



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Nachweis von Kontaminationen mit Selektiven Androgen
Rezeptor Modulatoren (SARM) in ausgewählten
Nahrungsergänzungsmitteln

verfasst von | submitted by

Mag. pharm. Sebastian Duda BSc BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien | Vienna, 2025

Studienkennzahl lt. Studienblatt | Degree
programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von | Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Dr. Günter Gmeiner ganz herzlich bedanken für die Möglichkeit diese Masterarbeit im Rahmen eines geförderten Projekts des Bildungsministeriums in den Seibersdorf Laboratories als Teil des Forensik- und Antidoping-Teams durchzuführen. Über die ganze Masterarbeit hinweg und vor allem zu Beginn, wusste ich, dass ich zu jedem Zeitpunkt um Hilfe bitten konnte, selbst wenn mal etwas schief gegangen war. Ich bin auch sehr dankbar für den organisatorischen Aufwand und die Eingliederung in dein Team, was du neben deiner üblichen Arbeit, auch noch bewerkstelligt hast.

Zweitens geht ein großes Dankeschön an Univ.-Prof. Dr. Jürgen König, welcher mir seitens der Universität die notwendige Unterstützung zusicherte und die Arbeit damit betreut hat. Herzlichen Dank für den reibungslosen Ablauf dieser Masterarbeit.

Drittens möchte ich mich beim Forensik- und Anti-Doping-Team für die Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere bei Julian Schmid für die Hilfe bei der Probenaufarbeitung, bei Sabine Aigner BSc und Dipl. Ing. Sonja Tischberger für das nötige Know-How dazu und die Einführung in die LC-MS-Methode, bei Dr. Daniel Pecher für die zahlreichen Messungen und die Erklärungen zum Bedienen des LC-MS-Gerätes und die Auswertung der Chromatogramme und natürlich bei Lena-Marie Langner und Arianna Gutjahr für angenehme Konversationen und den Austausch beim Mittagessen. Alle durfte ich Tag ein Tag aus mit Fragen bezüglich der Arbeit quälen, aber auch private und allgemeine Anliegen vorbringen.

Viertens möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne die ich nicht hier wäre. Ganz besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern und Stiefeltern. Nicht nur während des Studiums, sondern auch außerhalb seid ihr mir eine Stütze im Leben. Erst durch eure Unterstützung ist mir das Studium ermöglicht worden.

Ich möchte mich herzlichst bei meiner Freundin Magdalena bedanken. Nicht nur, dass sie diese Arbeit mittlerweile vom vielen Korrekturlesen vielleicht sogar schon auswendig kann, sondern auch für den guten Zuspruch zwischendurch und das offene Ohr bei jedem Anliegen rund um die Uhr. Ohne dich wäre vieles nicht möglich gewesen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir die Zeit während des Arbeitens und des Schreibens zumindest ein wenig angenehmer gestaltet haben.

Abstract

Nowadays, the consumption of dietary supplements is ubiquitous in both elite and amateur sports. Elite athletes tend to use these products to gain an advantage over their competitors in terms of performance or regeneration acceleration. However, these food supplements do not always meet the highest safety and quality standards and are often purchased online without any quality control. Sometimes these supplements are contaminated with doping-relevant substances such as the newly emerging substance group of selective-androgen-receptor-modulators (SARMs), which can lead to disqualification and ban from a competition, immediately after detection in an athlete's sample.

The World Anti-Doping Agency (WADA) is responsible for treating these cases, in which top athletes, supposedly unknown, ingested such impure supplements and are subsequently tested positive for these forbidden substances during a competition. In focus of doping prevention, food supplements are analyzed to find these doping-relevant ingredients in order to protect athletes from this doping trap in the future.

Within the scope of this work, a new analytical method was developed which combines a sample preparation of a modified solid phase extraction with XAD-4 with a corresponding LC-MS instrument method. This new analytical method was optimized in the preliminary experiments and then validated in six different supplements with seven parameters. It was then subjected to a field study with products from a public pharmacy, from a sports supplement shop in Vienna and from Seibersdorf Laboratories itself.

The measured results during validation demonstrate that the twelve examined SARM compounds show a limit of detection (LOD) of approximately 15ng/g and a limit of quantification (LOQ) of around 54ng/g respectively across all six matrices. In addition, an averaged recovery rate of 19% for all twelve substances was calculated for this method in these experiments. The subsequent field study was able to further verify this new method by detecting some SARM substances, which had previously been found in the products from Seibersdorf Laboratories. However, no SARM could be identified in the nutritional products neither from the pharmacy nor the nutritional supplement shop.

This approach could provide a new method for WADA-accredited laboratories to further examine food supplements regarding this chemical group of substances and thus identify impure products.

Keywords: Food supplements, Doping, WADA, SARM, Sample preparation, XAD-4, LC-MS

Zusammenfassung

Heutzutage ist der Konsum von Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) im Spitzen- wie auch im Breitensport allgegenwärtig. Insbesondere Elitesportler greifen gerne auf diese Produkte zurück, wenn sich dadurch ein Vorteil gegenüber ihrer Konkurrenz in Sachen Leistungsfähigkeit oder Regenerationsbeschleunigung ergeben könnte. Jedoch entsprechen diese NEM nicht immer den höchsten Sicherheits- und Qualitätsstandards und werden des Öfteren ohne jegliche Qualitätskontrolle übers Internet bezogen. Diese NEM können manchmal mit dopingrelevanten Substanzen wie beispielsweise der neu-aufkommenden Stoffgruppe der selektiven Androgen-Rezeptor-Modulatoren (SARM) kontaminiert sein, was, sobald nachgewiesen in der Probe eines Sportlers, zur Sperre des Athleten aus dem Wettkampf oder sogar bei entsprechender Dosis der Substanz zu einer gesundheitlichen Beeinträchtigung führen kann.

Die Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA) ist unter anderem dafür verantwortlich diese Fälle aufzuklären, in denen Spitzensportler vermeintlich unwissentlich unsaubere NEM zu sich genommen haben und anschließend im Rahmen eines Wettkampfes positiv auf diese verbotenen Substanzen getestet werden. Im Mittelpunkt der Dopingprävention werden NEM auf diese dopingrelevanten Inhaltsstoffe analysiert, um die Sportler zukünftig vor dieser Dopingfalle zu bewahren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Analysenmethode entwickelt, welche eine Probenaufarbeitung einer modifizierten Festphasenextraktion mit XAD-4 und eine dazu erstellte LC-MS-Instrumentenmethode miteinander kombiniert. Diese Analysenmethode wurde in den Vorversuchen optimiert und in sechs unterschiedlichen NEM mit sieben Parametern validiert. Anschließend wurde sie einer Feldstudie mit Produkten aus einer öffentlichen Apotheke, aus einem Sportnahrungsergänzungsshop in Wien und den bereits in Seibersdorf Laboratories vorhandenen Produkten, welche größtenteils aus dem Internet stammen, unterzogen.

Die Ergebnisse der Validierung zeigen, dass die zwölf im Untersuchungsumfang enthaltenen SARM-Verbindungen im Durchschnitt über alle sechs Matrices (NEM) eine Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze von rund 15ng/g bzw. 54ng/g aufweisen. Außerdem wurde in den Experimenten eine Wiederfindungsrate von 19% im Mittel von allen zwölf Substanzen berechnet. Die anschließende Feldstudie konnte diese neue Methode weiter verifizieren, indem manche SARM-Substanzen, welche bereits im Vorfeld in den Produkten aus Seibersdorf Laboratories gefunden wurden, entweder semiquantitativ oder zumindest qualitativ nachgewiesen wurden.

Schlagwörter: NEM, Doping, WADA, SARM, Probenaufarbeitung, XAD-4, LC-MS

Mit dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die im Routineeinsatz in WADA-akkreditierten Laboratorien Verwendung finden kann, um NEM in Hinblick auf diese Substanzgruppe zu untersuchen und unsaubere Produkte somit zu identifizieren.

Schlagwörter: NEM, Doping, WADA, SARM, Probenaufarbeitung, XAD-4, LC-MS

Inhaltsverzeichnis

ERKLÄRUNG GEMÄß § 10 ABS. 5 APVOL	I
DANKSAGUNG	II
ABSTRACT	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1 SELEKTIVE ANDROGEN REZEPTOR MODULATOREN (SARM)	3
2.1.1 Osteoporose	6
2.1.2 Benigne Prostata Hyperplasie (BPH)	7
2.1.3 Kachexie	7
2.1.4 Brustkrebs	8
2.2 WELT-ANTI-DOPING-AGENTUR (WADA)	8
2.2.1 Welt-Anti-Doping-Code (WADC)	9
2.2.2 Verbotsliste (Prohibited List)	10
2.2.3 SARM-Missbrauch als Dopingmittel	11
2.2.3.1 Statistik der SARM-Fälle (WADA-Bericht)	12
2.3 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)	13
2.3.1 Stationäre Phase	14
2.3.1.1 Normalphasen-HPLC (NP-HPLC)	14
2.3.1.2 Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC)	15
2.3.2 Mobile Phase	16
2.4 MASSENSPEKTROMETRIE (MS)	16
2.4.1 Probeneinlasssystem	17
2.4.2 Ionenquelle	17
2.4.3 Massenanalysator	19
2.4.4 Detektor	21
2.5 FESTPHASENEXTRAKTION (SPE)	22
2.6 VALIDIERUNGSPARAMETER	23
2.6.1 Selektivität	23
2.6.2 Präzision	23
2.6.2.1 Messpräzision und Methodenpräzision	24
2.6.3 Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ)	24
2.6.4 Linearität	24
2.6.5 Verschleppung von Substanzen	25
2.6.6 Wiederfindungsrate	25
2.6.7 Matrixeffekte (ME)	26
3 FRAGESTELLUNG	29
3.1 PROBLEMSTELLUNG	29
3.2 ZIEL DIESER MASTERARBEIT	29

4	MATERIALIEN UND METHODEN	31
4.1	MATERIALIEN	31
4.1.1	Substanzen und Reagenzien.....	31
4.1.2	Geräte und Material	32
4.1.3	Herstellung der verwendeten Arbeitsmaterialien und -lösungen	34
4.1.4	Herstellung des internen Standards.....	35
4.1.5	Herstellung des SARM-Standards	36
4.1.6	Produktauswahl für die Validierung und für die Feldstudie.....	37
4.2	METHODEN.....	39
4.2.1	Entwicklung der Methode.....	39
4.2.2	Messsystem	40
4.2.3	Software	42
4.2.4	Probenvorbereitung	43
4.2.5	Durchführung der Validierungsparameter.....	45
4.2.5.1	<i>Selektivität</i>	45
4.2.5.2	<i>Präzision</i>	45
4.2.5.3	<i>Nachweis- und Bestimmungsgrenze</i>	46
4.2.5.4	<i>Linearität</i>	46
4.2.5.5	<i>Verschleppung von Substanzen</i>	46
4.2.5.6	<i>Wiederfindungsrate</i>	47
4.2.5.7	<i>Matrixeffekte</i>	47
4.2.6	Durchführung der Feldstudie	47
5	ERGEBNISSE	49
5.1	VORVERSUCHE UND OPTIMIERUNG DER METHODE.....	49
5.1.1	Initiale Methodentests	49
5.1.2	Puffer-pH-Wert Optimierung	50
5.1.3	Optimierung der Instrumentenmethode	53
5.2	ERGEBNISSE DER VALIDIERUNGSPARAMETER	54
5.2.1	Selektivität.....	54
5.2.2	Präzision	55
5.2.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	56
5.2.4	Linearität	58
5.2.5	Verschleppung von Substanzen	61
5.2.6	Wiederfindungsrate	62
5.2.7	Matrixeffekte	64
5.3	ERGEBNISSE DER FELDSTUDIE	66
6	DISKUSSION UND AUSBLICK.....	71
7	CONCLUSIO	77
8	ABKÜRZUNGEN	79
9	ABBILDUNGS-, TABELLEN- UND FORMELVERZEICHNIS.....	81
10	LITERATURVERZEICHNIS	83
11	ANHANG.....	89

1 Einleitung

Heutzutage können während eines Wettkampfes im Spitzensport oft geringfügige Leistungsunterschiede ausschlaggebend sein, um über Sieg oder Niederlage zu entscheiden. Dabei erhoffen sich viele Athleten diese oftmals minimal notwendige Leistungssteigerung durch den Konsum verschiedenster Nahrungsergänzungsmittel (NEM). Diese NEM werden immer häufiger über das Internet bezogen, ohne ausreichende Kenntnis darüber, ob das bestellte Produkt entsprechenden Qualitätsanforderungen und Sicherheitsstandards entspricht. Grundsätzlich können NEM in diverse Kategorien unterteilt werden: Sportnahrung (Gele, Riegel, Getränke, Proteinpulver), Vitamine und Mineralstoffe, pflanzliche Stoffe und Extrakte und ergogene Substanzen [1].

NEM sollen per Definition durch die Nahrungsergänzungsmittelverordnung (NEMV) die normale Ernährung ergänzen und bestehen aus Einfach- oder Mehrfachkonzentraten von Nährstoffen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung, welche in dosierter Form in Verkehr gebracht werden dürfen (§ 3 Z 4 Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz - LMSVG) [2]. Durch dieses Gesetz wurde die EU-Richtlinie 2002/46/EG in Österreich in nationales Recht umgesetzt [3].

Im Gegensatz zu Arzneimitteln unterliegen NEM keinen strengen Zulassungsvorgängen, weil sie in Europa unter das Gesetz der Lebensmittel fallen. Es finden daher weder Sicherheitsbewertungen noch Quantitäts- bzw. Qualitätsmessungen der einzelnen Produkte seitens der Behörden im Vorfeld statt. Der Produzent selbst ist damit für die Sicherheit und gesundheitliche Unbedenklichkeit der entsprechenden Produkte verantwortlich [4]. Jedoch ziehen entsprechende Gesundheitsbehörden, in Österreich zum Beispiel die Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES), jährlich zahlreiche Stichproben von den auf dem Markt erhältlichen NEM, welche anschließend auf Gehalt und Sicherheit analysiert und kontrolliert werden. In diesem Zusammenhang werden etwaige Mängel, beispielsweise aufgrund von Kennzeichnungsfehlern bzw. inkorrekten Werbeaussagen am Etikett, aber auch manchmal Produkte mit gesundheitsschädlichen Inhaltsstoffen erkannt und bis zur Behebung der Mängel vom Markt genommen. Besonders in Sportnahrungsergänzungsmitteln werden im Zuge dieser Untersuchungen immer öfter Verunreinigungen bzw. nicht deklarierte Inhaltsstoffe entdeckt. Doch diese Kontaminationen können aufgrund der österreichischen Gesetzgebung auch lange Zeit unentdeckt bleiben. Seit 2006 musste ein neu auf den Markt kommendes NEM-Präparat beim Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen (BASG) weder angemeldet noch registriert werden. Dies zählt auch für Produkte, welche über das Internet vertrieben werden [5].

Die Welt-Antidoping-Agentur (WADA) ist eine internationale Institution, welche sich zum Ziel gesetzt hat, dopingfreien Sport zu gewährleisten. Im Zuge dessen veröffentlicht die Agentur jährlich die sogenannte Verbotsliste (Prohibited List). In dieser Liste wird explizit auf dopingrelevante Substanzen und Methoden hingewiesen. Einige Substanzen davon sind nur während des Wettkampfes selbst, andere auch außerhalb davon in den Trainingsphasen dazwischen verboten und können, wenn in der Urin- oder Blutprobe nachgewiesen, zum Ausschluss des Sportlers aus dem Wettkampf führen. Interessanterweise fallen darunter auch einige Medikamente, welche für die Dauertherapie verschiedener Erkrankungen vorgesehen sind [6].

Vor rund 20 Jahren wurde die Substanzklasse der sogenannten Selektiven-Androgen-Rezeptor-Modulatoren (SARM) als anabole Stoffe für die Behandlung diverser Krankheiten entwickelt. Bis heute ist zwar keine dieser Substanzen als Arzneimittel zugelassen worden, aber ihre missbräuchliche Anwendung als Dopingmittel wurde rasch nicht nur im Bereich des Spitzensports erkannt, sondern findet auch im Amateursport immer häufiger Anwendung. Daraufhin wurde diese Stoffklasse von der WADA 2008 in ihre „Verbotsliste“ aufgenommen und somit als Dopingmittel deklariert [6,7].

