

Massaspectrometrie is essentieel in dopingcontrole

Echter een sporter veroordelen enkel op massaspectrometrie is soms het halve verhaal

Dr Douwe de Boer

Maastricht UMC+



Definitie van doping



- Onmogelijk om in één beschrijving te omvatten

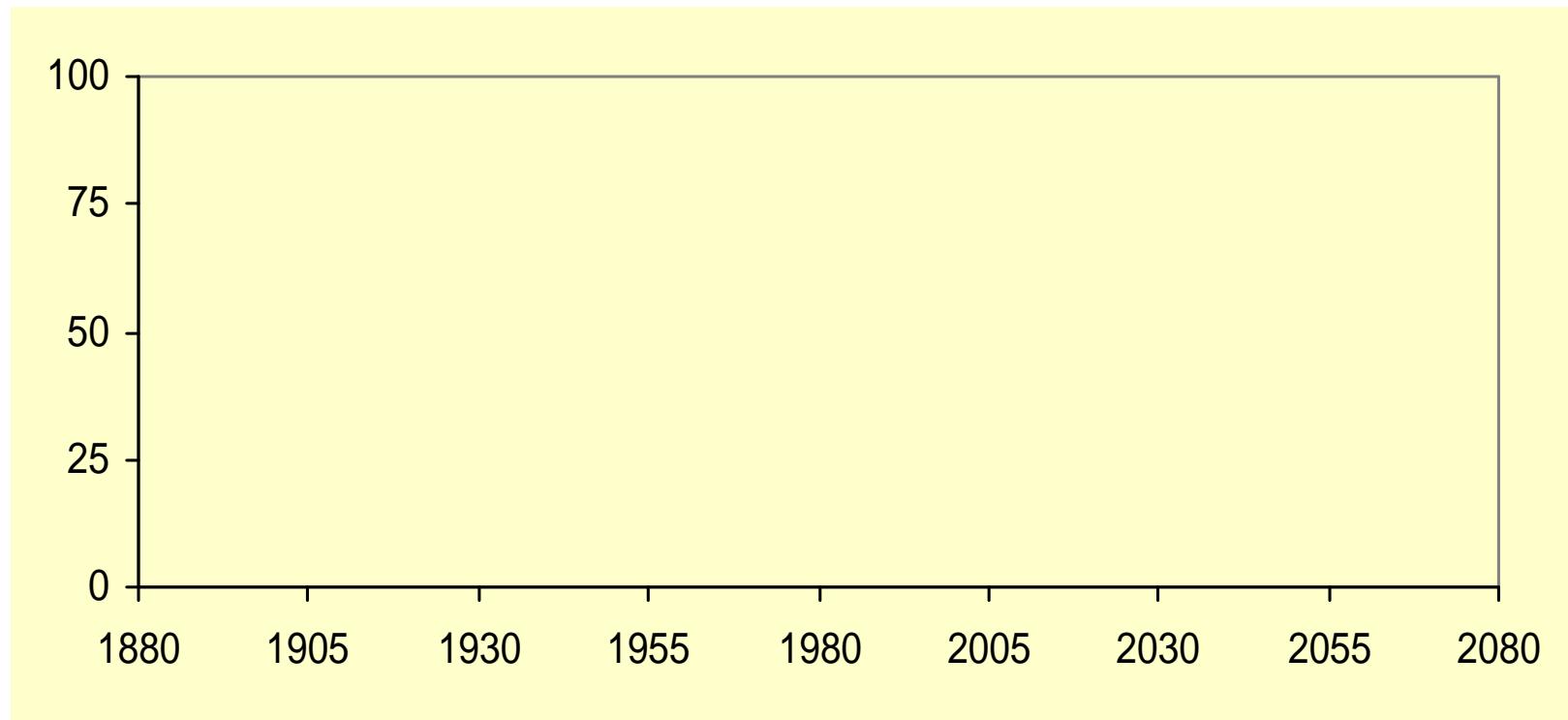


Pragmatische benadering

- Doping is gespecificeerd op de DOPINGLIJST

Verleden, heden en toekomst van doping

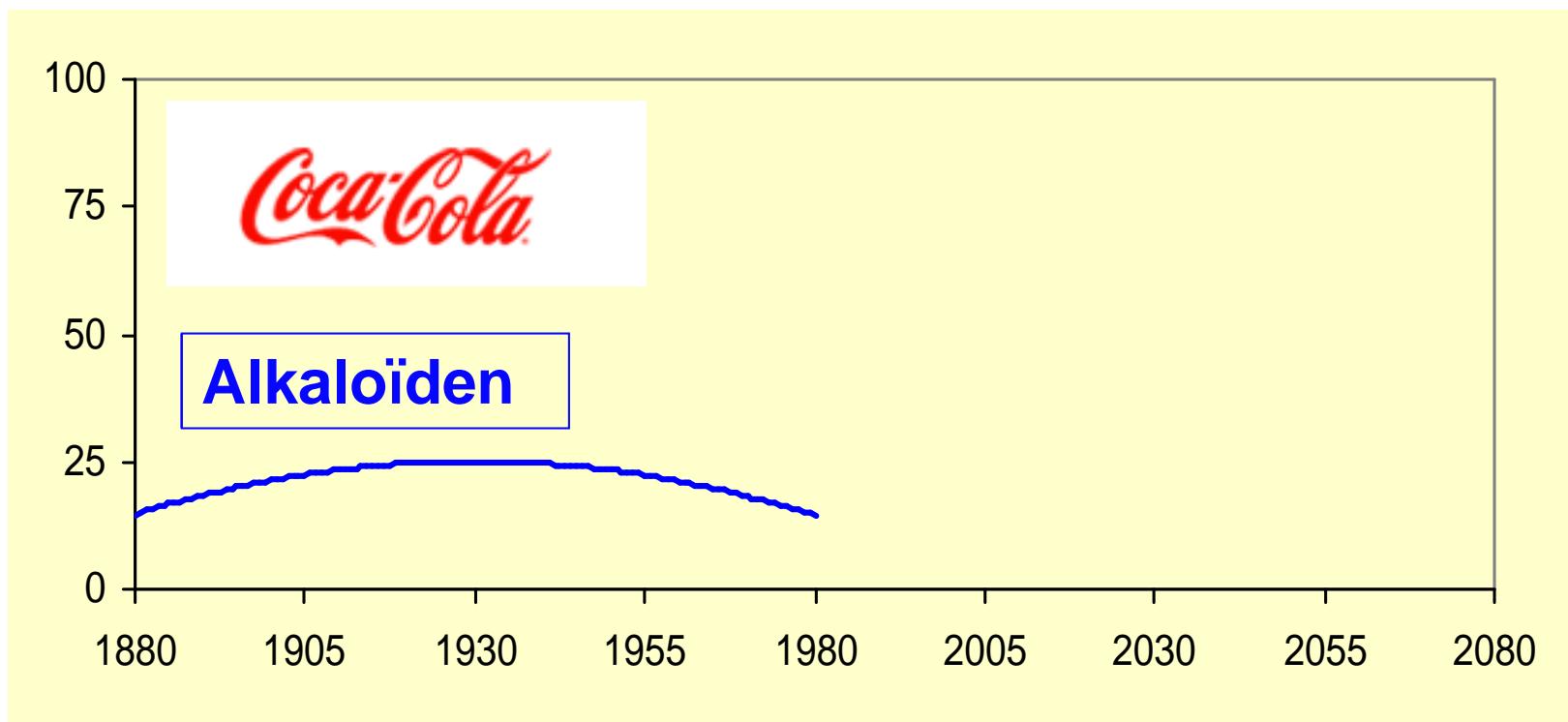
Simulatie van trends in doping



Verleden, heden en toekomst van doping

Trends in doping

cocaïne
morphine
strychnine
coffeïne



Verleden, heden en toekomst van doping

Testen op Alkaloïden

- Testen begon in de paardensport



Verleden, heden en toekomst van doping

Testen op Alkaloïden

- Testen begon in de paardensport
 - 1910 eerste methode beschrijving op basis van speekselmonster

