Meeting 2013*. Monographs, 15. **2014**. <https://www.fao.org/3/i3745e/i3745e.pdf>. Accessed: 2023/06/29.
109. Cheng T-YD, Shelver WL, Hong C-C, et al. Urinary Excretion of the β -Adrenergic Feed Additives Ractopamine and Zilpaterol in Breast and Lung Cancer Patients. *J Agric Food Chem.* **2016**; 64:7632-7639. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02723>.
110. Zubair M, Sajid S. Effects of Clomiphene citrate on reproductive system of birds and mammals. *Vet Sci Res Rev.* **2015**; 1.
111. [EMA] European Medicines Agency. *VICH GL49: Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies*. EMEA/CVMP/VICH/463202/2009. **2016**. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl49-studies-evaluate-metabolism-residue-kinetics-veterinary-drugs-food-producing-animals_en.pdf. Accessed: 2023/06/29.
112. [JECFA] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Zilpaterol hydrochloride*. In: *Residue evaluation of certain veterinary drugs – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 81st Meeting 2015*. **2016**. 147–192. <https://www.fao.org/3/bp390e/bp390e.pdf>. Accessed: 2023/06/29.
113. Statistisches Bundesamt. *Betriebe mit Legehennenhaltung, Erzeugte Eier, Legeleistung: Bundesländer, Jahre, Haltungsformen, Größenklassen der Hennenhaltungsplätze*. **2022**. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=abruftabelleBearbeiten&levelindex=1&levelid=1687962960786&auswahloperation=abruftabelleAuspraegungAuswaehlen&auswahlverzeichnis=ordnungsstruktur&auswahlziel=werteabruf&code=41323-0004&auswahltext=&werteabruf=starten#abreadcrumb>. Accessed: 2023/06/28.
114. Wilfried Brade GF, Lars Schrader. *Legehuhnzucht und Eiererzeugung - Empfehlungen für die Praxis. Landbauforschung: Sonderheft*. Johann Heinrich von Thünen-Institut, Braunschweig, **2008**.
115. Windhorst H-W. The forgotten continent - patterns and dynamics of the African egg industry: Part 1: Laying hen inventory and egg production. *Zootecnica international.* **2020**; 42:24-27.
116. Mengesha Y, Kebede E, Getachew A. Review of chicken productive and reproductive performance and its challenges in Ethiopia. *All Life.* **2022**; 15:118-125. <https://doi.org/10.1080/26895293.2021.2024894>.
117. Ajayi FO. Nigerian Indigenous Chicken: A Valuable Genetic Resource for Meat and Egg Production. *Asian J Poult Sci.* **2010**; 4:164-172. <https://10.3923/ajpsaj.2010.164.172>.
118. [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Chicken Genetic Resources used in Smallholder Production Systems and Opportunities for their Development*. By Sørensen P. FAO Smallholder Poultry Production Paper No. 5. **2010**. <https://www.fao.org/3/al675e/al675e.pdf>. Accessed: 2023/06/29.
119. Korzekwa K. Enzyme Kinetics of Oxidative Metabolism: Cytochromes P450. In: Nagar S, Argikar UA, Tweedie DJ (Eds.) *Enzyme Kinetics in Drug Metabolism: Fundamentals and Applications*. Humana Press, Totowa, NJ, **2014**; pp. 149-166.
120. Torres CL, de Oliveira FAG, Jooris LF, Padilha MC, Pereira HMG. The presence of doping agents in dietary supplements: A glimpse into the Brazilian situation. *Drug Test Anal.* **2023**. <https://doi.org/10.1002/dta.3517>.