Generell können diese „verbotenen Substanzen“ auf unterschiedliche Art und Weise in den Produkten vorkommen und somit vom Konsumenten manchmal unbeabsichtigt aufgenommen werden. Der Beikonsum dieser Substanzen bei der Einnahme von NEM wird als sogenannte Dopingfalle eingestuft. Einerseits können einige NEM mit solch dopingrelevanten Stoffen kontaminiert sein, ohne dass sie auf dem Etikett ausgewiesen werden oder der Produzent selbst Kenntnis darüber hat. Das ist meistens der Fall, wenn bereits kontaminierte Ausgangsstoffe für die Herstellung genutzt worden sind oder es zu einer Kreuzkontamination während des Herstellungsprozesses unter den Maschinen oder beim Verpackungs- bzw. Transportvorgang gekommen ist [8]. Andererseits können diese NEM eine höhere Menge dieser verbotenen Substanzen beinhalten, welche vom Hersteller wissentlich hinzugefügt worden ist, um eine entsprechende Leistungssteigerung zu erreichen. In manchen Fällen werden diese Substanzen am Etikett mit einer komplexen chemischen Bezeichnung oder einem weniger bekannten Synonym deklariert, um bei Konsumenten für Verwirrung zu sorgen. So kann es vorkommen, dass sich die Athleten über diese Inhaltsstoffe nicht informieren und der Konsum vermeintlich unwissentlich erfolgt [9]. Die Harnproben der Sportler werden aufgrund dessen nach Konsum solcher Produkte positiv auf diese Stoffe getestet. Dies wird als Adverse Analytical Finding (AAF) bezeichnet und von WADA-akkreditierten Laboratorien der verantwortlichen Sportsverbände sowie der WADA selbst berichtet. Laut der Metaanalyse von Kozhuharov *et al.* (2022) waren sogar 28% der untersuchten Sportnahrungsergänzungsmittel, welche aus dem Internet bestellt wurden, mit anabolen Substanzen versehen, die zu einem solch positivem Ergebnis führen können [10].

Um dieses unbeabsichtigte Dopingrisiko zu minimieren, wurde in Deutschland und in den Niederlanden eine Initiative gestartet, mit der den Sportlern Zugang zu Datenbanken über „saubere“ Produkte geschaffen wurde. Einzelne Chargen dieser NEM sind auf die Abwesenheit von dopingrelevanten Inhaltsstoffen wie Anabolika oder Stimulantien geprüft worden und können somit bedenkenlos im Wettkampf eingesetzt werden. In Deutschland sind die Produkte auf der sogenannten „Kölner Liste“ zu finden [9,11].

Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften der SARMs ist die Flüssigchromatographie (LC) mit einer anschließend geschalteten Massenspektrometrie (MS) die Analysenmethode, die laut Literatur zur Untersuchung dieser Substanzklasse in NEM am häufigsten verwendet wird. Mit dieser Messmethode kann man den Analyten auf wenige ng/g genau nachweisen und identifizieren. Dazu wird im Vorfeld eine entsprechende Probenaufbereitung durchgeführt, in der die Analyten aus der Matrix der NEM extrahiert werden und somit anschließend besser mittels LC-MS nachgewiesen werden können [12].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer möglichst umfassenden Analysenmethode, welche die derzeit gelisteten SARM auf der WADA-Verbotsliste erfasst. Den Athleten soll damit die Möglichkeit gegeben werden, sich vor solch einer Dopingfalle zu bewahren, indem die eingenommenen NEM analysiert werden können. Dadurch soll gezeigt werden, dass bei einem positiven Testresultat möglicherweise keine Dopingintention seitens des Sportlers vorlag. Des Weiteren werden nach der Validierung dieser entwickelten Methode ausgewählte Nahrungsergänzungsmittel auf das Vorkommen von SARM überprüft, um diese neue Analysenmethode in der Praxisanwendung zu verifizieren. Die untersuchten Sportnahrungsergänzungsmittel dafür stammen aus einer öffentlichen Apotheke bzw. spezifischen Sportnahrungsgeschäften aus Wien oder aus den Beständen der Seibersdorf Laboratories, welche im Zuge einer Untersuchung bereits im Vorfeld positiv auf einzelne Verbindungen dieser Substanzgruppe getestet wurden. Diese Produktgruppe aus Seibersdorf Laboratories wurden allesamt von Sportlern aus dem Internet bezogen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Selektive Androgen Rezeptor Modulatoren (SARM)

Der Androgen Rezeptor (AR) ist ubiquitär im menschlichen Körper lokalisiert, weshalb er gewebespezifische anabole und androgene Wirkungen aufweist. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die Stoffklasse der SARM als niedermolekulare Wirkstoffe entwickelt, um als Agonisten oder Antagonisten am AR neben den klassischen Androgenen wie Testosteron zu agieren.

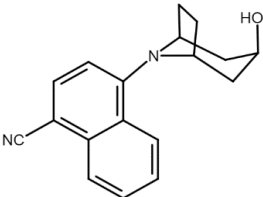
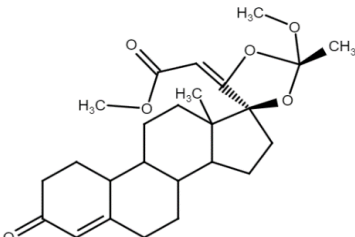
Sie bilden gleichsam wie die androgenen Steroidhormone mit dem intrazellulären AR einen Komplex, welcher anschließend in den Nucleus diffundiert, um dort spezifische Transkriptionsfaktoren, aber auch regulatorischen Proteine zu modulieren. Dadurch sind auch sie in der Lage das Muskel- und Knochenwachstum zu steigern, die Prostata zu verkleinern und das Brustkrebswachstum zu inhibieren [13].

Im Gegensatz zu Testosteron und der reduzierten Form Dihydrotestosteron (DHT), binden die SARM relativ selektiv an die Rezeptoren ihres Zielortes, weswegen die klassischen Nebenwirkungen der Steroidhormone wie Dyslipidämie, Gynäkomastie, Hepatotoxizität und Virilisierung bei Frauen nur schwach oder teilweise gar nicht auftreten. Außerdem erfolgt weder deren Umwandlung zu Östrogen durch die Aromatase noch die Reduktion zu DHT durch die 5 α -Reduktase, was ebenfalls die Nebenwirkungsrate verringert [14]. Betreffend ihrer chemischen Struktur sind SARM eine sehr heterogene Gruppe an Substanzen, welche aber grundsätzlich in zwei große Gruppen unterteilt werden können. Einerseits sind die Steroidalen SARM Abkömmlinge bzw. modifizierte Strukturen von Testosteron mit einem Steroidgrundgerüst. Andererseits kann bei den Nicht-steroidalen SARM Derivate von Arylpropionamiden, Benzimidazolen, Indolen, trizyklischen Strukturen, bizyklischen Hydantoinen bzw. Quinolinen, aber auch Strukturen mit einem Tetrahydroquinolingrundgerüst unterschieden werden [15]. Die Strukturen und Bezeichnungen der zwölf SARM, welche in dieser Arbeit in der Analysenmethode erfasst werden sollen, sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Namen, Synonyme, Strukturformel und IUPAC Name von Nicht steroidalen und steroidalen SARM

Name	Synonym	Formel	IUPAC Name
Andarin (nicht steroidal)	Acetamidoxolutamide; Androxolutamide; GTx-007; S-4		(2S)-3-(4-acetamidophenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]propanamide
S9 (nicht steroidal)	—		(2S)-3-(4-chloridophenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]propanamide
Ostarin (nicht steroidal)	Enobosarm, GTx-024; MK-2866; S-22		(2S)-3-(4-cyanophenoxy)-N-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxy-2-methylpropanamide

Name	Synonym	Formel	IUPAC Name
S1 (nicht steroidal)	—		(2S)-3-(4-fluorophenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]propanamide
S23 (nicht steroidal)	—		2S)-3-(4-chloro-3-fluorophenoxy)-N-[4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl]-2-hydroxy-2-methylpropanamide
GSK2881078 (nicht steroidal)	—		(R)-(1-(methylsulfonyl)propan-2-yl)-4-(trifluoromethyl)-1H-indole-5-carbonitrile
LGD 3033 (nicht steroidal)	—		9-chloro-2-ethyl-1-methyl-3-(2,2,2-trifluoroethyl)-3H-pyrrolo(3,2-f)quinolin-7(6H)-one
LGD 4033 (nicht steroidal)	Ligandrol, VK5211		4-(2-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxyethyl)pyrrolidin-1-yl)-2-(trifluoromethyl)benzonitrile
RAD140 (nicht steroidal)	Vosilasarm, EP0062; Testolone		2-chloro-4-(((1R,2S)-1-(5-(4-cyanophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-2-hydroxypropyl)amino)-3-methylbenzonitrile
ACP-105 (nicht steroidal)	—		2-chloro-4-(3-hydroxy-3-methyl-8-azabicyclo(3.2.1)oct-8-yl)-3-methylbenzonitrile

Name	Synonym	Formel	IUPAC Name
AC262536 (nicht steroidal)	—		4-(3-hydroxy-8-aza-bicyclo(3.2.1)octyl)naphthalene-1-carbonitrile
YK-11 (steroidal)	—		17,20-((1-methoxyethylidene)bis(oxy))-3-oxo-19-norpregna-4,20-diene-21-carboxylic acid methyl ester

Wie bereits angeführt wurde noch kein Vertreter der SARM als Arzneimittel auf dem Markt zugelassen. Einige werden aktuell in präklinischen oder klinischen Untersuchungen ausgetestet. Die folgenden Unterkapitel geben einen interessanten Überblick der durch Studien belegten Wirkungen und der möglichen zukünftigen Einsatzgebiete bei diversen Erkrankungen von ausgewählten SARM. Anschließend folgt im nächsten Kapitel eine kurze Zusammenfassung über den Missbrauch der SARM als Dopingmittel.

2.1.1 Osteoporose

Die momentane First-Line-Therapie bei Osteoporose stellt die antiresorptive Therapie dar, welche sich hauptsächlich durch die Hemmung der Osteoklasten auszeichnet. Osteoklasten sind die Knochenzellen, welche für den Abbau der Knochensubstanz verantwortlich sind [16]. Im Gegensatz zu dieser Therapie sind manche SARM wie YK-11 in der Lage, über ihre Wirkung am AR im Knochengewebe zumindest in-vitro die Knochenmasse zu erhöhen. Sie fördern die Mineralisierung der Knochenmatrix durch Steigerung der Aktivität der Osteoblasten, welche die Knochenstrukturen aufbauen. Yatsu *et al.* (2018) untersuchten YK-11 an murinen Osteoblastenzellen und stellten fest, dass die Konzentrationen sowohl knochenaufbauender Marker als auch Differenzierungs- und Proliferationsproteine der Osteoblasten, wie zum Beispiel das Osteoprotegerin und das Osteocalcin, dadurch erhöht wurden [17]. Aktuell befindet sich zwar YK-11 nicht in klinischen Studien, dennoch wird es frei verkäuflich übers Internet ohne jegliche Einschränkung angeboten [7].

2.1.2 Benigne Prostata Hyperplasie (BPH)

Durch die Eigenschaft der SARM den AR zu aktivieren, gibt es vielversprechende Tierversuche in der Therapie einer BPH. Dabei wird die entzündungshemmende Wirkung durch die Aktivierung des AR lokal in der Prostata ausgenutzt. Gao *et al.* (2004) verglichen die SARM S1 und S4 mit den derzeitigen BPH-Therapeutika Finasterid und Hydroxyflutamid im Rattenmodell. Sie stellten fest, dass das Gewicht der Prostata durch S1 genauso wie durch Finasterid reduziert werden konnte, ohne dass Konzentrationserhöhungen des Plasmatestosterons, des Folikelstimulierenden Hormons (FSH) oder des Luteinisierenden Hormons (LH) auftraten, was allerdings bei der Behandlung mit Hydroxyflutamid beobachtet wurde. Beide SARM waren dazu zusätzlich noch in der Lage die 5 α -Reduktase zu reduzieren, was den Schluss nahelegt, dass das Prostatagewicht auf andere Weise als unter Finasteridgabe aufgrund eines anderen Effektes gesenkt wurde. Diese Ergebnisse zeigen den potenziellen Nutzen der SARM in der Therapie der BPH mit geringen Nebenwirkungspotential aufgrund selektiver Bindung am AR in der Prostata auf [18].

2.1.3 Kachexie

Als Folge von chronischen Krankheiten oder deren Behandlung tritt oft eine Kachexie im Rahmen von HIV, Krebserkrankungen, Immobilisation oder unter chronischer Kortisontherapie auf. Bei diesem multifaktoriellen Problem verlieren die Patienten ungewollt Muskelmasse und reduzieren dabei krankhaft ihr Gewicht. Einige SARM zeigten in Tierstudien, dass sie in der Lage sind, sowohl die Synthese von kontraktilen Muskelproteinen wie Aktin und Myosin als auch die Biosynthese von Muskelmitochondrien zu fördern. Im Zuge der präklinischen Versuche von Shankaran *et al.* (2015) wurde eine neuere Verbindung der SARM GSK2661212A an einem ovariectomierten Rattenmodell ausgetestet. Dabei zeigte GSK2661212A eine dosisabhängige Steigerung diverser Muskelproteine [19].

Des Weiteren wurden aktuell vielversprechende klinische-Phase-III-Untersuchungen mit Ostarin, auch Enobosarm genannt, durchgeführt. In diesen randomisierten, doppelblinden, Placebo kontrollierten und multizentrischen Studien wurde erforscht, dass Ostarin die Lean-Body-Mass (LBM) von Kleinzell-Lungenkarzinompatienten signifikant erhöhen kann. Obwohl die Muskelmasse der Teilnehmer durch die Gabe von Ostarin deutlich gesteigert werden konnte, wurde dennoch keine Verbesserung der physiologischen Funktion gemessen. In diesen Untersuchungen wurde die Fähigkeit Treppen mehrmals auf- und abzustiegen als Parameter der physiologischen Funktion definiert [20]. Wegen dieser unzureichenden Verbesserung wurde

das Resultat der SARM im Gesamten als unzureichend bewertet und sie wurden dadurch nicht in weiteren klinischen Studien erforscht. Damit SARM doch für die Indikation Kachexie in Erwägung gezogen werden können, meint der Autor James T. Dalton, dass zusätzliches Krafttraining der Patienten notwendig wäre, um doch eine Korrelation zwischen Erhöhung der LBM und der Steigerung der physiologischen Funktion herzustellen [21].

2.1.4 Brustkrebs

Noch bevor die derzeitigen aktuellen Therapien für das Mammakarzinom, unter anderem die Selektiven-Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) und die Aromatase-Inhibitoren, etabliert worden sind, wurden AR-positive Brusttumoren mit steroidalen Androgenen wie Medroxyprogesteron und Fluoxymesteron behandelt. Eine hohe AR-Expression im Brustgewebe steht dabei im Zusammenhang mit einer längeren krankheitsfreien Phase und einer allgemein höheren Überlebensrate der Patienten, da der AR als Tumor-Suppressor gegenüber der Wirkung des Östrogenrezeptors (ER) wirkt. Unter Androgengabe kam es jedoch auch sehr häufig zu erhöhten Nebenwirkungsauftritten wie Virilisierung der weiblichen Patienten, weshalb daraufhin die Therapie immer öfter abgebrochen wurde [22]. Enobosarm wurde in dieser Phase-II-Untersuchung zusammen mit dem Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab an Patientinnen mit AR-positiven und dreifach-negativen Brustzellkarzinom verabreicht. Diese Tumoren der Patientinnen sind sehr aggressive Karzinome und wurden bereits im Vorhinein mit anderen Medikamenten jedoch ohne ausreichenden Erfolg behandelt. Obwohl die Studie früher als geplant aufgrund der Rücknahme der Enobosarm-Bereitstellung abgebrochen wurde, fiel das Ergebnis durchaus positiv aus, da zumindest vier der sechzehn Teilnehmerinnen ein positives klinisches Endresultat erzielten und die Kombination eines SARM mit einem Immuncheckpoint-Inhibitor gute Verträglichkeit zeigte. Allerdings konnte aus statistischer Sichtweise die Nullhypothese nicht verworfen werden, da keine signifikante Besserung vorlag und somit der Endpunkt nicht erreicht wurde [23].

2.2 Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA)

Die WADA wurde 1999 als eine international unabhängige Agentur von Mitgliedern des Internationalen Olympischen Komitees (IOC) gegründet, mit der Intention sich für dopingfreien Sport in der Welt einzusetzen. Ihr Ziel ist es Anti-Doping Regeln und Programme über alle Sportarten hinweg zu harmonisieren und sie in allen beteiligten Ländern umzusetzen. Dabei soll sichergestellt werden, sobald sich eine nationale oder internationale Anti-Doping

Organisation oder eine andere Autorität durch Unterschrift dazu verpflichtet, dass der Welt-Anti-Doping-Code (WADC) anerkannt und eingehalten wird, um sauberen Sport zu garantieren. Das Herzstück der WADA bildet neben der Verbotsliste (Prohibited List) eben dieser WADC samt internationalen Standardprotokollen [24].

2.2.1 Welt-Anti-Doping-Code (WADC)

Der WADC ist das Kerndokument, welches die allgemeinen Regeln und Prozeduren im Anti-Doping Sektor während und außerhalb eines Wettkampfes organisiert und beschreibt. Er wird in vier Teile unterteilt: DOPING CONTROL, EDUCATION AND RESEARCH, ROLES AND RESPONSIBILITIES und ACCEPTANCE, COMPLIANCE, MODIFICATION AND INTERPRETATION.