Verleden, heden en toekomst van doping

Testen op Alkaloïden

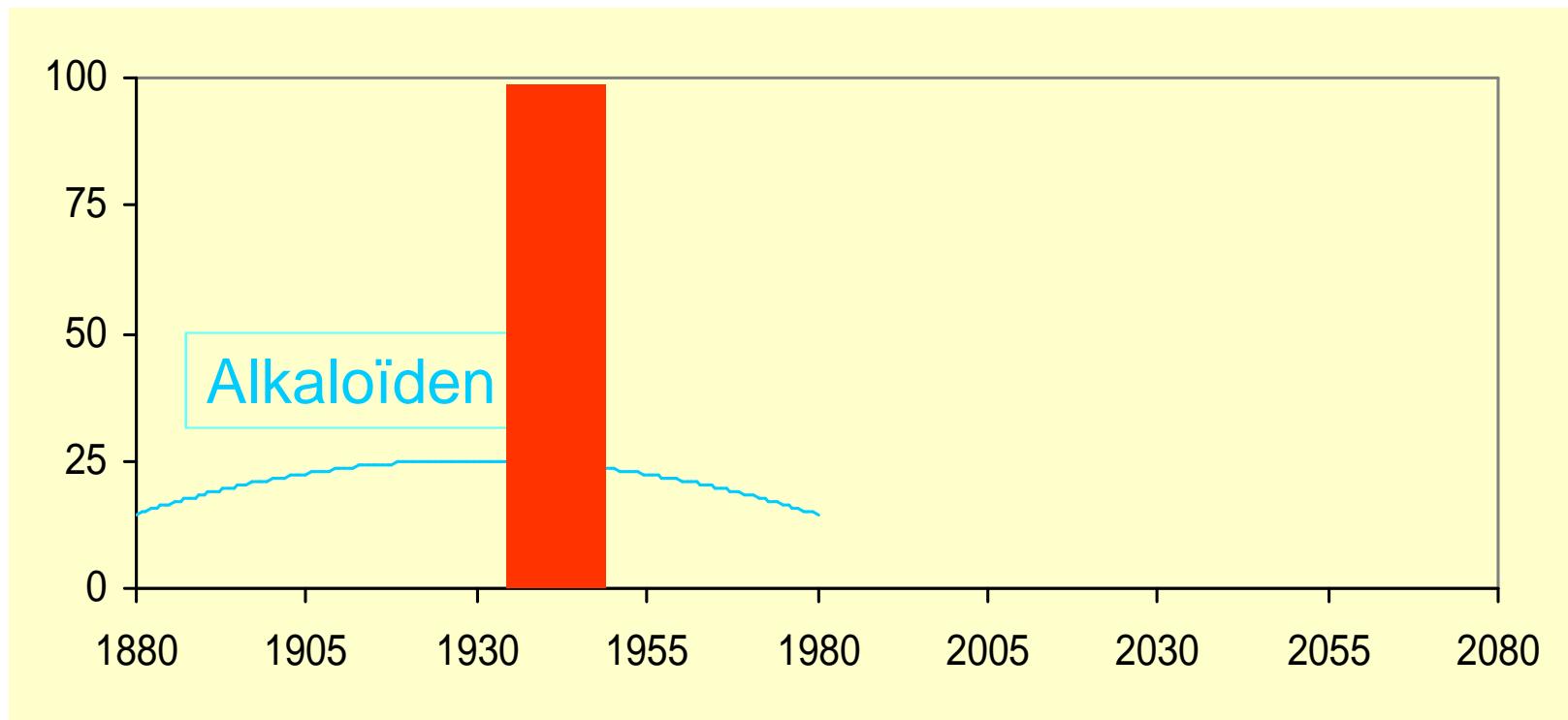
- Testen begon in de paardensport
 - 1910 eerste methode beschrijving op basis van speekselmonster
 - 1911-1912 methode geoptimaliseerd en direct aangevochten door advocaten

- 1920's Stas-Dragendorff procedure
 - Speeksel afname m.b.v. alcohol
 - Analyse
 - Distillatie
 - Vloeistof/vloeistof extractie
 - Precipitatie
 - Kleurreactie