121. **Meibohm B**, Beierle I, Derendorf H. How Important Are Gender Differences in Pharmacokinetics? *Clin Pharmacokin.* **2002**; 41:329-342. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241050-00002>.
122. **Smith G**, Stubbins MJ, Harries LW, Wolf CR. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica.* **1998**; 28:1129-1165. <https://doi.org/10.1080/004982598238868>.
123. **Ingelman-Sundberg M**. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* **2005**; 5:6-13. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500285>.
124. **Griese EU**, Zanger UM, Brudermanns U, *et al.* Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics.* **1998**; 8:15-26. <https://doi.org/10.1097/00008571-199802000-00003>.
125. **Sachse C**, Brockmüller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* **1997**; 60:284-295.
126. **Zelenkin S**, Shur P, Kiryanov D, *et al.* On sufficient substantiation for maximum permissible level of zilpaterol in meat products. *Health.* **2022**; 110. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.4.10.eng>.
127. **Thevis M**, Walpurgis K, Thomas A. DropWise: current role and future perspectives of dried blood spots (DBS), blood microsampling, and their analysis in sports drug testing. *Crit Rev Clin Lab Sci.* **2023**; 60:41-62. <https://doi.org/10.1080/10408363.2022.2103085>.
128. **Thevis M**, Kuuranne T, Thomas A, Geyer H. Do dried blood spots have the potential to support result management processes in routine sports drug testing?—Part 2: Proactive sampling for follow-up investigations concerning atypical or adverse analytical findings. *Drug Test Anal.* **2021**; 13:505-509. <https://doi.org/10.1002/dta.3011>.
129. **[WADA]** World Anti-Doping Agency. *WADA Technical Document TD2021DBS on Dried Blood Spots (DBS) for Doping Control - Requirements and Procedures for Collection, Transport, Analytical Testing and Storage.* **2021**. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/item_6_3_3_attach_1_finalversion_td2021dbb_final.pdf. Accessed: 2023/06/28.
130. **Garzinsky A-M**, Thomas A, Guddat S, Görgens C, Dib J, Thevis M. Dried Blood Spots for Doping Controls – Development of a comprehensive Initial Testing Procedure with fully automated sample preparation. *Biomed Chromatogr.* **2023**; n/a:e5633. <https://doi.org/10.1002/bmc.5633>.
131. **Mazzarino M**, Di Costanzo L, Comunità F, Stacchini C, de la Torre X, Botrè F. UHPLC–HRMS Method for the Simultaneous Screening of 235 Drugs in Capillary Blood for Doping Control Purpose: Comparative Evaluation of Volumetric and Non-volumetric Dried Blood Spotting Devices. *ACS Omega.* **2022**; 7:31845-31868. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01417>.

11 Kurzzusammenfassung und Abstract

11.1 Kurzzusammenfassung

Die Welt Anti-Doping Agentur (WADA) definiert Doping u. a. als das Vorhandensein einer verbotenen Substanz, ihrer Metaboliten oder eines Markers im Körper eines*iner Sportler*in. Wie alle Menschen sind auch Athlet*innen winzigen Mengen von Xenobiotika in der Umwelt ausgesetzt. Da die analytische Nachweisstärke in den vergangenen Jahren stark zugenommen hat, können bereits diese winzigen Mengen zu einem „positiven“ Dopingbefund (*adverse analytical finding*, AAF) führen. Ein Ziel der präventiven Dopingforschung ist es daher, das Exposom von Sportler*innen zu untersuchen, Risiken zu erkennen und Strategien zu entwickeln, die Analytiker*innen dabei helfen, zwischen absichtlichem und unabsichtlichem Doping zu unterscheiden.

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit unbeabsichtigtem Doping durch Lebensmittel. Verbotene Substanzen können in Lebensmitteln entweder natürlich, als Rückstände oder infolge von Verunreinigungen vorkommen. Aufgrund der Vielfalt der Substanzen und der Expositionsszenarien gibt es keine Einheitslösung zur Unterscheidung zwischen willentlichem und unbeabsichtigtem Doping. Daher müssen individuelle Strategien für jede dieser Substanz entwickelt werden. Zwei davon stehen im Fokus dieser Dissertation: Clomifen und Zilpaterol.