Im ersten Teil wird definiert, was unter Doping verstanden wird, wie ein Verstoß zustande kommt und welche Sanktionierungen bei positivem Ergebnis zu treffen sind. Des Weiteren wird die Beweisführung und auch der Ablauf eines Anti-Doping-Verfahrens beschrieben. Somit ist genau geregelt, dass der Athlet selbst dafür verantwortlich ist, was in seiner Probe und damit in seinem Körper nachgewiesen wird. Detektierte verbotene Substanzen, Metaboliten oder Marker davon, werden ausnahmslos als Code-Verletzung geahndet. Bei positivem Befund oder auch bei drei verpassten Probenabnahmen, wird der Sportler daraufhin in Abhängigkeit der Schwere des Vergehens, für eine definierte Zeit gesperrt. Während eines Wettkampfes wird im Teamsport bei mehr als zwei Personen, welche einen Regelverstoß begangen haben, das ganze Team je nach Ausmaß des Vergehens sanktioniert bzw. disqualifiziert. Hinzu kommt, dass der Athlet rund um die Uhr für eine Testung zur Verfügung stehen und seinen Aufenthaltsort drei Monate im Voraus festlegen und angeben muss, um für eine unangekündigte Testung zur Verfügung zu stehen. Weiters ist enthalten, dass die Analysen der Proben der getesteten Sportler nur von einem von der WADA akkreditierten und genehmigten Labor durchgeführt werden dürfen.

Im zweiten Teil wird aufgelistet, dass Schulungen und Aufklärungen der Athleten bezüglich der Anti-Doping Regeln stattfinden sollen. Außerdem wird zur Weiterbildung in diesem Sektor aufgerufen.

Im dritten Teil folgt die Zuteilung der Zuständigkeiten und der Verantwortungsbereiche der einzelnen Organisationen. Zum Beispiel verpflichten sich nationale Behörden, wie die Nationale-Anti-Doping-Agentur-Austria (NADA Austria), welche durch das nationale Antidoping-Bundesgesetz in Österreich implementiert wurde, zur Einhaltung und Umsetzung des WADCs.

Die NADA Austria hat ebenfalls die Aufgabe repressiv und präventiv in Einklang mit dem WADC und den internationalen Standards den Schutz des dopingfreien Sportes auf nationaler Ebene zu wahren und bei nationalen Wettkämpfen als Aufsichtsbehörde zu fungieren.

Im letzten Teil wird die Implementierung des WADC und eine anschließende Begriffsdefinition beschrieben und angeführt [25].

2.2.2 Verbotsliste (Prohibited List)

Die „Verbotsliste“ (siehe Anhang) ist ein verbindlicher internationaler Standard, wird einmal jährlich von der WADA publiziert und tritt ab 01.01. des folgenden Jahres in Kraft. Sie setzt sich aus einer Auflistung von Substanzen und Methoden zusammen, welche von der WADA als Doping deklariert und somit auf keinen Fall in der Probe des Sportlers nachgewiesen bzw. als Methode angewendet werden darf. Grundsätzlich beinhaltet die Liste zehn Substanzklassen (S0-S9), drei Methodenklassen (M1-M3) und eine Substanzklasse (P1), welche nur in bestimmten Sportarten, wie zum Beispiel im Bogenschießen oder im Darts, verboten ist. Zusätzlich wird unterschieden, welche Substanzklassen nur während eines Wettkampfes oder zu allen Zeiten verboten sind. Folgende Klassen an Substanzen und Methoden sind zu jeder Zeit verboten:

S0 Nicht zugelassene Substanzen

S1 Anabole Substanzen

S2 Peptidhormone, Wachstumsfaktoren, verwandte Substanzen und Mimetika

S3 Beta-2-Agonisten

S4 Hormon- und Stoffwechsel-Modulatoren

S5 Diuretika und Maskierungsmittel

M1 Manipulation von Blut und Blutbestandteilen

M2 Chemische und physikalische Manipulation

M3 Gen- und Zelldoping

Folgende Substanzklassen sind nur innerhalb eines Wettkampfes verboten:

S6 Stimulanzien

S7 Narkotika

S8 Cannabinoide

S9 Glucocorticoide [6]

Die Gruppe P1 beinhaltet die Beta-Blocker und nimmt, wie bereits beschrieben eine Sonderstellung unter den Klassen ein, da sie nur in bestimmten Sportarten nicht angewendet werden darf. Die Gruppe S1 „Anabole Substanzen“ ist aufgeteilt in S1.1 die anabolen androgenen Steroide und S1.2 andere anabole Wirkstoffe. In S1.1 sind Substanzen wie Testosteron oder Stanozolol mit klassischen Steroidgrundgerüst und in S1.2 die SARM samt Beispielen und Clenbuterol aufgelistet. Generell unterscheidet die Liste zusätzlich noch zwischen spezifischen Substanzen und nichtspezifischen Substanzen. Spezifische Substanzen können gegeben falls auch im Zuge einer Medikamenteneinnahme aufgenommen worden sein, während bei nicht-spezifischen Substanzen der Verdacht nahe liegt, dass diese zwecks Leistungssteigerung vom Sportler eingenommen worden sind. Gerade bei der Einnahme eines Arzneimittels aus dieser Liste, sollte vom Athleten eine sogenannte „Ausnahme zum therapeutischen Gebrauch“- Bestätigung (Therapeutic Use Exemption, TUE) bei der entsprechenden nationalen oder internationalen Behörde rechtzeitig vor dem Wettkampf beantragt werden, um eine offizielle Erlaubnis für die Einnahme des Medikamentes für die Therapie zu erhalten [6,25].

2.2.3 SARM-Missbrauch als Dopingmittel

Aufgrund des anabolen Effektes und des geringeren Auftretens von androgenen Nebenwirkungen im Vergleich zu den klassischen Anabolika, wurde die Stoffgruppe der SARM in die Sportszene integriert. Vor allem Leistungssportler und Bodybuilder profitieren von der schnellen Verfügbarkeit diverser Produkte über den Schwarzmarkt beziehungsweise über das Internet [26]. Hinzukommend bietet die einfache Applikation durch orale Einnahme, im Gegensatz zu diversen anabolen Steroiden wie beispielsweise Nandrolon und Metenolon welche oftmals intramuskulär injiziert werden, einen weiteren Vorteil. Bei der Verbreitung der SARM tragen vor allem die sozialen Netzwerke und diverse Influencer einen großen Teil zu diesem besorgniserregenden Trend bei [27].

Leaney *et al.* (2021) analysierten 20 NEM von zwölf verschiedenen Produzenten, welche frei verfügbar über das Internet in Großbritannien bestellt wurden. Jedes Produkt sollte laut Aufschrift zumindest einen SARM enthalten. Das Ergebnis dieser Studie zeigte, dass in einem dieser Produkte keine wirksamen SARM-Verbindungen detektiert worden sind, obwohl es am Etikett angepriesen wurde. In anderen NEM wurden zusätzliche Substanzen, die ebenfalls auf der Verbotsliste stehen, entdeckt. Zudem wichen die Konzentrationen der SARM in manchen Produkten deutlich von der auf der Inhaltsstoffliste angegebenen, ab. Auch wenn die Konzentration der deklarierten SARM bei manchen NEM mit der Analyse übereinstimmte, müssen die

Angaben zur angeführten Tagesdosis kritisch hinterfragt werden, da derzeit keine ausreichende Datenlage zur Toxizität und Sicherheit der SARM vorhanden ist [28].

In den kommenden Jahren wird zu den aktuellen Herausforderungen in der Dopinganalyse auch die Identifizierung und die Charakterisierung der einzelnen Metaboliten der SARM zählen. Die Heterogenität der chemischen Strukturen und die Kenntnis der unterschiedlichen Verstoffwechselungsprozesse in pharmakokinetischer Hinsicht einzelner SARM via Phase I- und Phase II-Reaktionen stellen derzeit die größten Herausforderungen im Nachweis der SARM in den Proben der Sportler dar [29].

2.2.3.1 Statistik der SARM-Fälle (WADA-Bericht)

SARM gehören, wie bereits erwähnt zur S1-Gruppe der WADA-Verbotsliste, genauer gesagt, zum Punkt 1.2 Andere anabole Substanzen. Laut aktuellstem Statistikbericht der WADA wurden im Jahr 2021 insgesamt 2197 Substanzen als AAF dem WADA-Reportsystem Anti-Doping Administration & Management System (ADAMS) von akkreditierten Laboren gemeldet, von denen knapp die Hälfte mit 40% die Gruppe der anabolen Substanzen ausgemacht hat. Davon wiederum machten rund zwölf Prozent die Untergruppe der anderen anabolen Substanzen aus. Jedoch waren im Jahr 2021 nur fünf SARM gelistet, von denen Ostarin und das LGD-4033 (Ligandrol) knapp die Hälfte der nachgewiesenen Dopingfälle ausgemacht haben [30].

Tabelle 2: Statistik der Fälle aus dem WADA-Bericht im Laufe der Jahre [30].

Jahr	Analysierte Proben (Gesamtzahl)	Anzahl AAF (% bezogen auf Gesamtzahl)	Anzahl Anabolika (% bezogen auf Gesamtzahl AAF)	Anzahl andere Anabolika (inkl. SARMs) (% bezogen auf Anzahl Anabolika)
2017	245 232	4067(1,66%)	1813 (45%)	376 (21%)
2018	263 519	4117 (1,56%)	1823 (44%)	406 (22%)
2019	278 047	4180 (1,5%)	1825 (44%)	356 (20%)
2020	149 758	1 513 (1,01%)	704 (47%)	107 (15%)
2021	241 430	2197 (0,91%)	875 (40%)	106 (12%)
2022	256 769	2680 (1,04%)	1124 (42%)	151 (13%)

2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Chromatographie ist ein Trennverfahren, bei dem einzelne Komponenten (Analyten) in einem komplexen Stoffgemisch zwischen zwei Phasen aufgetrennt werden können. Dabei ist die sogenannte „stationäre“ Phase immobil und besteht aus einem Feststoff (Adsorbens) oder einer Flüssigkeit. Die „mobile“ Phase fließt dabei durch die stationäre Phase hindurch und setzt sich entweder aus einem Gas (Gaschromatographie) oder ebenfalls aus einer Flüssigkeit (Flüssigkeitschromatographie) zusammen, welche nicht mit der stationären Phase mischbar ist. Je nach physikochemischen Eigenschaften der Analyten besitzen diese eine höhere Affinität zu einer der beiden Phasen. Wenn die Substanzen mit der stationären Phase stärker wechselwirken, werden sie dadurch stärker zurückgehalten und nur verzögert eluiert. Diese Unterschiede in den Eigenschaften können die Polarität, die Ladung oder sogar die Größe betreffen [31,32].

Die Kombination aus Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS, siehe Kapitel 2.4) stellt eine qualitative und quantitative Analysenmethode dar, die heutzutage der Goldstandard zum Nachweis in der Spurenanalytik ist. Der generelle Aufbau einer HPLC wird in Abbildung 1 dargestellt und kurz beschrieben [33].

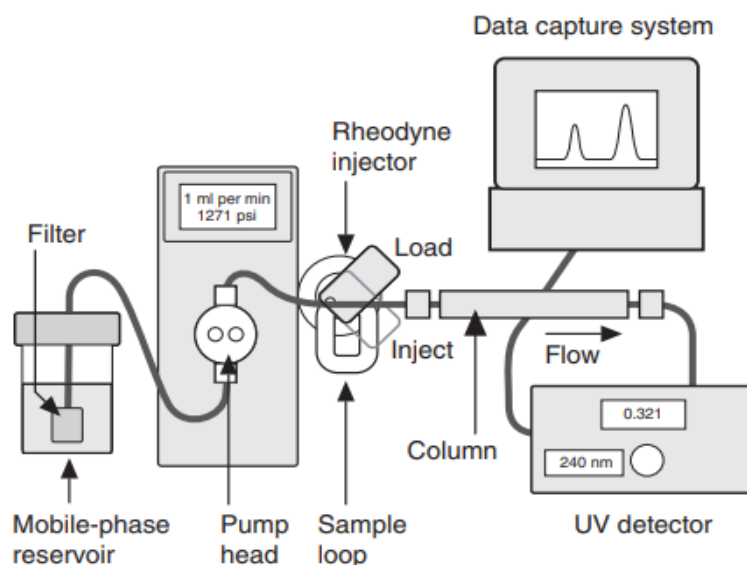


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines HPLC-Systems [33]

Die klassische HPLC-Anlage besteht zunächst aus einem Lösungsmittelreservoir, welches meist mit einem Filtersystem und eventuell einem Entgaser ausgestattet ist. Eine Hochdruckpumpe saugt ein Gemisch an Lösungsmitteln aus den Vorratsbehältnissen an und leitet es mit einem Druck von ungefähr 100-500 bar kontinuierlich weiter. Moderne Systeme können an dieser Stelle einen Lösungsmittelgradienten durch Mischung verschiedener Mengen an

Fließmitteln erzeugen. Der herkömmliche Schleifeninjektor wird in den meisten Geräten bereits von einem Autosampler ersetzt. Dieser injiziert in den Fluss der mobilen Phase ein festgelegtes Volumen von 1-200 μL . Anschließend folgt die eigentliche chromatographische Trennung an der gepackten Säule. Die darin enthaltene stationäre Phase, welche meist aus einem Silicagel mit Partikeln in der Größe von 3-10 μm besteht, kommt in Kontakt mit der durchfließenden mobilen Phase und hält den Analyten je nach Wechselwirkung entsprechend zurück. Danach folgt der Detektor, welcher nach der Auftrennung des Substanzgemisches zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Analyten registriert und in ein messbares Signal umwandelt. In dieser Arbeit wird statt des Detektors ein MS-Gerät geschaltet, welches zur weiteren Analyse der Substanzen dient (siehe Kapitel 2.4). Zum Steuern der Geräte und zur Verarbeitung der erfassten Signale des Detektors wird ein Computer mit einer entsprechenden Software angewendet. Das Ergebnis wird in Form eines Chromatogramms in Abhängigkeit der Zeit graphisch dargestellt. Die Zeit, die der Analyt nach Injektion bis zum Detektor benötigt, wird als sogenannte Retentionszeit (R_t) bezeichnet [33].

2.3.1 Stationäre Phase

Die Trennsäulen, welche meist aus Edelstahl bestehen, besitzen im Normalfall eine Länge von 5-25cm und einen inneren Durchmesser von 2-5mm. Darin befindet sich die stationäre Phase, welche einen Überzug über porösen Partikeln oder über Glas oder Kunststoffkügelchen bildet. Die stationäre Phase ist in den meisten Fällen ein (modifiziertes) Silicagel, welches hauptsächlich polare Wechselwirkungen eingehen kann. Je nach Polarität und Modifikation des Kieselgels können zwei Formen unterschieden werden [31].

2.3.1.1 Normalphasen-HPLC (NP-HPLC)

Bei der NP-HPLC wird reines Kieselgel als stationäre Phase verwendet (siehe Abbildung 2). Die Silanolgruppen der gepackten Silicasäule gehen polare Wechselwirkungen, unter anderem Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen mit den polaren Gruppen des Analyten ein. Zusätzlich kann eine Modifikation des Kieselgels mit funktionellen Gruppen wie einer Diol-, Cyano-, oder Aminogruppe erfolgen. Durch diese Adsorption der Analysesubstanzen an der Oberfläche werden die Analyten entsprechend retardiert und eluieren erst verzögert von der stationären Phase. Die mobile Phase setzt sich bei der NP-HPLC ausschließlich aus unpolaren Lösungsmitteln, wie beispielsweise n-Heptan, Chloroform oder Tetrahydrofuran zusammen [31].

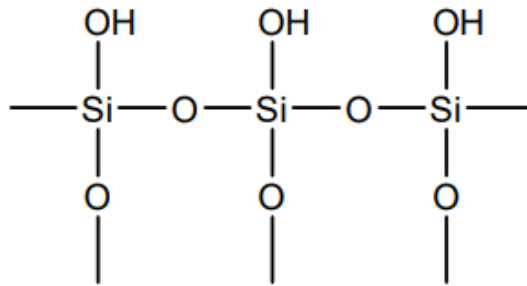


Abbildung 2: Struktureller Aufbau eines Kieselgels

2.3.1.2 Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC)

Im Gegensatz zur NP-HPLC kommen in der Umkehrphasen-HPLC (Reversed Phase – HPLC) unpolare stationäre Phasen zum Einsatz. Dabei interagiert der Analyt mit der stationären Phase hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräfte oder Dispersionskräfte und wird dadurch in der Säule zurückgehalten. Neben verfügbaren organischen Polymeren besteht die stationäre Phase meistens aus einem apolar modifizierten Silicagel, da an die endständigen Silanolgruppen ein Alkylrest bestimmter Kettenlänge (C8, C18, C30) oder eine funktionelle hydrophobe Gruppe angehängt wird. In den meisten Fällen wird eine C18-Kette chemisch daran umgesetzt, weswegen die Phase als Octadecylsilan (RP-18) bezeichnet wird. Aufgrund von sterischen Limitationen wird aber nicht jede Silanolgruppe mit einer Alkylkette bestückt, deswegen werden die freigebliebenen OH-Gruppen mit einem Trimethylsilylrest versehen, um polare Interaktionen zu verhindern. Dieser Vorgang wird als End-Capping bezeichnet (siehe Abbildung 3). Die mobile Phase besteht hier aus Mischungen von polaren Lösungsmitteln mit unterschiedlicher Elutionskraft [31,34].