State-of-the-art
van die periode

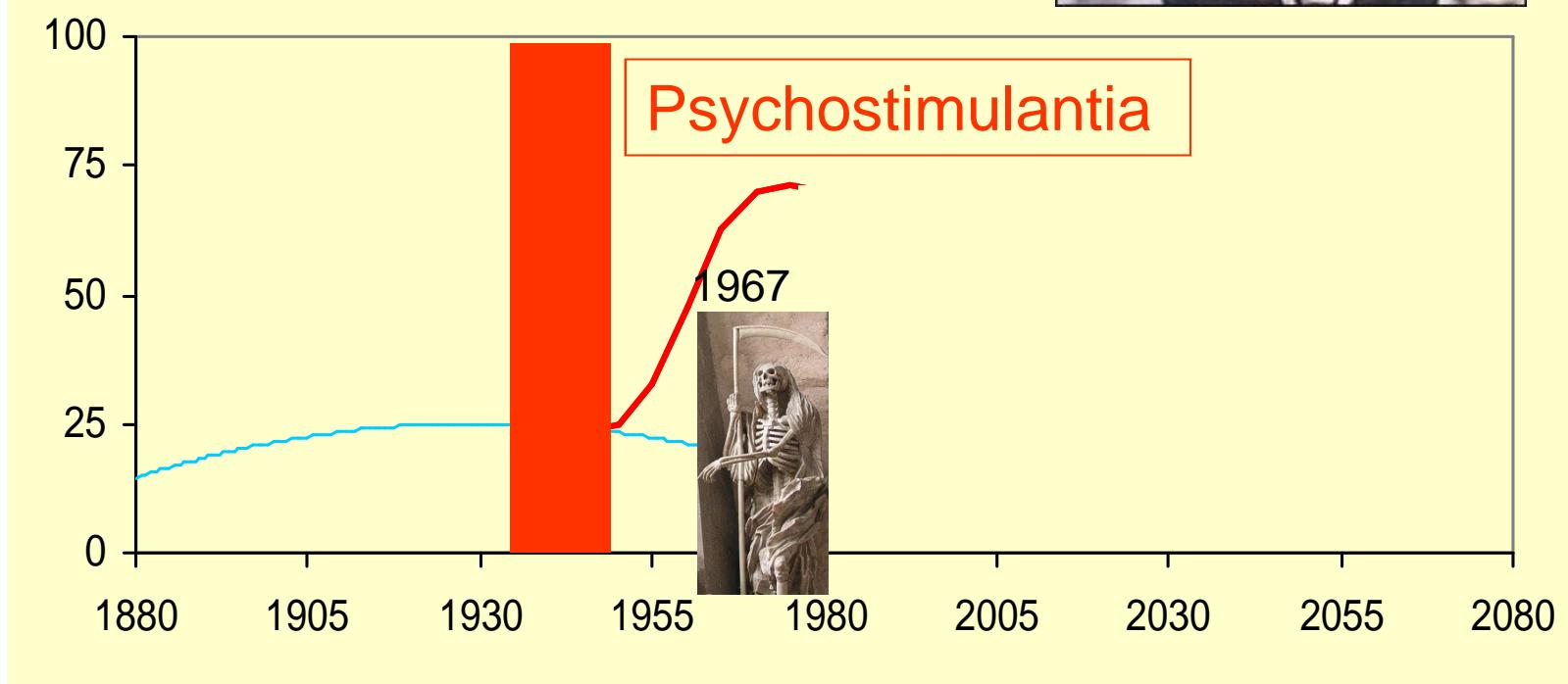
Verleden, heden en toekomst van doping

Trends in doping



Verleden, heden en toekomst van doping

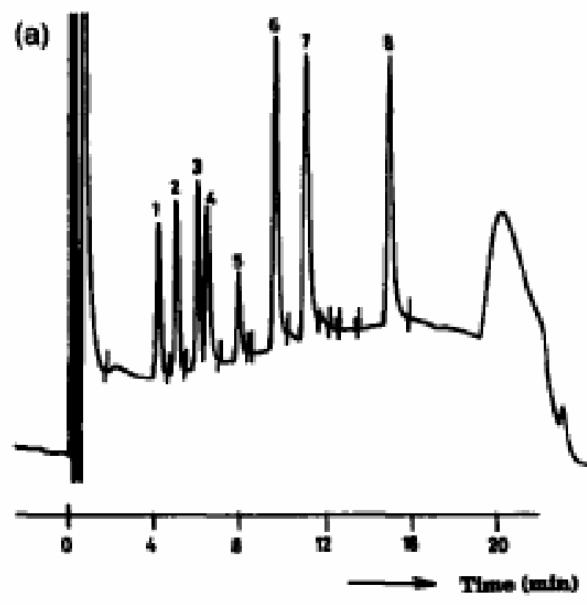
Trends in doping



Verleden, heden en toekomst van doping

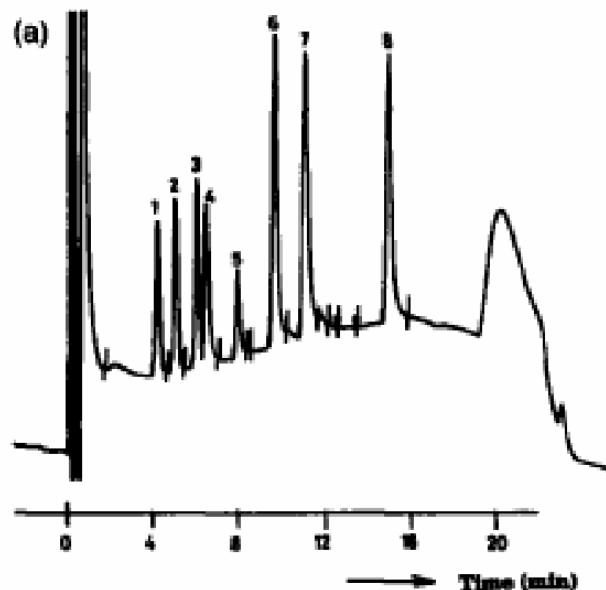
Testen op Psychostimulantia

- Testen begon in de humane sport bij het wielrennen
 - Urine afname



GC met glazen kolom en “Nitrogen Phosphorous Detector (NPD)”

Kopie van J Chromatogr Biomed Appl 1996;687:221

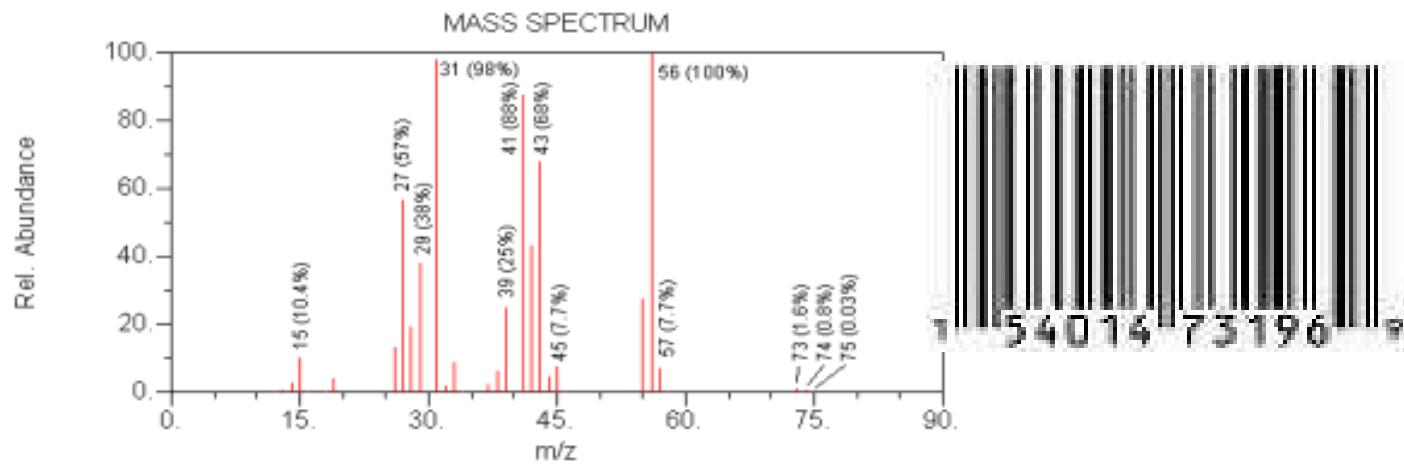


Psychostimulantia

GC met glazen kolom en “Nitrogen Phosphorous Detector (NPD)”