Clomifen wird möglicherweise in der Landwirtschaft missbraucht, um die Eierproduktionsrate von Legehennen zu erhöhen. Daher wurde im Rahmen des ersten Projekts der Dissertation eine Studie durchgeführt, in der sowohl die Eier als auch das Fleisch von Clomifen-behandelten Hühnern auf Clomifen-Rückstände untersucht wurden, um das Expositionsrisiko für Clomifen über diese Lebensmittel abzuschätzen. Dafür wurde eine HPLC-MS/MS-Methode entwickelt, validiert und angewendet. Sowohl in den Eiern als auch im Fleisch der Hennen konnten Clomifen-Rückstände im $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich nachgewiesen werden. Daher wurde das Szenario als potenzielles Risiko für Athlet*innen eingeschätzt und im Rahmen des zweiten Projekts der Dissertation eine Verzehrstudie mit diesen clomifenhaltigen Eiern durchgeführt. Darin konnte gezeigt werden, dass der Konsum von zwei Eiern ausreicht, um die Aufnahme von Clomifen im Urin der Probanden nachzuweisen. Zum Vergleich wurden Studien mit Mikrodosierungen von Clomifen (1, 10 und 50 μg Einmalapplikation) durchgeführt. Mithilfe dieser Proben konnte eine Differenzierungsmethode entwickelt werden, die auf der Trennung verschiedener mono-

hydroxylierter Clomifen-Metaboliten beruht. Diese Methode ermöglichte es zu unterscheiden, ob Clomifen als Medikament in Mikrodosierung oder über clomifenhaltige Eier aufgenommen wurde. Bei Anwendung auf reale Dopingkontrollproben, die ein AAF für Clomifen ausgelöst hatten, wurde ein noch nicht identifizierter Hydroxy-Metabolit als abundantestes Hydroxy-Clomifen (HC) detektiert. Da dieser Metabolit weder in den Urinproben nach Eiverzehr noch in den Proben nach der Mikrodosis detektiert wurde, sollte er im Rahmen des dritten Projekts der Dissertation identifiziert und auf seinen Langzeit-Charakter hin untersucht werden. Über die Synthese und die Re-Analyse von Proben aus einer Ausscheidungsstudie nach therapeutischer Clomifen-Gabe konnte (Z)-3'-HC als potenzieller Dopingmarker identifiziert werden.

Im Rahmen des vierten Projekts dieser Dissertation wurden Eliminationsstudien mit Mikrodosen der anabol wirksamen Substanz Zilpaterol durchgeführt. In einigen Ländern wird Zilpaterol legal als Futtermittelzusatzstoff verwendet, um die Futtereffizienz von Rindern kurz vor dem Schlachten zu verbessern. Daher wurden z. B. von der US-amerikanischen Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde (*Food and Drug Administration*, FDA) Rückstandshöchstmengen für Zilpaterol in Rindfleisch festgelegt. In der Studie nahmen die Probanden Zilpaterol in Mengen zu sich, die den Verzehr von Fleisch mit Rückstandshöchstmengen simulierten. Infolgedessen wurden in den Urinproben der Probanden Zilpaterol-Konzentrationen festgestellt, die nahe am sogenannten *Minimum Reporting Level* (MRL) von Dopingkontrollen lagen. Um weitere Informationen zu erhalten, wurde außerdem eine Trennmethode für (R,R)- und (S,S)-Zilpaterol entwickelt, um die enantioselektive Eliminierung des Arzneimittels zu bestimmen.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Dissertation verdeutlichen die Komplexität des unbeabsichtigten Dopings durch Lebensmittel. Sie können in Zukunft zur Entscheidungsfindung und zum Schutz sauberer Athlet*innen im Anti-Doping-Kontext beitragen: Das im Rahmen dieser Dissertation entwickelte analytische Verfahren ermöglicht es, zwischen der Clomifen-Aufnahme therapeutischer Dosen, z. B. zu Dopingzwecken, und Kontaminationsszenarien zu unterscheiden. Für Zilpaterol ist dies analytisch zwar nach wie vor nicht möglich. Jedoch ist es mithilfe der Forschungsergebnisse dieser Dissertation gelungen, die Umstände näher zu definieren, die ein AAF für Zilpaterol in einem Kontaminationsszenario bewirken können.