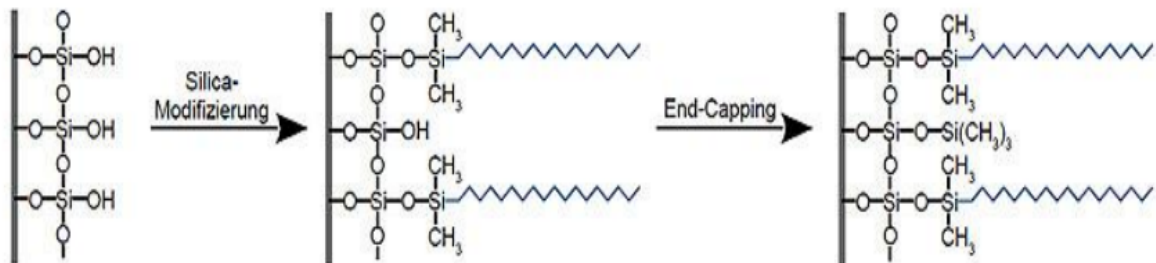


Abbildung 3: Prozessschritte der chemischen Modifizierung eines Silicagels [35]

2.3.2 Mobile Phase

Die mobile Phase besteht in der Regel aus mehreren Lösungsmitteln. Bei der RP-HPLC wird zum Beispiel oft eine Mischung aus Wasser, Methanol oder Acetonitril als polare mobile Phase genutzt. Voraussetzung ist, dass der Analyt in diesem Lösungsmittelgemisch gelöst wird, um eine gute Auftrennung zu gewährleisten. Bei einer Gradientenelution kann sich die Zusammensetzung der mobilen Phase innerhalb der Messung ändern, sodass der Messvorgang verkürzt wird, ohne die Auflösung der frühen Peaks zu verringern. Im Gegensatz dazu wird der Prozess als isokratische Elution bezeichnet, wenn die Zusammensetzung der mobilen Phase nicht variiert und damit die Elutionskraft über den gesamten Vorgang konstant bleibt. Weiters kann eine Temperatursteigerung im Säulenofen bei der HPLC zur Verkürzung der Elutionszeit einiger Komponenten eingesetzt werden. Grundsätzlich spielt die Temperaturregulierung bei der HPLC aber eine untergeordnete Rolle und ist nur notwendig, wenn die Probe oder das Elutionsmittel zu viskos sind und andere Mittel zur Beschleunigung (Lösungsmittelgradient, Durchflusserhöhung) bereits ausgeschöpft wurden. Vor Einbringung in HPLC-System müssen die Eluenten jedenfalls zusätzlich noch entgast werden, um Gasblasen zu vermeiden. Diese wirken sich destabilisierend auf die Retentionszeit aus [31].

2.4 Massenspektrometrie (MS)

Das Massenspektrometer dient in diesem Fall als Detektor. Durch die MS ist es möglich, Ionen oder Moleküle in der Gasphase nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) aufzutrennen, dadurch Substanzen zu identifizieren und ihre Struktur aufzuklären. Grundsätzlich besteht ein Massenspektrometer aus mehreren Komponenten, welche von System zu System variieren können [31]. Eine generelle schematische Darstellung ist in Abbildung 4 dargestellt.

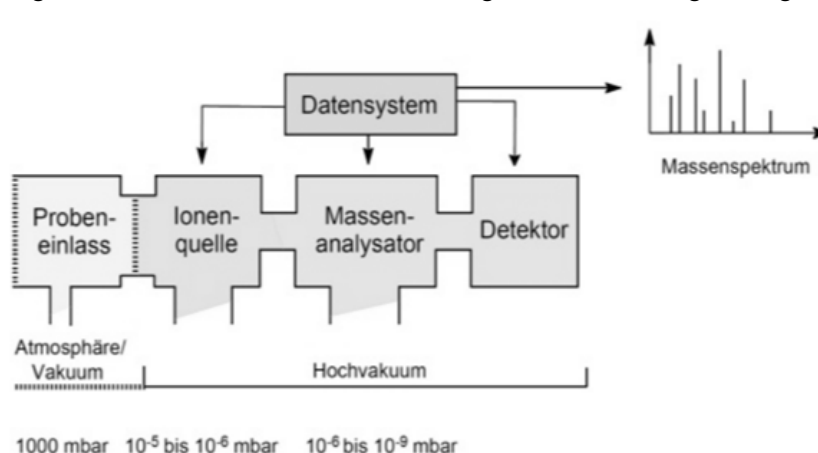


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers [36]

Jedes Massenspektrometer besteht aus einem Probeneinlass, einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Ionendetektor. Um den Analyten nach der HPLC in die Gasphase zu bringen, können verschiedene Ionisierungsmethoden eingesetzt werden. Durch unterschiedliche Methoden werden dabei aus den eingeführten Probemolekülen positiv- oder negativ-geladene Ionen generiert. Diese erzeugten geladenen Teilchen werden zum Massenanalysator durch ein elektrisches Feld beschleunigt, wo sie mit Hilfe eines angelegten elektromagnetischen Feldes nach ihrem m/z -Verhältnis separiert werden. Dazu wird ein Hochvakuum im Massenspektrometer angelegt, um eine Kollision der geladenen Ionen mit Molekülen aus der Luft zu verhindern. Anschließend folgt durch diese Ablenkung eine Registrierung des massenspezifischen Signals an einem Detektor. Das Signal wird nach Amplifikation für eine intensivierte Detektion proportional zur Anzahl der Ionen als Massenspektrum ausgegeben [31,37].

2.4.1 Probeneinlasssystem

Beim Einlasssystem ins Massenspektrometer können generell zwei verschiedene Arten in Abhängigkeit der Flüchtigkeit der Substanzen definiert werden: der direkte und der indirekte Probeneinlass. Beim direkten Probeneinlass werden die schwer verdampfenden Substanzen direkt eingeschleust und erst im Massenspektrometer durch Erhitzen verflüchtigt. Im Gegensatz dazu steht der indirekte Einlass, bei dem leichtflüchtige Komponenten vorher in einem Vorratsbehälter verdampft werden und als Gas eingeführt werden. Bei beiden Varianten entstehen vorerst neutrale Moleküle. Das Vakuum im Massenspektrometer ist notwendig, damit es zu keiner Überlagerung der Signale des Luftsauerstoffs oder -Stickstoffs mit den Ionensignalen der Probe kommt, um etwaige Streueffekte dieser Gasteilchen im Massenspektrometer zu vermeiden. Im Falle moderner Systeme, welche auch in dieser Masterarbeit zum Einsatz kommen, wird das Einlasssystem vollkommen von der HPLC ersetzt, da die zwei Trennsysteme miteinander gekoppelt sind. Direkt nach der Elution von der HPLC-Säule werden die Analyten somit im Massenspektrometer verdampft und in der Gasphase in die Kapillare zur Ionisierung überführt [37].

2.4.2 Ionenquelle

Generell kommen je nach Gerät und Ausstattung verschiedene Ionisierungstechniken zum Einsatz. Man unterscheidet unter anderem dabei zwischen harten und weichen Techniken. Bei harten Ionisierungstechniken werden zusätzlich zu den entstandenen Ionen noch zahlreiche Fragment-Ionen durch Kollision mit energiereichen Elektronen gebildet. Weiche

Ionisierungstechniken sind dagegen schonender für die Probe, da beispielsweise Proteine in ihrer Struktur erhalten bleiben. Die Ionen entstehen hierbei durch thermische oder elektrische Kräfte oder energiearme Ionen, jedoch werden kaum bis gar keine Molekülfragmente gebildet. Die dabei entstandenen Quasimoleküle ermöglichen zusammen mit ihren erzeugten Molekülpeaks die Zuordnung des Molekulargewichts [37].

Zusätzlich zu harten und weichen Techniken werden die verschiedenen Methoden nach angewandtem Druck unterschieden. Wird das Massenspektrometer mit einer davor geschalteten Gaschromatographie (GC) gekoppelt, werden die Substanzen direkt in ihrer Gasphase im Hochvakuum mittels Elektronenstoßionisation (EI) oder der chemischen Ionisierung (CI) geladen. Wenn die MS mit einer Flüssigkeitschromatographie gekoppelt ist, kann die Ionisierung entweder durch Elektrospray-Ionisation (ESI) oder chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) stattfinden [31]. Aufgrund der Anwendung der ESI als Ionisierungstechnik in dieser Arbeit wird diese Methode im Folgenden genauer erläutert.

Am Ende der HPLC werden die Analyten, welche gelöst in der mobilen Phase vorliegen, in eine Metallkapillare befördert, an deren Spitze eine Hochspannung eines elektrischen Feldes von 3-6 kV angelegt wird. An dieser Stelle kommt es durch die Wahl der Polarität und der angelegten Spannung entweder zur Protonierung und damit zur Bildung von positiv geladenen Ionen $[M+H]^+$ oder zur Deprotonierung und somit negativ geladenen Ionen $[M-H]^-$. Durch die hohe angelegte Spannung entsteht an der Spitze der Kapillare ein feiner Sprühnebel der Molekül-Ionen zur gegenüberliegenden Elektrode, welche eine gegensätzliche Polarität aufweist. Beim Austritt aus der Kapillare bilden sich aufgrund dessen geladene Moleküle, welche als Aerosol vernebelt und über die Entstehung eines Taylor-Kegels zur gegenüberliegenden Elektrode beschleunigt werden. Das vorhandene Lösungsmittel wird durch Anlegen einer Wärmequelle und durch das Einbringen eines warmen inerten Gases, in den meisten Fällen Stickstoff, abgedampft und zerstäubt, weswegen die geladenen Moleküle im Aerosol immer näher aneinanderrücken. Sobald die Ladungsdichte in den Tröpfchen so hoch wird, dass dadurch die Rayleigh-Grenze erreicht wird, kommt es zu sogenannten Coulomb-Explosionen und es bilden sich immer weiter verkleinernde Tröpfchen. Dieser Vorgang wiederholt sich so oft bis es zur Aufspaltung der kleinsten Tröpfchen kommt, aus welchen die geladenen Ionen schließlich selbst in ihrer Gasphase zur gegenüberliegenden Elektrode wandern. Anschließend werden sie zum Massenanalysator über ein stufenweise aufgebautes Hochvakuum geleitet [31,37,38]. Die Abbildung 5 zeigt den Vorgang einer ESI schematisch.

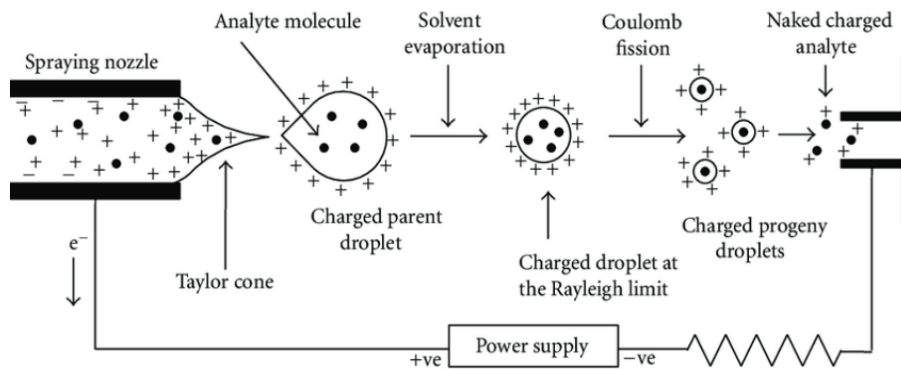


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Elektrospray-Ionisation [38]

2.4.3 Massenanalysator

Der Massenanalysator bildet das Herzstück der MS und dient zum Auftrennen der Ionen gemäß ihrer m/z -Verhältnisse. Gleichsam wie bei der Ionenquelle gibt es bei diesen Geräten unterschiedliche Typen von Analysatoren. Time-of-Flight (TOF) Masseanalysatoren nutzen das physikalische Prinzip, dass sich unterschiedlich schwere Ionen verschieden schnell durch ein elektrisches Feld bewegen. Bei Ionenfallen (Ion trap) wiederum werden bestimmte Ionen aufgrund ihrer Masse durch ein magnetisches Feld zurückgehalten und nur spezifische Massen zum Analysieren zum Detektor weitergeleitet [31]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Triple-Quadrupol-Analysator verwendet, weswegen an dieser Stelle genauer auf diese Methode eingegangen wird.

Der Quadrupol-Analysator zeichnet sich durch eine hohe Robustheit und Empfindlichkeit aus. Er besteht aus vier parallel angeordneten Metallstäben, von denen jeweils die gegenüberliegenden durch eine Gleichspannung aufgeladen sind. Zu diesen Elektroden wird zusätzlich eine Hochfrequenzwechselspannung im Winkel von 180° zu den Stabpaaren angelegt, sodass die Polarität der Elektroden ständig wechselt. Der Ionenfluss fließt durch die Mitte der vier Magnetstäbe und kann dabei durch Änderung der Frequenz und Amplitude gesteuert werden. In Abhängigkeit der Einstellungen passieren nur bestimmte Ionen mit einem spezifischen m/z -Verhältnis den Quadrupol auf einer stabilen Bahn währenddessen andere Ionen, welche ein anderes m/z -Verhältnis besitzen, abgelenkt werden. Dadurch werden nur Ionen mit gleicher Masse nacheinander zum Detektor weitergeleitet. Aufgrund dieser Fähigkeit wird der Quadrupol auch als Massenfilter bezeichnet. Im Normalfall kann mit einem Quadrupol nur eine Einheitsauflösung bewerkstelligt werden, sodass nur ganzzahlige m/z -Verhältnisse voneinander separiert werden können [31,37]. Eine schematische Darstellung eines Quadrupols zeigt Abbildung 6.

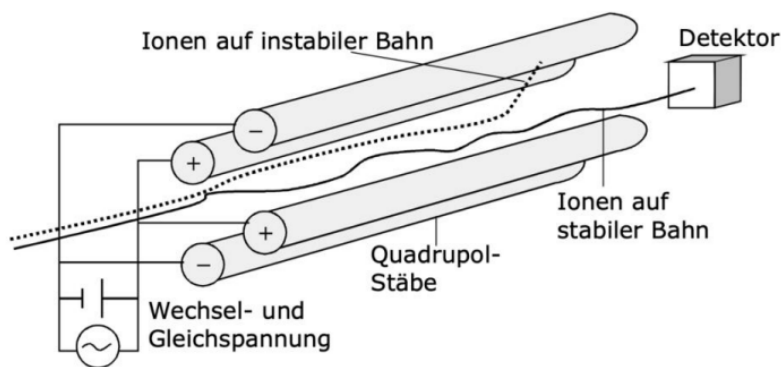


Abbildung 6: Schematische Aufbau eines Quadrupols [37]

Der Quadrupol kann in unterschiedlichen Modi betrieben werden. Im sogenannten Scan-Modus werden alle Ionen nacheinander unabhängig ihrer m/z -Verhältnisse gescannt und mit ihrer Retentionszeit als dritte Dimension gegen ihre Intensität aufgetragen. Wenn so alle Massenspuren gegen die Retentionszeit aufgetragen werden, entsteht ein Totalionen-Chromatogramm (TIC). Gesuchte Peaks können anschließend aus den Spektren isoliert und zur Identifizierung der Substanz herangezogen werden. Dabei wird ein Verlust der Empfindlichkeit in Kauf genommen, weil hier nur die qualitative Information gesucht wird.

Im Selected-Ion-Monitoring (SIM) werden nur Ionen mit spezifischen m/z -Verhältnis betrachtet. Diese Einstellung des Massenanalysators wird vor dem Analysevorgang eingestellt. Damit kommt es zu einer deutlichen Verbesserung der Sensitivität und der Peakformen, weil nur ein gewisser Teil des Spektrums betrachtet wird. Dieser Modus wird in der Regel für die Quantifizierung eines Analyten genutzt. Dabei wird der Basispeak als Quantifier, also zur Quantifizierung und im Normalfall zwei andere m/z -Verhältnisse als Qualifier zur Identifizierung und Zuordnung der Analyten verwendet [31,37].

Die Quadrupole eignen sich hervorragend, um sogenannte Tandem-Systeme aufzubauen. Bei diesen MS/MS-gekoppelten Systemen sind häufig drei Quadrupole (Triple Quadrupol, Q1-Q3) hintereinander geschaltet (siehe Abbildung 7) [31].

Im Selected-Reaction-Monitoring (SRM)-Modus werden sowohl der Q1 als auch der Q3 im SIM-Modus betrieben. Dabei fungieren in so einem Triple-Quadrupol in der Regel der Q1 und der Q3 als Massenanalysatoren, während der Q2 als Kollisionszelle genutzt wird, ohne jedoch eine massenspektrometrische Funktion innezuhaben. Der Q1 lässt nur das sogenannte Precursor-Ion passieren, welches das gesuchte Quasimolekölion des Analyten darstellt.

Im Q2 kommt dieses Vorläuferion in eine Stoßzelle. An dieser Stelle wird ein Inertgas, üblicherweise Argon oder Stickstoff in die Zelle gegen den Strom der Ionen eingelassen, um das

Precursor-Molekül zu fragmentieren. Bei diesem Prozess, welcher kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) genannt wird, führt das Inertgas dem Vorläufer-Ion so viel Energie zu, dass es zerfällt und daraus die Product-Ions, zu Deutsch Produkt-Ionen entstehen.

Diese entstandenen Produkt-Ionen werden zum letzten Quadrupol (Q3) weitergeleitet. Dieser Massenfilter wird auf das m/z -Verhältnis der Produkt-Ionen eingestellt, sodass nur diese ihn durchqueren können. Somit können im SRM nur Substanzen das gesamte Trennsystem passieren, welche das korrekte Precursor-Ion m/z -Verhältnis und das korrekte Fragmentierungsmuster aufweisen. Wenn der Q1 im SIM-Modus betrieben und im Q3 mehrere Ionen ausgewählt werden, um sie zu detektieren, bezeichnet man diesen Vorgang dann als Multiple-Reaction-Monitoring (MRM). Dieser Messmodus wird zur Identifizierung und Quantifizierung des gesuchten Analyten in komplexen Matrices verwendet [31,39, 40].