Kopie van J Chromatogr Biomed Appl 1996;687:221

- Identificatie op basis van retentietijd

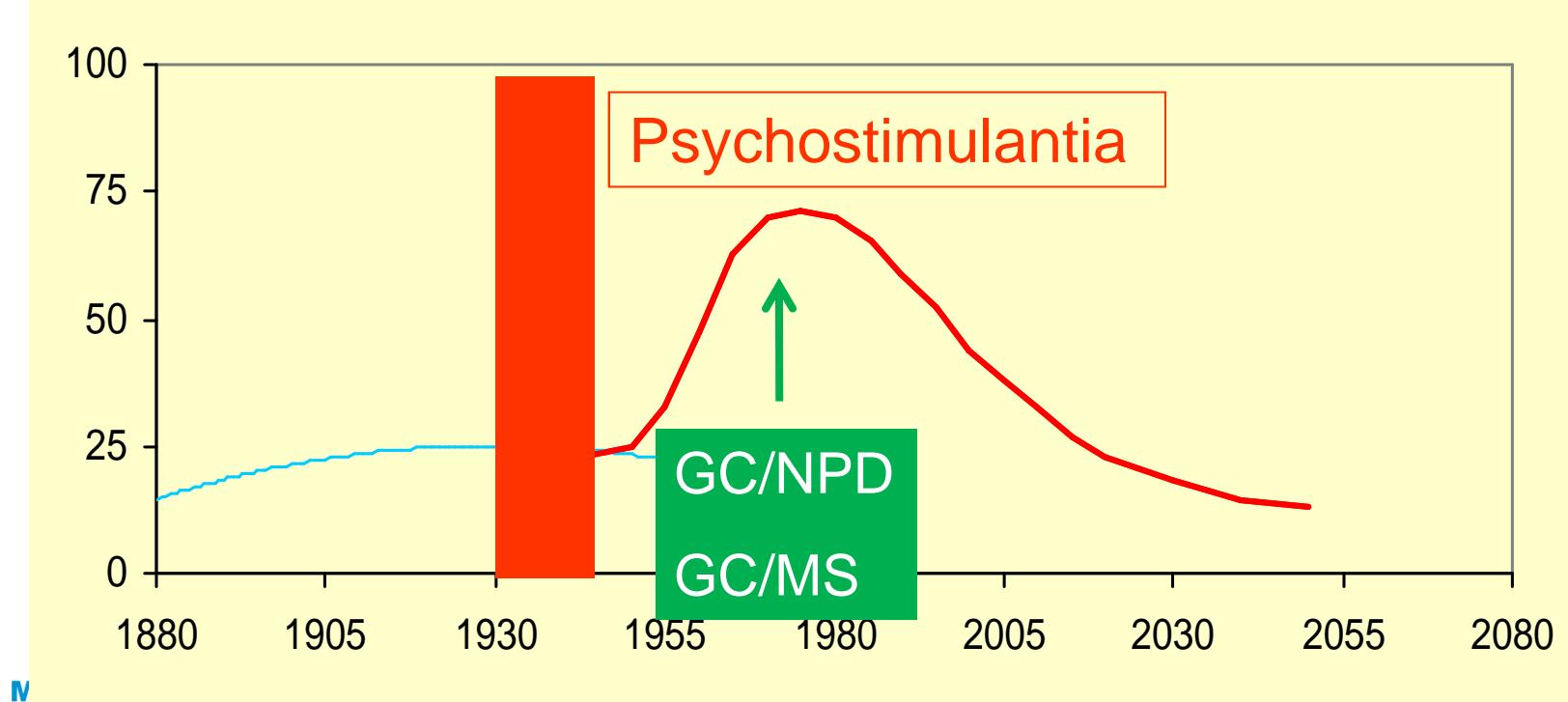


Verleden, heden en toekomst van doping

Trends in doping

State-of-the-art
van die periode

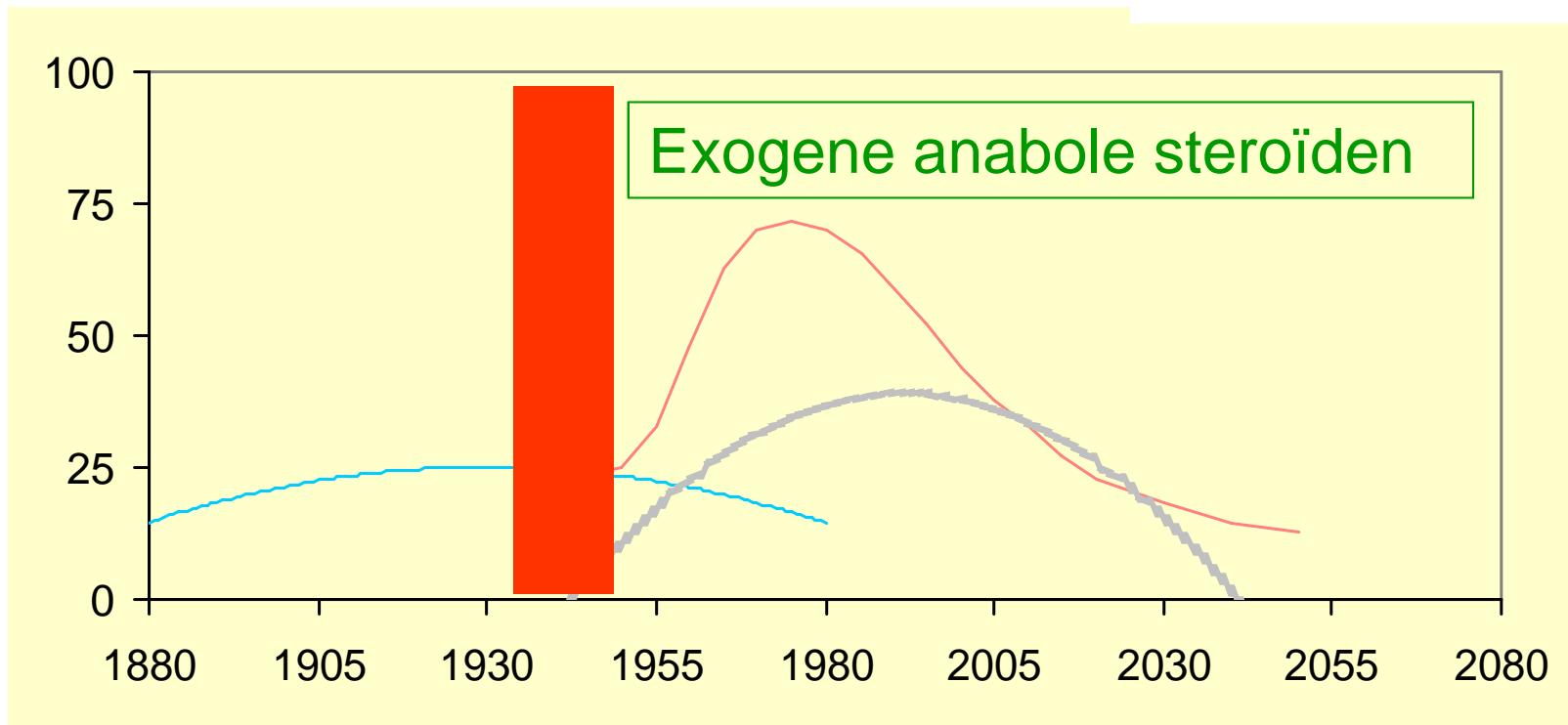
top 1960-1980



Verleden, heden en toekomst van doping

Trends in doping

stanozolol
metandiënon
mesterolon
oxandrolon

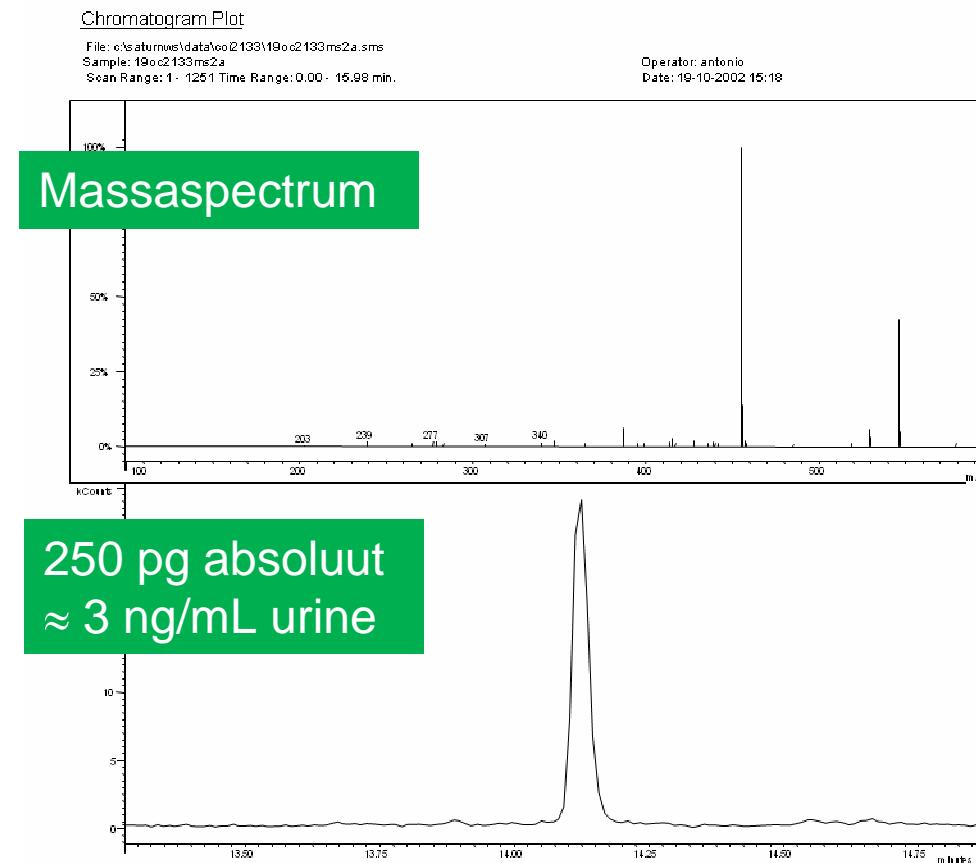


Verleden, heden en toekomst van doping

Stanozolol

Voorbeeld van GC/MS/MS

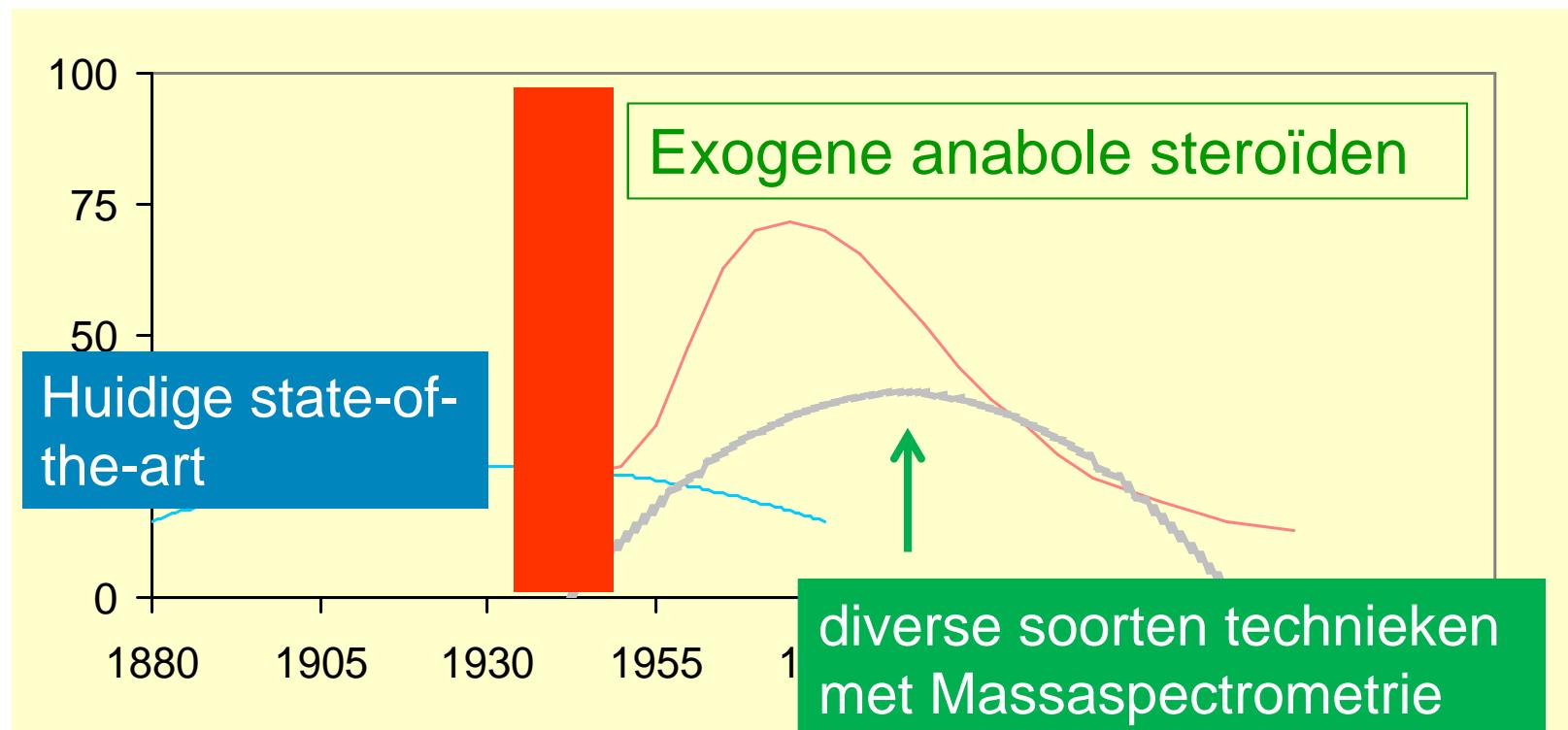
GC/LR-MS
GC/LR-MS/MS
GC/HR-MS
LC/MS/MS



Verleden, heden en toekomst van doping

Trends in doping

top 1980-2000



Verleden, heden en toekomst van doping

Trends in doping

Alkaloïden	Stass/Dragendorf procedure	top voor 1940
Psychostimulantia	GC/NPD & GC/MS	top 1960-1980
Exogene anabole steroïden	GC/MS/MS	top 1980-2000
Endogene anabole steroïden	GC/C/IRMS	top 2006
Designer anabole steroïden	LC/MS/MS e.a.	top 2010?
Epoëtines	IA & IEF-dubbele Western blotting	top 2010?
Metabolisme- en Groeifactoren, Gen Stimulatie, Gendoping		

Hypoglycemie casus azM & MS

- vrouw 43 jaar werd bewusteloos gevonden in bed
- hypoglycaemia werd snel vastgesteld
- was bekend met zelfmoordpoging in het verleden
- kreeg fluvoxamine (3×100 mg daags) en oxazepam (0.5×50 mg daags) voorgeschreven
- urine- en bloedmonsters werden bij aankomst en gedurende ziekenhuisverblijf afgenomen

Hypoglycemie casus azM & MS vervolg

- STIP analyse bloedmonster
 - oxazepam 0,09 mg/L (1-2 mg/L)
 - ibuprofen 0,3 mg/L (15-30 mg/L)
 - fluvoxamine en/of metabolieten
 - coffeïne
 - negatief voor bloedglucose verlagende middelen
- geen pathologische oorzaak
- verdenking op toediening insuline-achtige