11.2 Abstract

The World Anti-Doping Agency (WADA) defines doping as, among other things, the presence of a prohibited substance, its metabolites or a marker in the body of an athlete. As all humans, athletes are exposed to minute amounts of xenobiotics in the environment. Since the analytical detection power has improved tremendously in recent years, even these tiny amounts may lead to an adverse analytical finding (AAF) in a doping control. One of the main tasks of preventive doping research is therefore to investigate the exposome of athletes, to identify its associated risks and to develop strategies that help analysts to distinguish between intentional and unintentional doping.

This doctoral thesis addresses unintentional doping through food. Prohibited substances can occur in food either naturally, as residues or as a result of contamination. Due to the diversity of substances and exposure scenarios, there is no one-size-fits-all solution. This is why individual strategies must be developed for each substance, two of which are presented in this dissertation: Clomiphene and Zilpaterol.

Clomiphene may be misused in agriculture to increase the egg production rate of laying hens. Therefore, as part of the first publication of this dissertation, a study was conducted in which both eggs and meat from clomiphene-treated chickens were analyzed for clomiphene residues in order to estimate the exposure risk to clomiphene via these foods. For this purpose, an HPLC-MS/MS method was developed, validated and applied. Clomiphene residues in the $\mu\text{g}/\text{kg}$ range were detected in both the eggs and the meat of the hens. Therefore, the scenario was considered as a potential risk for athletes and a consumption study with these clomiphene-containing eggs was conducted as part of the second publication of this dissertation. It was shown that the consumption of two eggs was sufficient to detect the intake of clomiphene in the urine of the study participants. For comparison, studies were conducted with microdoses of clomiphene (1, 10 and 50 μg single application). Using these samples, it was possible to develop a differentiation method based on the separation of different mono-hydroxylated clomiphene metabolites. This method allowed to distinguish between ingestion of clomiphene microdoses as a drug and through clomiphene-containing eggs. When applied to real doping control samples that resulted in an AAF for clomiphene, an as-yet unidentified hydroxy metabolite was detected as the most abundant hydroxy clomiphene (HC). This metabolite was detected neither in the urine samples after egg consumption nor in the samples after the microdose. Therefore, the goal of the third project of this dissertation was to identify the metabolite and to investigate its long-term character. Through the

synthesis and re-analysis of samples from an excretion study after therapeutic clomiphene administration, (Z)-3'-HC was identified as a potential doping marker.

As part of the fourth publication of this dissertation, elimination studies were carried out with microdoses of the anabolic agent zilpaterol. In some countries, zilpaterol is legally used as a feed additive to increase the feed efficiency of cattle shortly before slaughter. As a result, maximum residue limits have been established, e.g. by the United States Food and Drug Administration (FDA) for zilpaterol in beef. For the fourth project, study participants consumed zilpaterol in amounts that simulated the consumption of meat containing the maximum residue levels. As a result, zilpaterol concentrations close to the minimum reporting level (MRL) of doping controls were detected in the urine samples of the volunteers. To obtain further information, a separation method for (*R,R*)- and (*S,S*)-Zilpaterol was also developed to determine the enantioselective elimination of the drug.

The results of this dissertation highlight the complexity of unintentional doping through food. In the future, these findings may contribute to the decision-making and protection of clean athletes in the anti-doping context. The analytical method developed in this dissertation allows to differentiate between clomiphene intake of therapeutic doses, e.g. for doping purposes, and of contamination scenarios. Analytically, this does still not seem possible for zilpaterol. Nevertheless, the research results of this dissertation have led to a closer definition of the circumstances that can cause an AAF for zilpaterol in a contamination scenario.