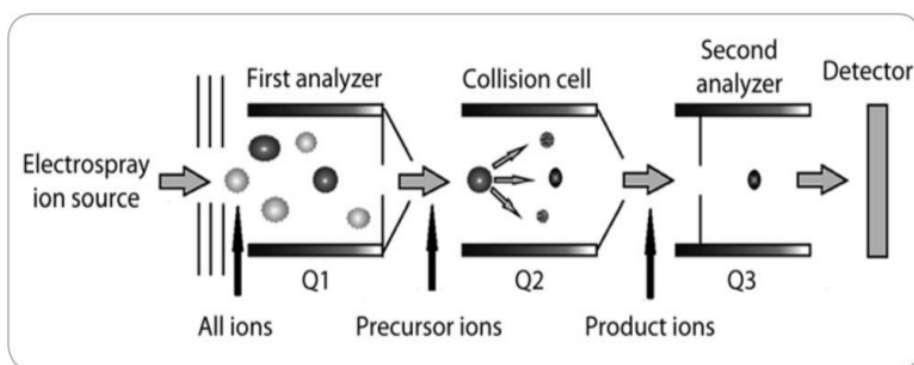


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Triple-Quadrupols [41]

2.4.4 Detektor

Nachdem die Probe im Trennsystem des Massenspektrometers separiert wurde, gelangen die Ionen zum Detektor. Dafür wird meist entweder ein Photomultiplier, ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) oder ein Faraday-Auffänger als Empfänger eingesetzt. In dieser Arbeit fand ein SEV Anwendung und wird deswegen kurz beschrieben.

Die selektierten Ionen werden zum SEV hin mit einer Hochspannung (bis zu 25kV) beschleunigt und treffen dort auf Dynoden auf einer Metalloberfläche. Diese Dynoden sind Elektroden und emittieren bei Aufprall der Ionen selbst die sogenannten Sekundärelektronen. Diese Elektronen können ebenfalls beschleunigt werden und treffen so auf weitere Dynoden. Diese in Reihe geschalteten Dynoden können das Signal anschließend detektieren oder sogar dadurch vervielfachen (Kaskadenverstärkung). Der SEV wird oft als Standarddetektor bei der Massenspektrometrie eingesetzt, weil er die Vorteile der hohen Nachweisempfindlichkeit, einer schnellen Registrierung der Signale und eines breiten dynamischen Bereiches vereint [31,37].

2.5 Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion ist ein Verfahren, welches eine recht leistungsfähige Methode darstellt und die Vorteile einer unkomplizierten Handhabung und geringen Lösungsmittelverbrauches vereint. Die Analysenproben können in der Probenvorbereitung dadurch aufgereinigt und die gesuchten Substanzen leicht abgetrennt und somit aufkonzentriert werden. Grundlage der SPE-Technik sind Sorbenzien wie Silicagеле oder modifizierte Polymere, welche in kleine Röhrchen gefüllt werden, um dort als stationäre Phase den Analyten zu adsorbieren. Nach der Anreicherung in der Festphase und den darauffolgenden etwaigen Waschschritten folgen die Desorptionsschritte, bei denen mit einem geeigneten Lösungsmittel die stationäre Phase vom Analyten selektiv befreit werden kann [37].

Wie bereits erwähnt können statt Silicagelen auch hydrophobe oder hydrophile Polymere für die SPE verwendet werden. In dieser Arbeit wurde XAD-4 verwendet, ein makroporöses, hydrophobes und sphärisches Material, das sich aus quervernetzten Styren-Divinylbenzol-Copolymeren zusammensetzt (siehe Abbildung 8). Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, dass hierbei hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen für die Adsorption des nieder- oder hochmolekularen Analyten verantwortlich sind. Die Vorteile der Kügelchen sind neben einer hohen Robustheit und einer sehr guten Aufnahmekapazität ebenfalls ihre Beständigkeit in der Anwendung innerhalb eines breiten pH-Intervalls von 1-13 [33,37].

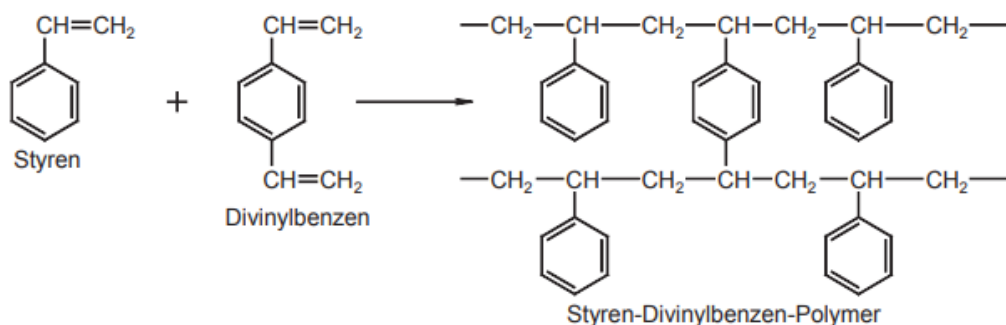


Abbildung 8: Synthese von vernetzten Styren-Divinylbenzen-Polymeren [33]

2.6 Validierungsparameter

Die folgenden sieben Parameter wurden für die Validierung dieser Methode ausgewählt. In diesem Kapitel 2.6 folgt eine Definition und Erläuterung dieser Parameter, in Kapitel 4.2.5 wird die Durchführung und in Kapitel 5.2 werden die Ergebnisse dazu präsentiert.

2.6.1 Selektivität

Die Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode eine Substanz oder eine Substanzklasse ohne Verfälschungen durch andere Komponenten, welche interferieren würden, eindeutig zu identifizieren. Oft wird die „Spezifität“ synonym dazu verwendet. Eine „spezifische“ Methode liefert aber richtige Ergebnisse für nur einen einzelnen Analyten, während sich andere dabei gegenseitig beeinflussen können. Dagegen stellt eine „selektive“ Methode richtige Resultate für alle Analyten von Interesse dar [42,43].

2.6.2 Präzision

Die Präzision gibt die Streuung von Analyseergebnissen um ihren Mittelwert an. Somit zeigt sie die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse an. Wenn die Streuung klein ist, dann ist die Methode präzise. Der Grad der Streuung ist das Ergebnis von zufälligen Fehlern. Als Präzisionsmaß wird die relative Standardabweichung (RSD) angegeben [42,43].

$$RSD (\%) = \frac{\text{Absolute Standardabweichung } s}{\text{Mittelwert } \bar{X}} * 100$$

Formel 1: Berechnung der relativen Standardabweichung (RSD)

Die Wiederholpräzision gibt Bedingungen an, unter welchen unabhängige Ergebnisse in kurzen Zeitabständen erhalten werden können. Dazu wird dasselbe Verfahren (Methode), an identischen Objekten (Probe), in demselben Labor, durch dieselbe Person mit denselben Gerätschaften angewandt [42].

2.6.2.1 Messpräzision und Methodenpräzision

Die Messpräzision wird auch Gerätepräzision oder Systempräzision genannt. Sie stellt ein Maß für die Schwankungen des Analysegerätes selbst dar [42].

Im Gegensatz zur Messpräzision betrifft die Methodenpräzision die Schwankungen der Ergebnisse, welche durch alle Schritte der Methode selbst verursacht werden. Darunter fällt die Probenaufarbeitung mit allen dazugehörigen Arbeitsschritten (Einwiegen, Extraktion, Filtration, Messung und Auswertung) [42].

2.6.3 Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) ist die kleinste noch nachweisbare Menge des Analyten, welche vom Blindwert unterschieden werden kann. Dabei kann der Analyt in 50% der Messungen rein qualitativ nachgewiesen werden. Der kritische Wert gibt an, unter der Annahme einer gewissen Irrtumswahrscheinlichkeit, dass die Menge an Analyten in der untersuchten Probe größer ist als diejenige Menge in der Leerprobe. Der berechnete kritische Wert der Messgröße entspricht damit dem Signal der Nachweisgrenze.

Im Gegensatz dazu gibt die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) die kleinste noch quantifizierbare Konzentration eines Analyten an. Sie gibt die Menge an Analyten an, welche mit vorhergegebener Richtigkeit und Präzision gerade noch quantitativ erfasst werden kann. Im Normalfall wird sie als dreifache Menge des LOD angegeben [31,42,43].

2.6.4 Linearität

Die Linearität gibt die Korrelation zwischen Signal und vorhandener Konzentration des Analyten an. Die Methode liefert Ergebnisse, welche der Konzentration des Analyten direkt proportional sind. Die Linearität wird durch eine lineare Regressionsgerade folgend dargestellt.

$$y = \frac{F_{Analyt}}{F_{ISTD}} a * x + b$$

Formel 2: Lineare Kalibrierfunktion

y = Peakfläche (Area)

F_{Analyt} = Fläche des Signals des Analyten

F_{ISTD} = Fläche des Signals des internen Standards

a = Steigung der Gerade

x = Konzentration des Analyten

b = y-Achsenabschnitt der Gerade

Dabei muss auch das Bestimmtheitsmaß R^2 in Betracht gezogen werden. Dieses ist umso höher und liegt demnach näher bei 1, je näher die Kalibrierpunkte an der Regressionsgeraden liegen [42,43].

2.6.5 Verschleppung von Substanzen

Falsch positive Ergebnisse können das Resultat einer Verschleppung von Substanzen sein. Diese können entweder bei der Aufarbeitung der Proben oder bei HPLC-basierten Messungen entstanden sein. Um dies weitestgehend zu vermeiden, wurden in der Probenaufarbeitung diverse Laborutensilien nur einmal verwendet. Dazu gehören zum Beispiel Einmal-Spritzen, Einmal-Filter und Einmal-Pipettenspitzen.

Außerdem können Kontaminationen im HPLC-Gerät stattfinden. Wenn zuerst eine positive Probe mit hoher Konzentration des Analyten gemessen wurde und anschließend eine negative Probe analysiert wird, kann diese ebenfalls Signale des Analyten fälschlicherweise aufweisen. Dieser Carry-Over-Effekt ist zu berücksichtigen und zu bestimmen [44].

2.6.6 Wiederfindungsrate

Die Wiederfindung beschreibt das Verhältnis des gemessenen Mittelwertes unter definierten Wiederholbedingungen zum richtigen Wert des Analyten. Diese gibt eine Bewertung der gesamten Methoden wieder, da die Verluste des Analyten während der Aufarbeitung gemessen und berechnet werden können. Eine hohe Wiederfindungsrate gibt an, dass während all den Schritten der Methode keine nennenswerten Substanzverluste zu verzeichnen sind. Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgt anhand der Zugabe des Analyt-Standards zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Probenaufarbeitung. Bei einer Probe wird neben dem internen Standard (ISTD), welcher stets nach der Extraktion zum Ende hin hinzugegeben wird, der Analyt-Standard zu Beginn hinzugefügt. Bei einer anderen Probe werden sowohl der interne Standard als auch der SARM-Standard erst zum Schluss der Aufarbeitung nach der Extraktion dazugegeben. Das Verhältnis dieser Peakhöhen bezogen auf deren ISTD ergibt dadurch die Wiederfindungsrate [42,43].

$$Wiederfindungsrate (\%) = \frac{\frac{H_{AZugabe \text{ Beginn}}}{H_{ISTD \text{ Zugabe Ende}}}}{\frac{H_{AZugabe \text{ Ende}}}{H_{ISTD \text{ Zugabe Ende}}}} * 100$$

Formel 3: Berechnung der Wiederfindungsrate

H_A = Signalthöhe des Analyten

H_{ISTD} = Signalthöhe des internen Standards

2.6.7 Matrixeffekte (ME)

NEM sind oft komplexe Stoffgemische mit vielen unterschiedlichen Bestandteilen, wie Fetten, Kohlenhydraten, Proteinen und andere. Diese Komponenten können die Analyse der gesuchten Substanz in der LC-MS störend beeinflussen. Sie können beispielsweise zu Ko-Elutionen und damit zu erhöhten oder erniedrigten Signalwiedergaben des Detektors führen [45].

Matrixeffekte (ME) werden von der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) definiert als kombinierte Effekte von allen Komponenten in einer Probe, in der die zu analysierende Substanz vorhanden ist. Wohingegen eine Interferenz als einzelne spezifische Störsubstanz in der Probe beschrieben wird [46].

Die Einflüsse der Matrix auf die Resultate der Messung können schwer im Vorhinein vorhergesagt oder kalkuliert werden. Spezifische Interaktionen wie Ko-Elution einer dem Analyten chemisch ähnlichen Substanz zur selben Zeit sowie unspezifische Reaktionen wie Kreuzkontaminationen bei mehreren aufeinanderfolgenden Proben oder zu hohe Konzentrationen des internen Standards selbst können dazu führen, dass derselbe Analyt unterschiedliche Signale in verschiedenen Matrices ausbildet [47].

Bei ME kann zwischen Ionensuppression und Ionenverstärkung unterschieden werden. Bei beiden Effekten kommt es zu einer Matrix-abhängigen Änderung der Signalintensität des Analyten und somit zur Verfälschung der Ergebnisse. Oft resultiert die Ionensuppression aus dem Ionisierungsprozess einer ESI-Quelle. Dabei konkurrieren die Matrixkomponenten mit den Analyten um die Ladungen und den Platz an der Tröpfchenoberfläche. Dies kann zu einer verminderten Ionisierung des Analyten führen. Außerdem können die Oberflächenspannung oder die Viskosität der gebildeten Tröpfchen durch diese Matrixkomponenten erhöht werden,

was ebenfalls in niedrigeren Signalen resultieren kann, weil die Tröpfchen schwieriger zum Aerosol verdampfen [48].

Durch eine umfassende Aufreinigung während der Aufarbeitung können solche ME vermindert werden, indem störende Substanzen abgetrennt werden. Wenn dies nicht möglich ist, wird durch den Vergleich mit einer reinen Matrixprobe und die Zugabe eines geeigneten Standards (Standardaddition) versucht, die ME abzuschätzen. Neben dieser Methode, in der die Zugabe einer bestimmten Konzentration eines geeigneten Standards nach der Extraktion in die reine Matrixprobe erfolgt, wäre für eine Abschätzung der ME auch die „Nach-Säulen-Infusion“ (PCI) möglich. Idealerweise kommen dabei isotoopen-markierte Standards zum Einsatz [47].

3 Fragestellung

3.1 Problemstellung

Der Konsum von NEM ist aus dem heutigen Sport, vor allem aus dem Elitesport nicht mehr wegzudenken. Die Athleten erhoffen sich durch die Einnahme dieser Produkte Vorteile gegenüber ihrer Konkurrenz in Form einer höheren Leistungsbereitschaft oder durch kürzere Regenerationszeiten.

Der Erwerb dieser NEM findet oft über das Internet auf teilweise dubiosen Websites oder über Sportshops statt, welche suggerieren, dass die Produkte den höchsten Qualitäts- und Sicherheitsstandards entsprechen. Selbst wenn ein umfassendes Qualitätskontrollsystem bei der Herstellung peinlichst genau eingehalten wurde, sind Kontaminationen nie zur Gänze auszuschließen, ganz zu schweigen von willkürlicher Zugabe gewisser dopingrelevanter Stoffe durch den Hersteller selbst, um die Wirkung der Produkte damit zu steigern [48].

Die akkreditierten Laboratorien der WADA registrieren AAF in Form von Blut- oder Urinproben von Sportlern, welche solche Produkte vermeintlich unwissentlich konsumiert haben und anschließend positiv darauf getestet werden. Unter diesen dopingrelevanten Substanzen, die im Wettkampf oder auch außerhalb verboten sind, spielt neben den klassischen anabolen Steroiden und Stimulantien die Substanzgruppe der SARM eine immer größer werdende Rolle. Da viele Verbindungen dieser Gruppe und deren Metaboliten bis heute noch gar nicht identifiziert bzw. vollständig charakterisiert wurden, stellt sich deren Nachweis als Herausforderung dar [49].

3.2 Ziel dieser Masterarbeit

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit ist es eine umfassende Analysenmethode für die Substanzgruppe der SARM zu erstellen, mit welcher diverse Arten von NEM auf das Vorkommen dieser Substanzen getestet werden können. Diese soll unabhängig von der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe dieser NEM sein. Dadurch könnten gemessene AAF auf eine Kontamination in einem NEM zurückgeführt werden. Diese Methode wird zunächst in den Vorversuchen optimiert und darauffolgend mit sechs verschiedenen Produkten und damit in sechs unterschiedlichen Matrices validiert. Anschließend wird eine Feldstudie durchgeführt, bei der NEM stichprobenartig aus den Beständen von Seibersdorf Laboratories selbst, aus einer Apotheke und aus Sportshops in Wien mit dieser neuen Analysenmethode getestet werden, um deren Einsatz für den Praxisgebrauch zu erproben.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Substanzen und Reagenzien

Tabelle 3 zeigt eine Auflistung der Substanzen und Reagenzien, welche für die Aufarbeitung und anschließende Messung der NEM-Proben verwendet wurden.