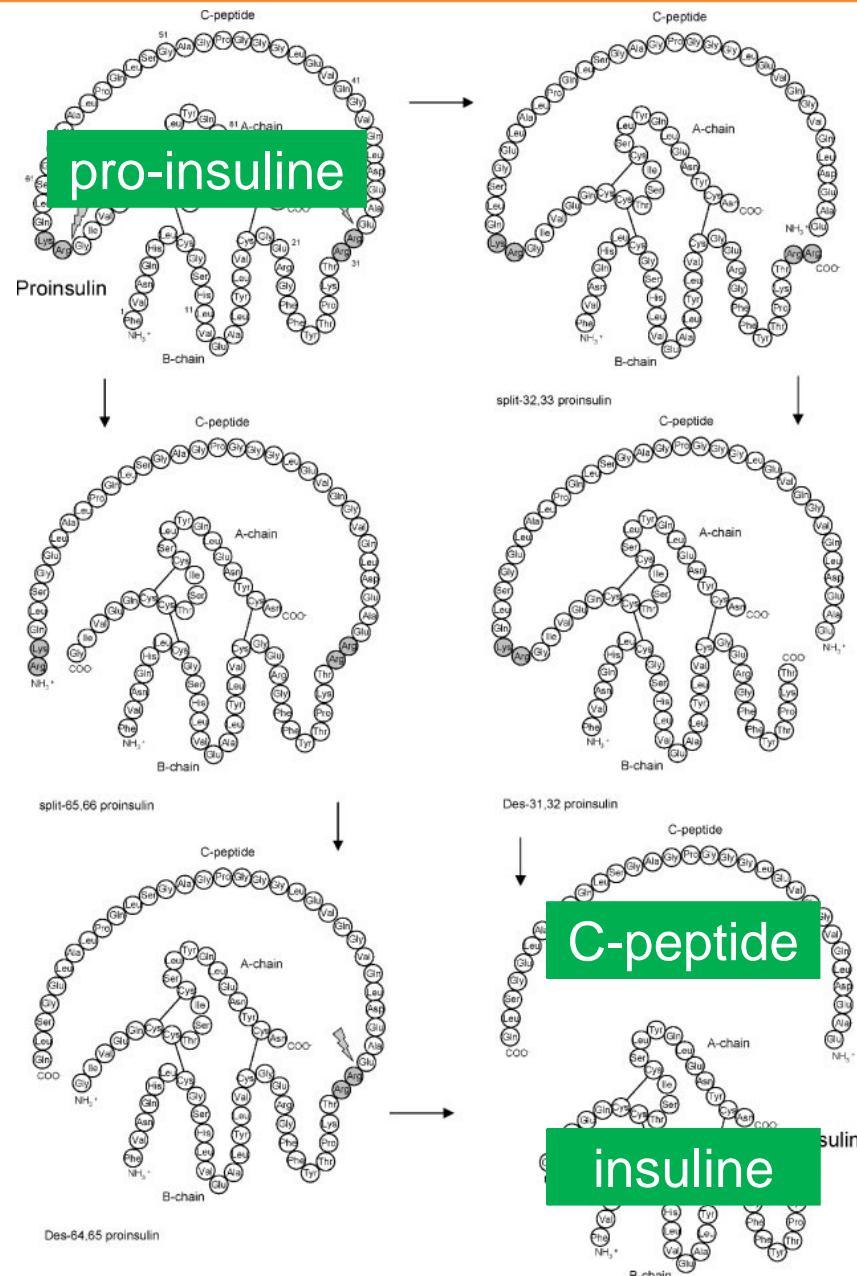
Biosynthese van insuline

Immunoassay is de standaard detectietechniek voor insuline en C-peptide

Casus

serum insuline < 3.0 mE/L
C-peptide < 0.03 nmol/L

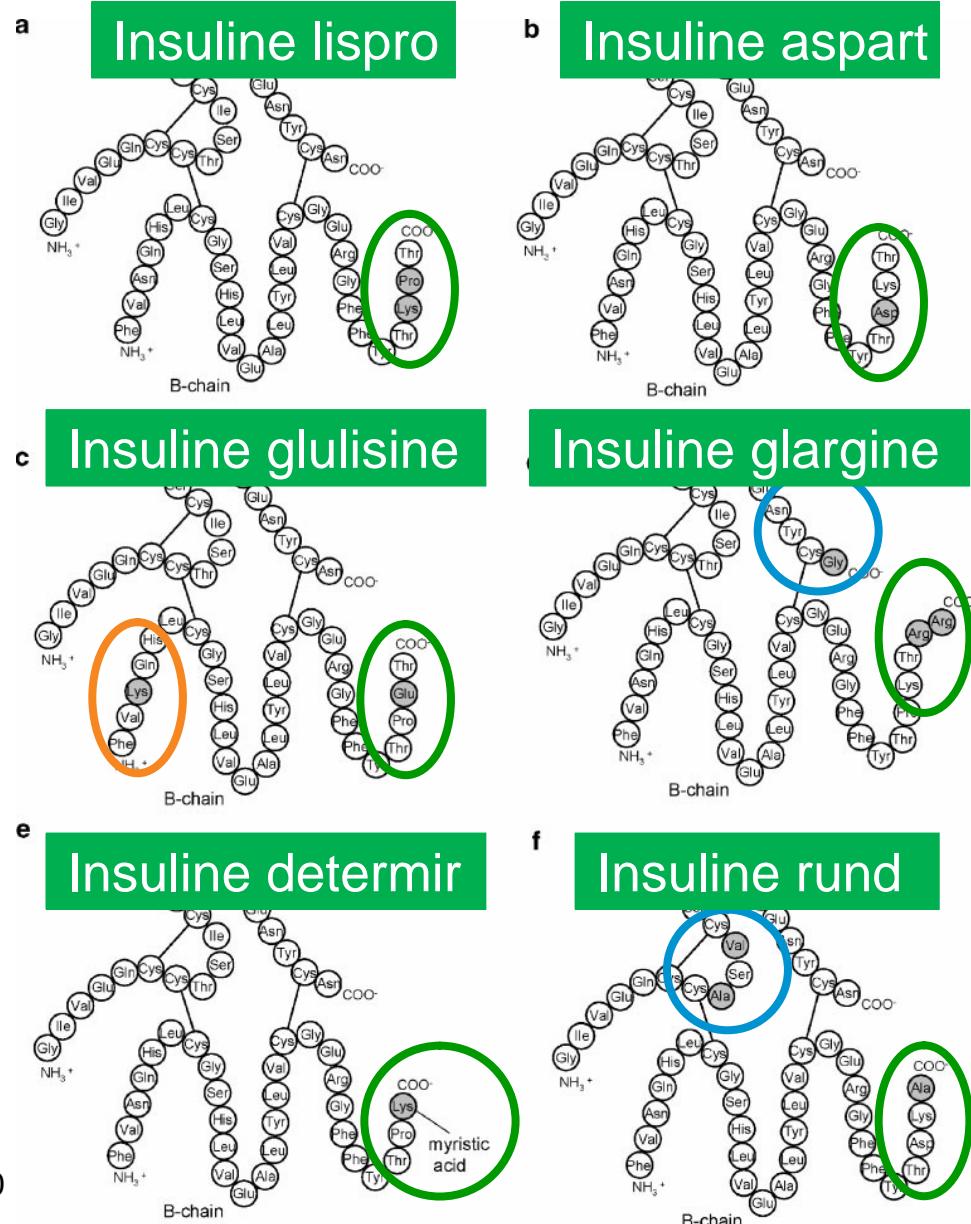
Kopie uit Mass Spectrometry Reviews 2008; 27: 35-50



Synthetische vormen van humaan insuline *versus* runder insuline

Immunoassay is niet geschikt als detectietechniek voor synthetische vormen van insuline