12 Verzeichnisse

12.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	
AAF	<i>Adverse analytical finding</i>	“positives” Analyseergebnis
ACN	<i>Acetonitrile</i>	Acetonitril
ADI	<i>Acceptable daily intake</i>	Erlaubte Tagesdosis
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>	Chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck
ATF	<i>Atypical finding</i>	Analyseergebnis, bei dem eine Doping-substanz unterhalb des MRL detektiert wurde
CCS	<i>Collision cross section</i>	Stoßquerschnitt
DEA	<i>Diethylamine</i>	Diethylamin
DBS	<i>Dried blood spots</i>	Getrocknete Blutstropfen
EIC	<i>Extracted ion chromatogram</i>	Extrahiertes Ionenchromatogramm
ESI	<i>Electrospray ionization</i>	Elektrospray-Ionisation
EtOAc	<i>Ethyl acetate</i>	Ethylacetat
FA	<i>Formic acid</i>	Ameisensäure
FAO	<i>United Nations Food and Agriculture Organization</i>	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	US-amerikanische Lebensmittelüberwachungsbehörde
HC	<i>Hydroxy clomiphene</i>	Hydroxy-Clomifen
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IMS	<i>Ion mobility spectrometry</i>	Ionenmobilitätsspektrometrie
IOC	<i>International Olympic Committee</i>	Internationales Olympisches Komitee
ISL	<i>International Standard for Laboratories</i>	Internationaler Standard für Anti-Doping-Labore
ISTD	<i>Internal standard</i>	Interner Standard
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>	Gemeinsamer FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i>	Flüssig-Flüssig-Extraktion
LOD	<i>Limit of detection</i>	Nachweisgrenze

Abkürzung	Bedeutung	
LOI	<i>Limit of identification</i>	Identifizierungsgrenze
LOQ	<i>Limit of quantification</i>	Bestimmungsgrenze
MeOH	<i>Methanol</i>	Methanol
MRL	<i>Minimum Reporting Level</i>	Minimaler Meldewert
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>	Messmodus eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers
MRPL	<i>Minimum Required Performance Level</i>	Mindestanforderungen an die nachweisbaren Konzentrationen
MS	<i>Mass spectrometry</i>	Massenspektrometrie
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>	Tandem-Massenspektrometrie
NH ₄ Ac	<i>Ammonium acetate</i>	Ammoniumacetat
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulator</i>	Selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
SG	<i>Specific gravity</i>	Spezifische Dichte
SPE	<i>Solid phase extraction</i>	Festphasenextraktion
TBME	<i>Tert-butyl methyl ether</i>	Tert-Butylmethylether
TIMS	<i>Trapped ion mobility spectrometry</i>	Art der Ionenmobilitätsspektrometrie
UHPLC	<i>Ultra high-performance liquid chromatography</i>	Ultra-Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie
VICH	<i>International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products</i>	Internationale Vereinigung zur Harmonisierung technischer Anforderungen für die Registrierung tiermedizinischer Produkte
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>	Welt Anti-Doping Agentur
WADC	<i>World Anti-Doping Code</i>	Welt Anti-Doping Code
β ₂ -Agonist	β ₂ -adrenoreceptor agonist	β ₂ -Adrenorezeptor-Agonist

12.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 Ausgewählte Situationen, die zu einem AAF führen können, adaptiert von Thevis <i>et al.</i> 2020	8
Abbildung 3.2 Strukturformeln von (<i>Z</i>)-Clomifen (links) und (<i>E</i>)-Clomifen (rechts)	13
Abbildung 3.3 Strukturformeln von (<i>R,R</i>)-Zilpaterol (links) und (<i>S,S</i>)-Zilpaterol (rechts).	15