Tabelle 3: Verwendete Substanzen und Reagenzien

Name	Bezeichnung/ Beschreibung	Hersteller
Aceton	ACS-reagent	Sigma-Aldrich
Amberlite-XAD 4	20-60 mesh	Suppelco
Dinatriumhydrogenphosphat	di-Sodium hydrogenphosphate for analysis	Suppelco
Ethylacetat	HPLC grade	Chem-Lab
H ₂ O mit 0,1% Ameisensäure (Laufmittel)	Hypergrade für LC-MS	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Potassium dihydrogenphosphate for analysis	Merck
Methanol (99,9%)	Methanol für HPLC/UHPLC (supergradient)	PanReac AppliChem
Methanol mit 0,2% Ameisensäure (Laufmittel)	Hypergrade für LC-MS	Sigma-Aldrich
Millipore-H ₂ O	Milli-Q-Wasser (Umkehrosmose)	Milli-Q Direct System (Merck)

4.1.2 Geräte und Material

Tabelle 4 führt die genutzten Geräte und Materialien an.

Tabelle 4: Verwendete Geräte und Materialien

Gerät/Material	Bezeichnung/ Beschreibung	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius 704F829	Sartorius
Einmalfilter	17mm Nylon Spritzenfilter 0,2µm	Thermo Fisher Scientific
Einmalhandschuhe	VWR Nitril Handschuhe	VWR
Einmalspritzen	Plastik Zweistück-Spritze 2mL	Thermo Fisher Scientific
Falcons	50mL, Cellstar tubes	Greiner-bio-one GmbH
Gewindeflasche	20mL, Klarglas	Altmann Analytik
Gewindeflasche	20mL, Braunglas	Altmann Analytik
Heizbank	Heizbank mit Sand	Gerhardt Analytical Systems
Heizblock	Behrotest ET1	Behr
HPLC	Vanquish Horizon UHPLC System Vanquish Passive Pre-Heater MP35N Vanquish Column Compartment H Vanquish Horizon and Flex Split Autosampler Vanquish Binary Pump H	Thermo Fisher Scientific
HPLC Vials	V-Vial clear 9mm	Phenomenex
HPLC-Vial-Deckel	DP blue Cap & TS Septa	Thermo Fisher Scientific
Kolbenhubpipetten	Pipetman P1000, P200, P10, P2	Gilson

Gerät/Material	Bezeichnung/ Beschreibung	Hersteller
Kompaktschüttler	SSL4, See saw rocker	Stuart
Laborkühlschrank	LKexv 1800 MediLine	Liebherr
Magnetrührer	IKA Magnetrührer RH basic 2	IKA
Massenspektrometer	TSQ Altis™ Plus Triple Quadrupole Mass Spectrometer	Thermo Fisher Scientific
Pasteurpipetten	Glas, kurze Form	Duran Wheaton Kimble
pH-Meter	50101092 XS pH 60 VioLab benchtop pH meter - Electrode 201 T	XS Instruments
Pipettenspitzen	Eppendorf Tips 0,5-10mL	Eppendorf SE
Pipettenspitzen	Pipetman Spitzen	Gilson
Schwingmühle	MM 400	Retsch
Speed Vac	Vakuumkonzentrator Savant™ SPD140 SpeedVac- System	Bartelt
Vortex	Vortex 1 S000	IKA
Waage	Sartorius 704F831	Sartorius
Zentrifuge	Rotano 460 R	Hettich
Extraktionsnetze	Zylinder aus rostfreiem Stahldrahtgewebe	G. BOPP+CO. AG Fein- drahtweberei
Software	Thermo Scientific Xcalibur	Thermo Fisher Scientific

4.1.3 Herstellung der verwendeten Arbeitsmaterialien und -lösungen

1) 1:9 – Methanol:Wasser- Lösung

Dazu wurden 10mL Methanol mit 90mL Millipore-Wasser zusammengemischt, um 100mL dieser Lösung herzustellen. In 500µL dieser Lösung wurde die Probe nach dem Vaporisieren wieder aufgenommen, um sie für die Messung mit der LC-MS vorzubereiten.

2) 1:1 Ethylacetat:Methanol- Lösung

500mL Ethylacetat wurde gemeinsam mit 500mL Methanol gemischt, um einen Liter zu erhalten. Davon wurden 3mL pro Probe für den Destillationsschritt im Probenvorbereitungsprozedere verwendet.

3) 0,8M Phosphatpuffer (pH=7,4)

Zum einen wurde dafür eine basische Lösung einer 0,8M Di-Natriumhydrogenphosphatlösung angefertigt, indem 142,4g der Substanz in einem Liter Wasser gelöst wurde. Zum anderen wurde eine 0,8M Kaliumdihydrogenphosphatlösung hergestellt, indem 109g des Pulvers ebenfalls in einem Liter Wasser gelöst wurde. Anschließend wurde die basische Lösung mit der sauren Lösung titriert, um eine Phosphatpufferlösung 0,8M mit einem neutralen pH-Wert (7,4) herzustellen.

4) XAD-4-Aufreinigung

Amberlite XAD-4 ist ein makroporöses, sphärisches Material mit einem Durchmesser von 490-690µm, welches sich aus quervernetzten Styren-Divinylbenzen-Copolymeren zusammensetzt. Wie auch in dieser Arbeit wird XAD hauptsächlich für die SPE verwendet. Dabei kann XAD hydrophobe Substanzen in den Poren adsorbieren, während hydrophile Substanzen nicht in den Poren gebunden werden. XAD weist eine Oberfläche von 750m²/g und eine Porengröße von ungefähr 100Å auf. Zusätzlich könnte XAD-4 einige Oberflächenmodifikationen eingehen, um die Selektivität der Adsorbenten zu erhöhen [50,51].

Geliefert wird XAD als feuchtes, klebriges, mit Wasser nicht mischbares Granulat, welches vor Anwendung einen Reinigungsschritt unterlaufen muss. Dazu wird es mit Aceton einer Rückflussdestillation bei ungefähr 75°C für 4-5 Stunden unterzogen. Dabei entfernt das Aceton Verunreinigungen oder andere Kontaminationen am XAD. Anschließend wird das XAD mit

Millipore-Wasser für 7-8 Stunden rücklaufdestilliert, um das restliche Aceton wiederum vom XAD zu entfernen. Auf diese Weise erhält man ein sauberes XAD, welches in Wasser aufbewahrt und für diese Probenaufarbeitung anschließend verwendet werden kann [52].

4.1.4 Herstellung des internen Standards

Der interne Standard wird dem System zugesetzt, um die Stabilität der Analyseverfahren und der Messmethode zu beurteilen. Idealerweise besteht der interne Standard aus deuterierten Analysesubstanzen, welche aufgrund dieser Modifikation dieselben chemischen und physikalischen Eigenschaften wie der gesuchte Analyt aufweisen. Somit zeigt eine Änderung des Signals des internen Standards eine Abweichung im Verfahrenssystem an [31].

In dieser Arbeit wurde ein interner Standard aus vier Substanzen hergestellt (siehe Tabelle 5). Alle vier Stoffe zeigen ähnliche Retentionszeiten wie die SARM bzw. haben annähernd ähnliche strukturelle Eigenschaften. Ein deuteriertes SARM wurde nicht verwendet, weil die Synthese bzw. die Beschaffung im Rahmen dieser Masterarbeit zu aufwändig gewesen wäre. Da für die vier angeführten Substanzen breite empirische Daten vorliegen, wurden eben diese für die vorliegende Arbeit als interner Standard herangezogen. Die Konzentration in der Probe bei der Vermessung soll 2,5µg/g enthalten. Die Konzentrationen der internen Standardsubstanzen in 10mL Methanol beträgt ungefähr 10µg/mL.

Tabelle 5: Zusammensetzung des internen Standards

Substanz	IUPAC Name	Konzentration (µg/mL)
Testosteron 16,16,17-D3	(8R,9S,10R,13S,14S,17S)-17-hydroxy-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one	9,6
Formoterol hemifumarat 13C,D3	(E)-but-2-enedioic acid;N-[2-hydroxy-5-[(1S)-1-hydroxy-2-[[[(2S)-1-(4-methoxyphenyl)propan-2-yl]amino]ethyl]phenyl]formamide	9
Mefrusid	4-chloro-1-N-methyl-1-N-[(2-methyloxolan-2-yl)methyl]benzene-1,3-disulfonamide	11,16
Probenecid	4-(dipropylsulfamoyl)benzoic acid	9,6

4.1.5 Herstellung des SARM-Standards

Der SARM-Standard wird für die Positiv-Kontrolle (Qualitätskontrolle, QC) benötigt und deswegen für die Validierung herangezogen. Er besteht aus einem Gemisch von zwölf Substanzen und beinhaltet diejenigen SARM, welche in die erstellte Methode implementiert werden sollen. Dazu wurden die zwölf Verbindungen in 10mL Methanol pipettiert. Die Konzentration der einzelnen SARM in diesem Gemisch soll ungefähr 1µg/mL betragen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Zusammensetzung des SARM-Standards

Analyt	Summenformel	UIPAC Name	Konzentration (µg/mL)
S9	C ₁₇ H ₁₄ ClF ₃ N ₂ O ₅	(2S)-3-(4-chloridophenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]propanamide	0,915
Andarin	C ₁₉ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₆	(2S)-3-(4-acetamidophenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]propanamide	0,895
Ostarin	C ₁₉ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₃	(2S)-3-(4-cyanophenoxy)-N-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxy-2-methylpropanamide	1
S1	C ₁₇ H ₁₄ F ₄ N ₂ O ₅	(2S)-3-(4-fluorophenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]propanamide	1,12
RAD140	C ₂₀ H ₁₆ ClN ₅ O ₂	2-chloro-4-(((1R,2S)-1-(5-(4-cyanophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-2-hydroxypropyl)amino)-3-methylbenzonitrile	1
YK-11	C ₃₅ H ₃₄ O ₆	17,20-((1-methoxyethylidene)bis(oxy))-3-oxo-19-norpregna-4,20-diene-21-carboxylic acid methyl ester	1
S23	C ₁₈ H ₁₃ ClF ₄ N ₂ O ₃	2S)-3-(4-chloro-3-fluorophenoxy)-N-[4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl]-2-hydroxy-2-methylpropanamide	1
GSK2881078	C ₁₄ H ₁₃ SF ₃ N ₂ O ₂	(R)-1-(1-(methylsulfonyl)propan-2-yl)-4-(trifluoromethyl)-1H-indole-5-carbonitrile	1
LGD-4033	C ₁₄ H ₁₂ F ₆ N ₂ O	4-(2-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxyethyl)pyrrolidin-1-yl)-2-(trifluoromethyl)benzonitrile	1,06
ACP-105	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₂ O	-chloro-4-(3-hydroxy-3-methyl-8-azabicyclo(3.2.1)oct-8-yl)-3-methylbenzonitrile	1
LGD-3303	C ₁₆ H ₁₄ ClF ₃ N ₂ O	9-chloro-2-ethyl-1-methyl-3-(2,2,2-trifluoroethyl)-3H-pyrrolo(3,2-f)quinolin-7(6H)-one	1,015
SARM AC-262536	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O	4-(3-hydroxy-8-aza-bicyclo(3.2.1)octyl)naphthalene-1-carbonitrile	1

4.1.6 Produktauswahl für die Validierung und für die Feldstudie

Der Markt für Nahrungsergänzungsmittel zeigt stetiges Wachstum und die Variation an verschiedenen Produkten nimmt laufend zu. In dieser Arbeit wurde für die Methodenvvalidierung eine Anzahl an sechs Produkten ausgewählt, welche sechs unterschiedliche Matrices aufweisen. Dabei wurde auf die Auswahl von unterschiedlichen Darreichungsformen, wie Pulvern, Flüssigkeiten und öligen Mischungen geachtet. Diese Produktkategorien werden von Athleten konsumiert und standen in der Vergangenheit öfter im Zuge einer präventiven Dopinguntersuchung im Mittelpunkt [53]. Die unterschiedlichen Matrices und Darreichungsformen sollen außerdem zusätzliche Informationen vor allem in Bezug auf die zu erwartenden Matrixeffekte liefern. Eine kurze Beschreibung der sechs Produkte befindet sich in Tabelle 7 und Fotos davon können im Anhang 2 eingesehen werden.

Tabelle 7: Produktauswahl für die Validierung

Bezeichnung	Produktname	Hersteller	Matrix	Chargennummer	Bemerkung
NEM 1	Lipo 6 Black	Nutrex Research	Glycerin	LBL-LIPO6BLKUC-60CT-V8-US	Öliger Kapselinhalt
NEM 2	Gold ISO	Levrone Global LLC	Proteinpulver	KL-KLCET000011	Proteinpulver
NEM 3	Amino Hardcore	Mega Sport	Aminosäure-Maltodextrin	220813	Aminosäuretabletten
NEM 4	Optimus Pre	Underpharm Labs	Wasser	-	Wässrige Flüssigkeit
NEM 5	Tablettae ecdisteni	Radiks	Zucker	R-DV/M00872/06/16	Ecdysteron Tabletten
NEM 6	Kre-Alkalyn	EFX-Sports	Kreatinmonohydrat	LOT3354100	Kreatinmonohydrat Kapseln

Die folgende Tabelle (Tabelle 8) listet die entsprechenden Produkte auf, welche innerhalb der Feldstudie auf das Vorkommen dieser zwölf SARM mit der neu erstellten Methode untersucht wurden. Dabei konnten sechs Produkte aus den Beständen von Seibersdorf Laboratories, acht Produkte aus einem Sportshop in Wien und sieben Produkte aus einer öffentlichen Apotheke aus Niederösterreich für die Analyse akquiriert werden. Die NEM, welche aus Seibersdorf Laboratories stammen, wurden von Athleten aus dem Internet bezogen. Diese wurden bereits im Vorfeld aus verschiedensten Ländern zur Analyse für diverse Doping-Fälle nach Seibersdorf Laboratories geschickt. Sie wurden im Vorhinein mit einer anderen Extraktionsmethode aufgearbeitet und analysiert, weswegen die quantifizierte Menge einzelner SARM-Verbindungen

mitangegeben werden konnte. Die neu entwickelte Methode galt es mit diesen im Vorhinein gemessenen Werten zu vergleichen, indem die Analyten zunächst qualitativ nachgewiesen und anschließend semiquantitativ mit den Kalibriergeraden der jeweiligen Substanzen von dem NEM 6 aus der Validierung bestimmt wurden. Dies stellt jedenfalls keine exakte Quantifizierung dar, sondern soll eine Abschätzung der Größenordnung der vorhandenen Menge in den NEM erlauben, um sie mit der bereits gemessenen Konzentration vergleichen zu können. Die entsprechenden Fotos dieser NEM-Produkte, welche für diese Feldstudie benutzt wurden, befinden sich in Anhang 3.

Tabelle 8: Produktauswahl für die Feldstudie

Bezeichnung	Produktname	Hersteller	Matrix	Chargennummer	Bemerkung	Herkunft
NEM 7	Glucosamine 1000mg	Ultimate Nutrition	Glucosamin	BN01407	Glucosamin kapsel 5ng/g: Ostarin, Andarin, LGD-4033, GW1516	Seibersdorf (Internet)
NEM 8	5-HTP	Frog Tech	Maltodextrin	MFG08/2019	Kapselinhalt 4µg/g LGD-4033	Seibersdorf (Internet)
NEM 9	5-HTP	Frog Tech	Maltodextrin	MFG08/2019	Kapselinhalt 0,7µg/g LGD-4033	Seibersdorf (Internet)
NEM 12	Beta-Ecdysterone	Herbern Company	Reisstärke	MFG17/11 / 2021	Kapselinhalt 10ng/Kapsel	Seibersdorf (Internet)
NEM 13	Ecdysone	Rhinofarm Pharmaceuticals LLC	Maltodextrin	Batch Nr. 04/06/2022	Kapselinhalt 1,8ng/g S23	Seibersdorf (Internet)
NEM 14	Ecdysone	Rhinofarm Pharmaceuticals LLC	Maltodextrin	Batch Nr. 04/06/2022	Kapselinhalt 1,8ng/g S23	Seibersdorf (Internet)
NEM 15	My Whey	100% Nutrition PD GmbH	Proteinpulver	LOT 230900089	Proteinpulver	Sportshop Wien
NEM 16	Testo Extreme	MSG Online GmbH	Pflanzenextraktpulver	LOT 46598	Kapselinhalt	Sportshop Wien
NEM 17	Black Test	Bio Tech USA	Pflanzenextraktpulver	LOT 1238695	Kapselinhalt	Sportshop Wien
NEM 18	Brutal Anadrol	Bio Tech USA	Pflanzenextraktpulver	LOT 1226824	Kapselinhalt	Sportshop Wien
NEM 19	Tribulus Maximus	Bio Tech USA	Pflanzenextraktpulver	LOT 20240305 A	Tablette	Sportshop Wien

NEM 20	M-Stak	Animal Universal Nutrition	Pflanzenextraktpulver	2023-19240 MFG6/23	Kapselinhalt+Tablette	Sportshop Wien
NEM 21	Fat-Burner Plus	Goldfield BV Sportsfood Tuning	Pflanzenextraktpulver	27.01.2026	Kapselinhalt	Sportshop Wien
NEM 22	R-Weiler Focus Shot	Olimp Laboratories	Wasser	LOT 00580422	Wässrige Flüssigkeit	Sportshop Wien
NEM 23	Fitness Eiweiss	Vitality Nutritionals	Proteinpulver	LOT L52507	Proteinpulver	Apotheke
NEM 24	Kreatin	Megamax	Kreatinmonohydrat	LOT 20221206	Kreatinmonohydratpulver	Apotheke
NEM 25	Pur light Sport	Seewald OTC	Traubenzucker Elektrolyte Vitamine	OTC2300 3487	Sportgetränkpulver	Apotheke
NEM 26	Instant Eiweißpulver Protein pur	Melasan Produktions- und Vertriebsges m.b.H.	Proteinpulver	24074P00	Proteinpulver	Apotheke
NEM 27	Dr. Böhm Magnesium Sport + Aminosäuren	Apomedica	Proteinpulver + Vitamine Elektrolyte	240336	Brausepulver	Apotheke
NEM 28	Tribulus terrestris Extrakt	Vita-World GmbH	Pflanzenextraktpulver	LOT30904	Kapselinhalt	Apotheke
NEM 29	Ayurveda Tribulus terrestris	Apotheke zum Schutzengel	Maltodextrin	09023	Kapselinhalt	Apotheke

4.2 Methoden

4.2.1 Entwicklung der Methode

Während die Methoden zur Analyse von Harn und Blut in einem von der WADA akkreditierten Laboratorium heutzutage zu den Routinemessungen mit standardisierten SOPs zählen, hat sich aufgrund der Vielfältigkeit der Produkte noch keine spezifische Methode für die Analyse von Nahrungsergänzungsmitteln etablieren können. Bei Untersuchungen von NEM mit dem Ziel SARM zu detektieren, wird diese Substanzgruppe derzeit häufig aufgrund der lipophilen Eigenschaften in einem organischen Lösungsmittel gelöst und oft durch Ultraschallextraktion aus dem NEM extrahiert und nach Filtration mit LC-MS gemessen [54]. In dieser Arbeit wurde die Extraktion in der Probenaufarbeitung erstmals mit XAD-4 im Zuge einer modifizierten Festphasenextraktion bewerkstelligt. Dies stellt somit einen neuen Ansatz in der Analyse von NEM auf dopingrelevante Substanzen dar. Das XAD-4 wurde in der Vergangenheit des Öfteren für die Entfernung von Kontaminationen mit Metallionen in Lebensmitteln verwendet [55].