Kopie uit Mass Spectrometry Reviews 2008; 27: 35-50



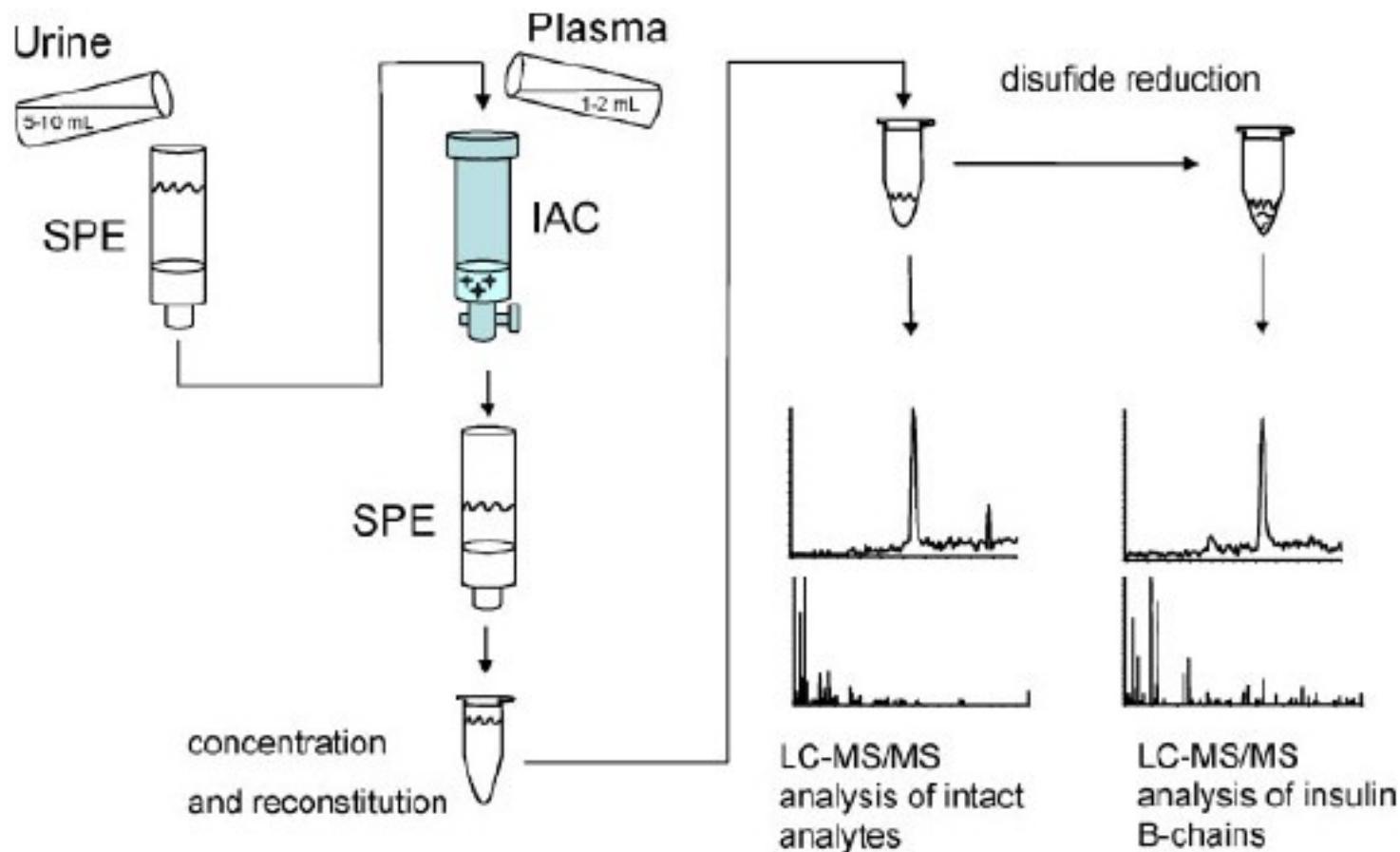
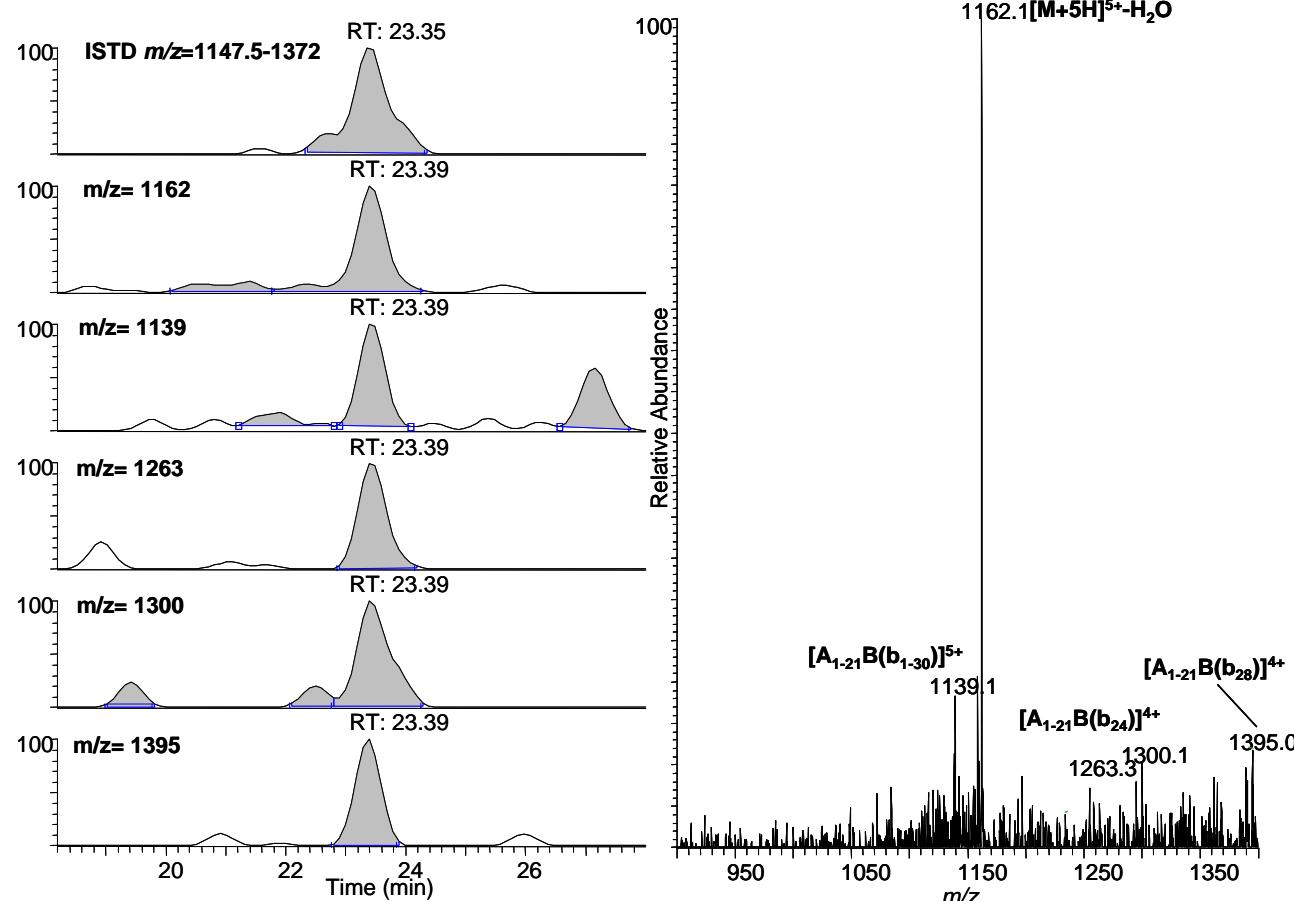


FIGURE 6. Sample preparation procedure for the determination of insulins in blood and urine specimens for doping control purposes.

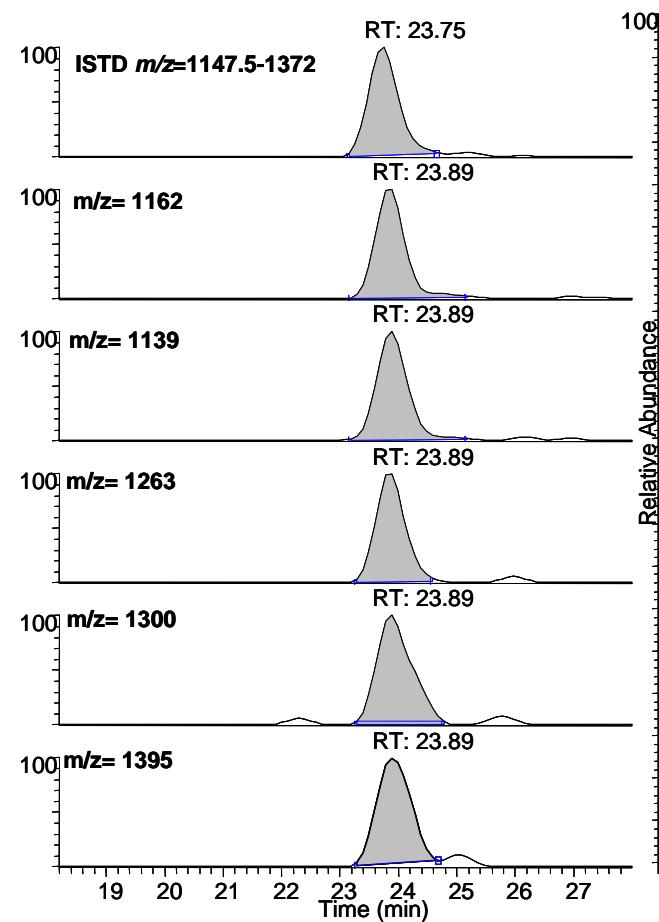
Kopie uit Mass Spectrometry Reviews 2008; 27: 35-50