4.2.2 Messsystem

Das Messsystem besteht aus einem Vanquish Horizon UHPLC System mit einem anschließend gekoppelten TSQ Altis Plus Triple Quadrupole Massenspektrometer von der Firma Thermo Fisher Scientific. Als mobile Phase wurde H₂O + 0,2% Ameisensäure bzw. Methanol + 0,2% Ameisensäure in einer Gradienten-Elution verwendet. Der Gradient kann in Tabelle 9 eingesehen werden. Für die Trennung der Analyten im HPLC-System wurde eine C18-Umkehrphase als stationäre Phase verwendet.

Tabelle 9: Parameter der angewandten HPLC-Methode

Parameter	Methode/Eigenschaften			
Säule	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, 2.1 x 50 mm, 3.5 µm			
Vorsäule	Phenomenex Security Guard Cartridge, C18, 4 x 2 mm			
Mobile Phase	A) H ₂ O + 0,2% Ameisensäure B) Methanol + 0,2% Ameisensäure			
Gradient/Flussrate	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	A%	B%
	0	0,42	100	0
	0,2	0,42	100	0
	7	0,42	0	100
	12	0,42	0	100
	12,1	0,42	100	0
	15	0,42	100	0
Gesamtlaufzeit	15 min			
Injektionsvolumen	10 µL			
Säulentemperatur	25°C			

Tabelle 10 zeigt eine Auflistung der wichtigsten Parameter des Massenspektrometers.

Tabelle 10: Parameter der angewandten MS-Methode

Parameter	Methode/Eigenschaften	
Ionenquelle	Spannung (positive Ionen)	3500 V
	Spannung (negative Ionen)	2500 V
	Verdampfer Temperatur	350°C
Q1 (Breite bei halber Höhe, FWHM)	0,7	
Q3 (Breite bei halber Höhe, FWHM)	1,2	
CID Gas (N ₂)	1,5 mTorr	

In Tabelle 11 sind die Retentionszeiten, die Polarität, sowohl die Ionenübergänge des Vorläufer-Ions als auch der zwei Hauptfragmente und die Kollisionsenergie (CE) für die SARM-Analyten im SARM-Standard-Gemisch und im internen Standard im SRM-Modus einzusehen.

Tabelle 11: Retentionszeit, Polarität, Kollisionsenergie des internen und SARM-Standards

Substanz	Retentionszeit [min]	Polarität	Precursor [m/z]	Product [m/z]	Kollisionsenergie [V]
Testosteron D3	5,79	ESI (+)	292,24	97,04	26
Formoterol C13, D3	3,5	ESI (+)	349,09	125,106	31
Mefrusid	4,59	ESI (-)	381	345	22
Probenecid	5,65	ESI (-)	284,1	140,1 240,1	26 16
S9	6,49	ESI (-)	416,966	126,901 260,967	27 20
Andarin	5,54	ESI (-)	440,058	150,007 261,026	26 21

Ostarin	5,71	ESI (-)	388,046	117,991 185,002	44 40
S1	6,24	ESI (-)	401	204,941 260,965	28 20
RAD140	5,52	ESI (+)	394,224	170,107 223,054	28,5 9,34
YK-11	7,05	ESI (+)	399,167	325,28 357,28	17,13 11,49
S23	6,3	ESI (-)	415,098	144,988 269,071	20,92 17,89
GSK288107 8	5	ESI (+)	331,072	190,321 311,095	40,98 20,59
LGD-4033	5,98	ESI (+)	339,092	220,1 239,086	27 33
ACP-105	6,2	ESI (+)	291,126	167,125 193,125	23,7 24,8
LGD-3303	6,3	ESI (+)	342,994	245,042 289,155	37,27 29,22
SARM AC- 262536	5,88	ESI (+)	279,162	169,125 195,125	21,26 21,98

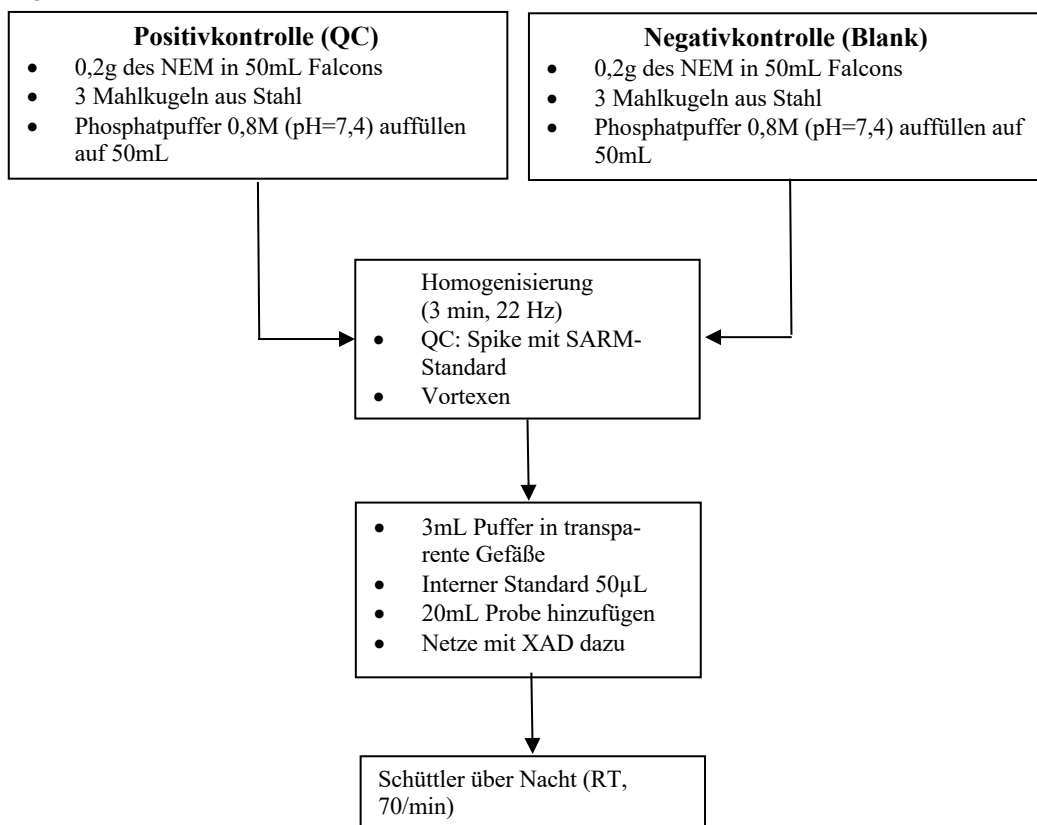
4.2.3 Software

Für die Sequenzerstellung und Auswertung der erhaltenen Messdaten wurde die Software Xcalibur™ 4.3 software von Thermo Fisher Scientific verwendet. Damit wurden die Einstellungen während der Messung getroffen, die Integrierung der Peaks und die Akquirierung der Daten bewerkstelligt. Für die Berechnung der Werte wurde auf Excel zurückgegriffen.

4.2.4 Probenvorbereitung

Im Zuge der Probenvorbereitung werden Analyten aus einer komplexen Matrix zu extrahiert, aufgereinigt und somit auf die Messung im LC-MS-System vorzubereitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Festphasenextraktion mit XAD-4 bewerkstelligt und eine abgewandelte Variante der Soxhlet-Extraktion angewandt, weswegen diese im Folgenden genauer erläutert werden. Die Probenvorbereitung der NEM erfolgte mittels in Abbildung 9 gezeigten Fließschemas.

Tag 1



Tag 2

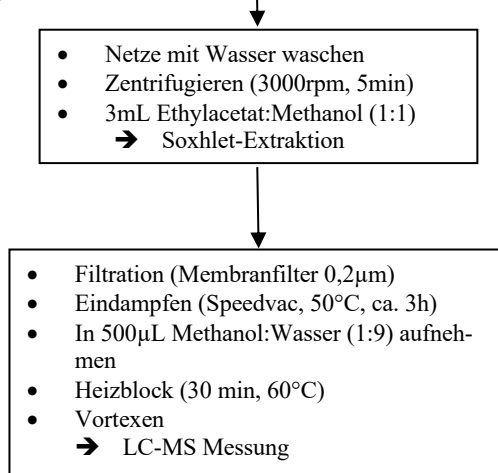


Abbildung 9: Fließschema zur Probenaufarbeitung

Zu Beginn der Probenaufarbeitung werden 0,2g des NEM in einen Falcon (50mL) eingewogen. Je nach Darreichungsform des NEM wird entweder der Kapselinhalt durch Öffnen der Kapsel genutzt oder die Tabletten entsprechend vorher mit einem Spatel zerkleinert und pulverisiert als Probe herangezogen. Anschließend wird der Falcon mit dem hergestellten Phosphatpuffer 0,8M (pH=7,4) auf 50mL aufgefüllt. Unabhängig von der Konsistenz der NEM werden drei Mahlkugeln aus Stahl dazugegeben und der Falcon für drei Minuten bei einer Frequenz von 22 Hertz mittels Schwingmühle geschüttelt, um die Probe zu homogenisieren. Bei der positiven Kontrollprobe werden danach entsprechende Volumina (1µL, 5µL, 10µL, 25µL, 50µL; entspricht einer Konzentration von 0,005µg/g, 0,025µg/g, 0,05ng/g, 0,125µg/g, 0,25µg/g) an SARM-Standard in die Probe pipettiert, wobei die Blank-Probe (negative Kontrolle) keinen Zusatz bekommt. In transparente Gewindeflaschen werden 3mL Phosphatpuffer vorgelegt und anschließend 50µL interner Standard zugegeben. Inzwischen wird das XAD-4 (ca. 1mL) in die vorbereiteten Netze pipettiert. Zum Schluss des ersten Tages werden 20mL der Probenflüssigkeit zu den 3mL Phosphatpuffer und 50µL (entspricht $c=2,5\mu\text{g/g}$) interner Standard hinzugegeben, ein Netz dazu hineingesteckt und der Deckel darauf geschraubt. Das Fläschchen wird auf den Kopf gestellt und über Nacht bei RT auf dem Kompaktschüttler geschüttelt, um die SARM zu extrahieren.

Der Tag 2 der Probenaufarbeitung startet mit dem Waschen der Netze mit Millipore-Wasser. Dabei sollen die restlichen hydrophilen Bestandteile entfernt und das XAD von Verunreinigungen befreit werden. Anschließend werden die Netze in braune Gewindeflaschen transferiert und bei 3000rpm 5 Minuten zentrifugiert, um damit das restliche Wasser zu entfernen. Nun sind die Proben bereit, um mittels einem abgewandelten Soxhlet-Extraktionsverfahren desorbiert zu werden. Dazu wird als organische Phase 3mL des Eluentengemisches (Ethylacetat:Methanol 1:1) in transparente Gewindeflaschen gefüllt und die Netze samt XAD hineingepackt. Die Fläschchen werden auf die Apparatur geschraubt, welche in der Mitte jedes Fläschchens ein Metallgewinde besitzen. Diese wurden im Vorhinein mit Aceton durch Destillation für 2h gereinigt. Die Apparatur wird für 2h auf das vorher erwärmte Sandbad gestellt, wo entsprechende Desorptionsprozesse stattfinden. Bei dieser abgewandelten Form der Soxhlet-Extraktion verdampft das Lösungsmittel im Fläschchen und kondensiert in der Mitte am gekühlten Metallgewinde. Das kondensierte Lösungsmittel tropft wieder auf das XAD-4 im Netz hinunter und in einem Zyklus desorbieren dabei die SARM vom XAD. Diese reichern sich im Lösungsmittelgemisch am Boden des Fläschchens an. Anschließend wird der Apparat vom Sandbad aufgehoben und für 10 Minuten abkühlen gelassen. In den abgeschraubten Fläschchen befinden sich nun die SARM in der organischen Phase, weswegen das Netz samt XAD-4 entfernt werden kann [37,56].

Nun wird das Eluat mittels Spritze aufgezogen und durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2µm filtriert, um feste größere Bestandteile wie das restliche XAD zu entfernen.

Die so erhaltene Lösung wird mittels Speed Vac bei 50°C für ungefähr 3h vaporisiert. Sobald die Flüssigkeit vollständig eingedampft ist, erkennt man je nach NEM auch andere lipophile Rückstände, welche teilweise auch extrahierte Farbstoffe beinhalten. Diese eingedampften Rückstände werden in 500µL Wasser/Methanol-Mischung (9:1) wieder aufgenommen und für ungefähr 30 Minuten auf den Heizblock bei 60°C erwärmt. Das ist notwendig, um alle Bestandteile wieder in Lösung zu bringen. Zum Schluss werden die Lösungen mittels Vortex durchgemischt und anschließend mit LC-MS gemessen (siehe Prozedurschema Probenaufarbeitung im Anhang 1).

4.2.5 Durchführung der Validierungsparameter

4.2.5.1 *Selektivität*

Zur Bestimmung der Selektivität werden die sechs ausgewählten Produkte sowohl ohne SARM-Standard (Blank) als auch mit SARM-Standard (Positiv-Kontrolle) dotiert, aufbereitet. Die Methode gilt als selektiv, wenn bei den entsprechenden Ionenübergängen der Substanzen in den mit dem SARM-Standard dotierten Proben ein Signal gemessen werden kann, während im Gegensatz zu der reinen Matrix (Blanklösung) kein Signal detektiert wird. Die Methode zählt für diese Substanz als selektiv.

4.2.5.2 *Präzision*

Die Präzision wird anhand der Messpräzision bestimmt. Dazu wurde die reine Injektionslösung (Methanol/Wasser 1:9) ohne Probenaufarbeitung mit fünf unterschiedlichen Volumina des SARM-Standards (1µL, 5µL, 10µL, 25µL, 50µL entspricht einer Konzentration von 2pg/µL → 20pg, 100pg, 200pg, 500pg, 1000pg on column bei 10µL Injektionsvolumen) dotiert. Zusätzlich wurde 50µL (c=1ng/µL->10ng on column bei 10µL Injektionsvolumen) des internen Standards zu jeder Lösung hinzugegeben, sodass in jedem Vial insgesamt ein Volumen von 500µL Messlösung hergestellt wurde. Diese fünf Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen wurden anschließend zehn Mal hintereinander ins System injiziert und gemessen. Die Präzision wurde für jede Substanz anhand des Mittelwerts und der RSD der zehn Messungen veranschaulicht. Die RSD gibt in diesem Fall die Schwankungen des Messwertes aufgrund des Geräts und des Messvorgangs wieder.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Messergebnisse wurde jeder Messwert in der Validierung und während der anschließenden Feldstudie zumindest anhand einer Dreifachbestimmung gemessen. Der daraus erhaltene Mittelwert wurde im Validierungsprozess für die Berechnung

der Kalibrierkurven, der Nachweisgrenzen, der Verschleppungsrate, der Matrixeffekte und der Wiederfindung herangezogen.