Hypoglycemie casus azM & MS



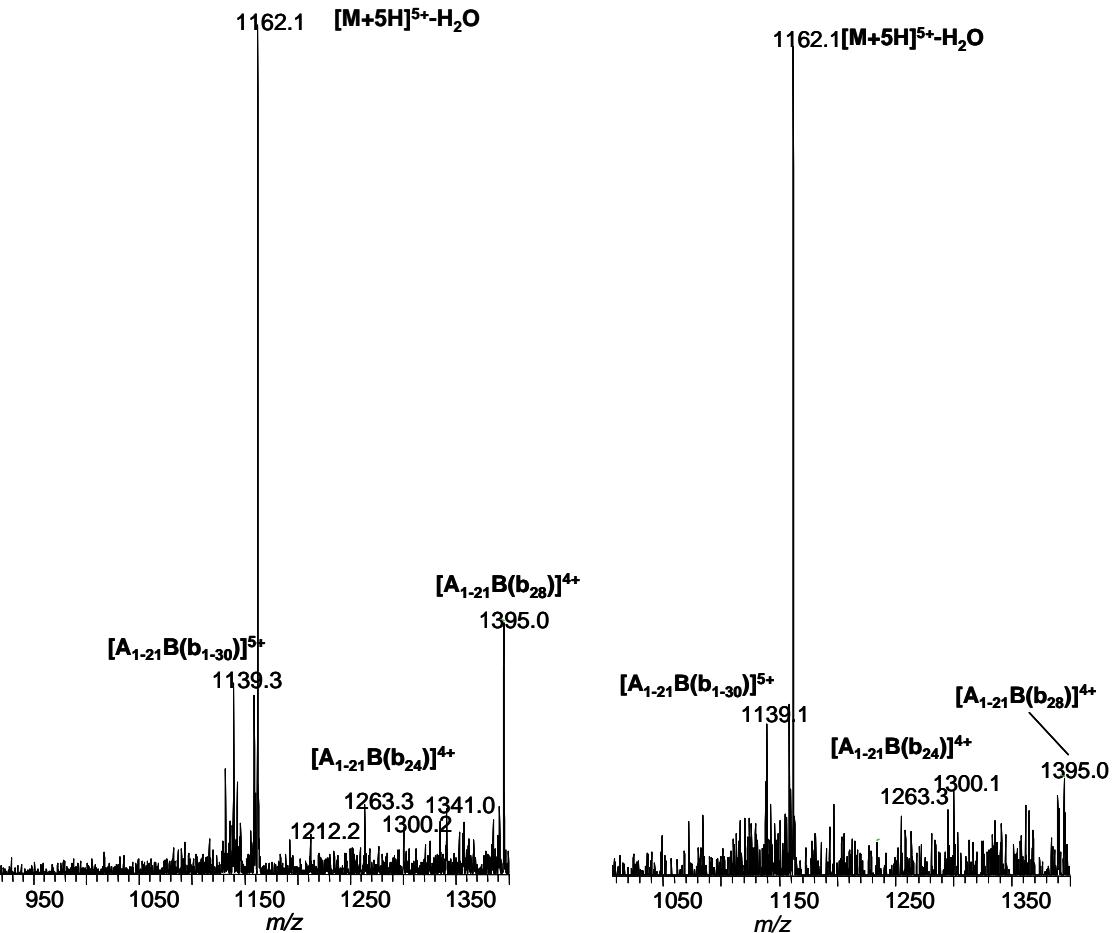
Insuline in urine patiënt

Hypoglycemie casus azM & MS



Insuline aspart

Maastricht UMC+



Insuline in urine patiënt

Evaluatie hypoglycemie casus azM

- vrouw 43 jaar werd bewusteloos gevonden in bed
- hypoglycaemia werd snel vastgesteld
- was bekend met zelfmoordpoging in het verleden
- kreeg fluvoxamine (3×100 mg daags) en oxazepam (0.5×50 mg daags) voorgeschreven

Evaluatie hypoglycemie casus azM

- vrouw 43 jaar werd bewusteloos gevonden in bed
- hypoglycaemia werd snel vastgesteld
- was bekend met zelfmoordpoging in het verleden
- kreeg fluvoxamine (3×100 mg daags) en oxazepam (0.5×50 mg daags) voorgeschreven
- uiteindelijk *Insuline aspart* in urine aangetoond met MS
- moeder leed aan Diabetes mellitus en vrouw had *Insuline aspart* achterover gedrukt

Casus Contador & MS

Clenbuterol

GC/LR-MS

GC/LR-MS/MS

GC/HR-MS

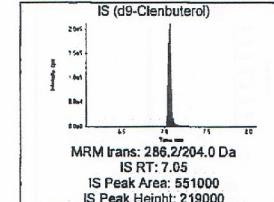
LC/MS/MS

Vanwege reële kans op voedselcontaminatie zou een tolerantiegrens vastgesteld moeten worden; mijn voorstel is 200 pg/mL

Voorbeeld van LC/MS/MS

Sample Name	7188 Conf	Injection Vial	62
Sample Index in Wiff	3	Data File	100811 Clenbuterol Conf MS31.wiff
Sample ID		Project	Screening 9
Sample Comment	SG, LC189	Instrument Name	22
Sample Type	Unknown	Results Table	100811 Clenbuterol_279 Conf.rdb
Acquisition Date	8/1/2010 1:17:32 PM	Dilution Factor	1.00
Acquisition Method	Clenbuterol Conf XDBC8.dam		

Internal Standard Results

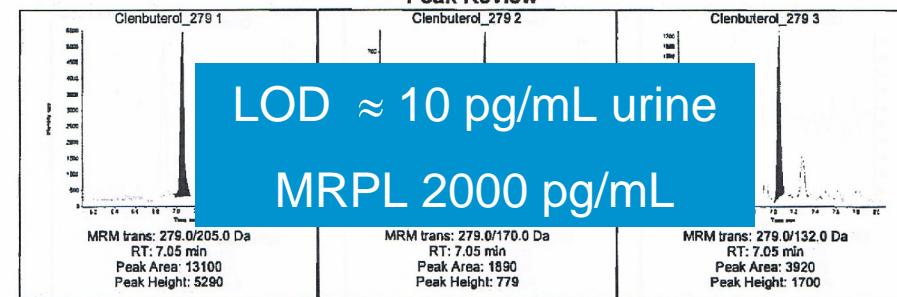


Results Summary

Analyte Peak Name	Peak Area	Analyte Peak Height
Clenbuterol_279 1		5290
Clenbuterol_279 2		779
Clenbuterol_279 3		1700

50 pg absoluut
≈ 50 pg/mL urine

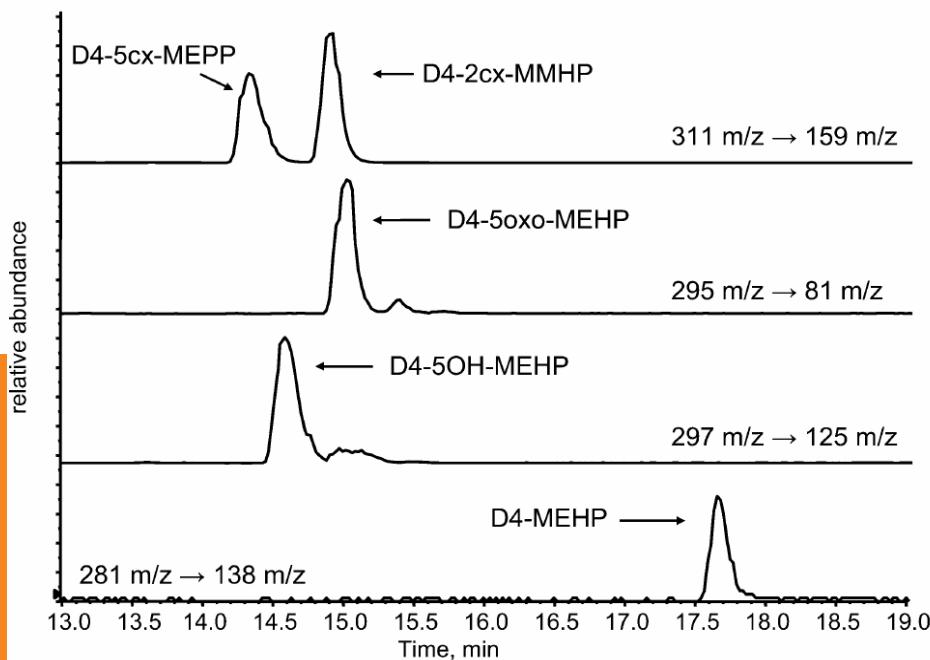
Peak Review



Casus Contador & MS

Weekmakers

LC/MS/MS



Vanwege concrete kans
op blootstelling aan DEHP
werkt men aan een
tolerantiegrens per sport;
staat nu nog niet vast

Conclusies

- MS speelt een essentiële rol in anti-dopingcontrole
- Anti-dopingcontrole lost het probleem DOPING niet op, maar verschuift het eerder naar elders
- Humane toxicologie kan aantal MS toepassingen naadloos over nemen
- Steeds gevoeliger MS methoden vragen soms om tolerantiegrenzen