4.2.5.3 *Nachweis- und Bestimmungsgrenze*

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze werden die Daten, welche bei der Linearität gemessen wurden, herangezogen. Dabei wird die Nachweisgrenze mit Hilfe des oberen Vorhersageintervalls und der Berechnung des kritischen Wertes des niedrigsten Kalibrierpunktes der Gerade bestimmt und anhand der Bestimmungen aus DIN32645 berechnet.

Die Bestimmungsgrenze wird ebenfalls mit Hilfe der Daten der Linearität aus dem Vorhersageintervall und dem kritischen Wert des niedrigsten Kalibrierpunktes anhand der Berechnungen von DIN32645 erstellt.

4.2.5.4 *Linearität*

Zur Bestimmung der Linearität werden die sechs Produkte mit ihren sechs Matrices mit der SARM-Standard-Mischung mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen (0,005µg/g, 0,025µg/g, 0,05ng/g, 0,125µg/g, 0,25µg/g) dotiert. Dazu werden 0,2g des Produktes mit dem internen Standard (50µL entspricht 2,5µg/g) und dem entsprechenden Volumen des SARM-Standards (1µL, 5µL, 10µL, 25µL, 50µL) zusammen gemäß Vorschrift aufgearbeitet. Anschließend wird daraus eine Kalibriergerade erstellt und das Bestimmtheitsmaß errechnet.

4.2.5.5 *Verschleppung von Substanzen*

Die Verschleppung der Substanzen im Gerät selbst wird anhand des Vergleichs einer Blank-Lösung mit vorhergegangener Messung einer positiven Probelösung mit hoher Konzentration berechnet. Dazu wird eine Probe eines NEM in der Probenaufarbeitung mit 200µL ($c=1\mu\text{g/g}$) SARM-Standard dotiert, welches die vierfache Menge der üblichen Konzentration der Dotierung von 50µL ($c=2,50\text{ng/g}$) SARM-Standard darstellt. Dasselbe NEM wird ebenfalls in dreifacher Ausführung, allerdings ohne Dotierung als Blank-Matrix aufgearbeitet, welche anschließend nach der Injektion der hohen Konzentration vermessen werden. Durch den Vergleich der Messintensitäten der drei Blanklösungsmessungen mit der Signalintensität der Area der hochkonzentrierten Lösung, wird das resultierende Verhältnis und damit die Verschleppungsrate in Prozent berechnet. Durch dreifache Messung dieser Messreihe wird der Mittelwert aus den erhaltenen Werten gebildet.

4.2.5.6 *Wiederfindungsrate*

Die Wiederfindungsrate ist abhängig von der Probenaufarbeitung und gibt den Verlust der Analysesubstanzen während dieses Prozesses wieder. Dazu werden die Proben jeweils einmal durch Zugabe der SARM-Standard-Mischung zu Beginn und einmal durch Zugabe des SARM-Standards nach der Extraktion vor dem Eindampfen verglichen, während der ISTD jeweils bei beiden Proben vor dem Eindampfen am Schluss der Aufarbeitung hinzugefügt wird, damit der ISTD keine Verluste durch die Aufarbeitung erleidet. Mit der beschriebenen Formel aus Punkt 2.6.6 wird die Wiederfindungsrate berechnet, indem die Signalintensitäten der Areas der Analyten gegen die Intensitäten des ISTD ins Verhältnis gesetzt werden. Diese auf diese Weise errechnete Wiederfindungsrate wird in Prozent angegeben, wobei die Probe, in welche der SARM-Standard zum Schluss hinzugefügt wurde, als 100% angesehen wird, da keine nachfolgenden Aufarbeitungsschritte zum Verlust des Analyten mehr führen können.

4.2.5.7 *Matrixeffekte*

Die Matrixeffekte sind für jedes Produkt verschieden und kommen auf die zusätzlichen Komponenten in der Matrix an. Um diese grob einordnen zu können, werden die sechs Matrices laut Schema aufgearbeitet und erst vor dem Vaporisieren mit dem SARM-Standard dotiert. Diese Lösungen werden nach dem Eindampfen mit 500µL der Methanol:Wasser-Mischung (1:9) rekonstituiert und gegen reines Methanol mit der gleichen Konzentration des SARM-Standard, welches ebenfalls nach dem Eindampfen mit dieser 1:9-Mischung wieder aufgenommen wird, verglichen. Somit sollten die Signalintensitäten der integrierten Areas der Proben mit Matrix entweder durch Ionensuppression erniedrigt oder durch Enhancement erhöht werden im Vergleich mit der gleichen Konzentration an Standard in einer Probe ohne Matrix (QC). Dabei wird darauf geachtet, dass das gleiche Volumen an Flüssigkeit für das Eindampfen entnommen wird, da hier nicht das Area-Verhältnis zwischen Substanz und interner Standard, sondern nur das Signal der Areas der Analyten für die Berechnungen der Matrixeffekte herangezogen wird.

4.2.6 Durchführung der Feldstudie

Für die Feldstudie konnten zunächst 21 NEM aus verschiedenen Quellen akquiriert werden. Dazu sind entsprechende NEM aus einer österreichischen Apotheke, aus einem Sportnahrungsmittel-Shop in Wien und aus dem internen Lager von Seibersdorf auf das Vorhandensein von SARM mit der neu entwickelten Methode getestet worden. In den sechs Produkten aus

dem internen Probenlager von Seibersdorf, welche aus dem Internet von Sportlern gekauft wurden, konnten dabei im Vorhinein bereits einzelne SARM-Verbindungen allerdings mit einer anderen Analysenmethode quantitativ nachgewiesen werden, da das WADA Labor der Seibersdorf Laboratories bereits im Vorfeld dieser Masterarbeit beauftragt wurde, diese Produkte im Zusammenhang mit positiven Dopingfällen zu analysieren. Deswegen kann die neu entwickelte Methode mit diesen Produkten in einer Art „Proof of Concept“-Überprüfung verifiziert werden. In den Experimenten dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich SARM-Verbindungen in den jeweiligen Produkten als Kontamination oder Verunreinigungen befinden. Die NEM unterliefen dabei die übliche Probenaufarbeitung laut Schema (siehe Abbildung 9) und wurden anschließend mittels LC-MS vermessen.

Anschließend wurde die Konzentration der SARM in den positiv gemessenen Produkten semiquantitativ mit den in der Validierung erstellten Kalibriergeraden der jeweiligen Substanzen von NEM 6 abgeschätzt, jedoch ohne dabei die unterschiedlichen Matrixeffekte der Kreatinpulvers zu den Feldstudienprodukten zu berücksichtigen. Die Ergebnisse dieser Experimente stellen nur semiquantitativ geschätzte Konzentrationen dar, um die Größenordnung mit den bereits im Vorfeld bestimmten Konzentrationen der SARM zu vergleichen und ungefähr einordnen zu können. Alle Werte der Proben wurden wieder anhand des Mittelwertes der Dreifachbestimmung berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Vorversuche und Optimierung der Methode

5.1.1 Initiale Methodentests

In den initialen Versuchen wurde ausgetestet, ob diese neu entwickelte Methode für die Extraktion der Substanzgruppe der SARM aus NEM generell funktioniert. Dazu wurden zehn NEM mit Zugabe von 50 μ L ($c=2,5\mu\text{g/g}$) des ISTDs, je einmal undotiert und einmal mit 50 μ L ($c=0,25\mu\text{g/g}$) SARM-Standard-Mischung dotiert, aufgearbeitet und mittels LC-MS vermessen. Zusätzlich wurde eine reine Standardprobe (QC) ohne NEM-Matrix mit den gleichen Volumina der beiden Standardmischungen erstellt, auf welche die Wiederfindungen bezogen wurden. Der Mittelwert der Wiederfindungsraten wurde für jede einzelne Substanz anschließend berechnet, indem der Mittelwert der Signalhöhen der Areas der jeweiligen Substanz in den zehn NEM-Proben ins Verhältnis zu dem Mittelwert der Signalhöhen der Areas der jeweiligen Substanz in der QC-Probe gesetzt wurde. Aufgrund der Aliquotierung in der Probenaufarbeitung wurde das Ergebnis des errechneten Verhältnisses weiters mit 2,5 multipliziert. Diese so erhaltenen Wiederfindungswerte mit der Standardabweichung für jede Substanz in allen zehn NEM zusammen werden in Abbildung 10 als Balkendiagramm dargestellt. Die Daten dazu sind im Anhang 4 aufgelistet.

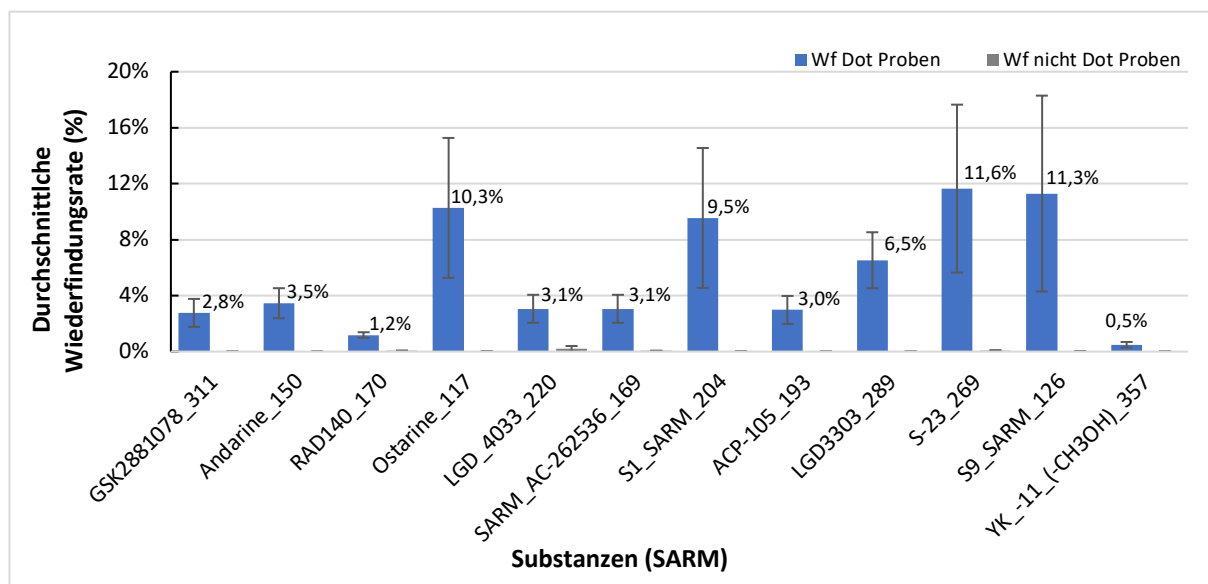


Abbildung 10: Mittelwerte der Wiederfindungsraten (%) pro Substanz in allen zehn NEM zusammen

In Abbildung 10 sind die Mittelwerte der Wiederfindungsraten in Prozent für jedes einzelne SARM in allen zehn NEM zusammen dargestellt. Zwei Proben von jedem der zehn NEM wurden dafür mit 50 μ L ($c=2,5\mu\text{g/g}$) des ISTDs und einmal ohne und einmal mit 50 μ L ($c=0,25\mu\text{g/g}$) der SARM-Standard-Mischung als Dotierung versetzt. Zusätzlich wurde eine positive Kontrolle (QC) ohne NEM-Matrix und ohne Aufarbeitungsprozess mit denselben Volumina der beiden Standard-Gemische erstellt, welche als Referenz dient. Die NEM-Proben wurden aufgearbeitet und zusammen mit der QC mittels LC-MS vermessen. In der Abbildung 10 ist der Mittelwert der Wiederfindungsrate über alle zehn NEM hinweg in den dotierten Proben als blaue Balken und der Mittelwert in den nicht dotierten Proben als graue Balken dargestellt. Die Wiederfindungsrate wurde anhand des Mittelwerts der jeweiligen Substanz in allen zehn NEM zusammen in Bezug auf den Mittelwert der jeweiligen Substanz in der positiven Kontrolle (QC) berechnet und aufgrund der Aliquotierung mit 2,5 multipliziert. Diese Werte wurden in Prozent mit ihren Standardabweichungen als Balkendiagramm dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Intervall um den Mittelwert $\pm$ STD gezeigt.

In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass für jedes SARM zumindest ein kleines Signal im Durchschnitt in allen zehn untersuchten NEM bezogen auf die QC-Probe wiedergefunden werden konnte. Die Standardabweichung fällt bei vielen Analyten relativ hoch aus, da die Wiederfindungsraten einer Substanz in zehn unterschiedlichen NEM zusammengefasst wurden und diese unter den zehn NEM entsprechend variieren kann. Der Mittelwert der Wiederfindungsrate mancher Substanzen wie zum Beispiel S9 oder S23 fällt dabei im Allgemeinen höher aus und liegt bei rund 12% bezogen auf die Standardlösung (QC) als beispielsweise die durchschnittliche Wiederfindungsrate von YK-11 oder RAD140, welche im Durchschnitt bei rund 1% liegt. Aufgrund der Arbeit von Lee J.H. *et al.* (2021) [54] und der niedrigen gefundenen Wiederfindungsrate von YK-11 in den Experimenten ist erkennbar, dass YK-11 in Lösung offenbar nicht stabil ist und mit der Zeit zerfällt. Deswegen konnte im Durchschnitt nicht mehr viel Substanz in den zehn NEM zusammen nachgewiesen werden. Die Spanne der Mittelwerte der Wiederfindungsraten über alle zehn NEM in diesem Experiment reicht von 0,5% bis maximal knapp unter 12% und die Standardabweichungen fallen bei manchen Substanzen relativ hoch aus. Der hohe Verlust während der Aufarbeitung und die Abweichungen der Messungen müssen bei den Interpretationen der Werte zur Wiederfindung berücksichtigt werden. Die angegebene durchschnittliche Wiederfindungsrate der undotierten Proben beträgt bei manchen Substanzen, wie zum Beispiel bei LGD-4033, knapp über 0% bezogen auf die QC-Probe, obwohl diese nicht mit dem SARM-Standard dotiert wurden. Eine Erklärung hierfür wäre die falsche Integrierung des Peaks durch die Software zu der bestimmten Retentionszeit der entsprechenden Substanzen in den undotierten Proben oder die Verschleppung durch die im Vorhinein gemessene dotierte und somit positive Probe, welche direkt vor der undotierten Probe vermessen wurde. Um dies festzustellen, wurde die Verschleppungsrate als Validierungsparameter in die Arbeit mitaufgenommen.

5.1.2 Puffer-pH-Wert Optimierung

Die ersten Versuche wurden anfänglich stets mit einem neutralen 0,8M Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Um gegebenenfalls bessere Ausbeuten zu erhalten oder die generelle Stabilität der Substanzen bei verschiedenen pH-Werten zu untersuchen, wurde die Probenvorbereitung ebenfalls in einem leicht sauren Milieu durch einen sauren Phosphatpuffer (pH-Wert 5) und in einem leicht basischen Milieu durch einen basischen Phosphatpuffer (pH-Wert 9) ausgetestet. Der neutrale Phosphatpuffer wurde dazu mit einer 0,8M Kaliumdihydrogenphosphatlösung entsprechend auf pH-Wert 5 angesäuert. Um den basischen Phosphatpuffer herzustellen, wurde die Substanz Dinatriumhydrogenphosphat zu der neutralen Pufferlösung hinzugegeben, um einen pH-Wert von 9 einzustellen. Mit diesen drei Pufferlösungen wurden zum einen drei NEM einmal undotiert und einmal mit 50µL ($c=0,25\mu\text{g/g}$) SARM-Standard-Mischung dotiert aufgearbeitet. Zum anderen wurde der LW (H_2O) und dementsprechend

keine NEM-Matrix ebenfalls mit allen drei Puffern, je dotiert und undotiert, aufbereitet. Zusätzlich wurde wieder eine QC-Probe erstellt, auf welche die Ausbeuten bezogen wurden, indem 50µL ($c=2,5\mu\text{g/g}$) des ISTDs zusammen mit 50µL ($c=0,25\mu\text{g/g}$) der SARM-Standard-Mischung in Methanol pipettiert wurde. Die QC-Probe unterließ wieder keiner Probenvorbereitung und wurde gleichsam wie die anderen Proben eingedampft, anschließend in 500µL Methanol:Wasser (9:1) aufgenommen und mit LC-MS vermessen. Danach wurde erneut die Signalhöhe der Area der jeweiligen Substanz in den dotierten NEM-Proben zur Signalhöhe der Area desselben SARM in der QC ins Verhältnis gesetzt, um die Wiederfindungsrate jeder Substanz in den drei NEM und dem LW in den verschiedenen Puffern zu errechnen. Dabei wurde YK-11 nicht in die Berechnung miteinbezogen, weil es durch Hydrolyse im Zuge der Probenvorbereitung abgebaut wurde. Aus diesen Einzelwerten der Wiederfindungsraten der jeweiligen Substanzen wurde der Mittelwert für jedes NEM und dem LW in den drei Puffern berechnet und als Balkendiagramm dargestellt. Dabei wurde ausgewertet, welcher Puffer die höchste durchschnittliche Wiederfindungsrate aller SARM zusammen ergibt, um den bestmöglichen pH-Wert für weitere Experimente herauszufinden. Die Ergebnisse zum Mittelwert der Wiederfindungsraten berechnet aus elf der zwölf SARM zusammen in den drei NEM und in dem Leerwert (H_2O) mit den drei Phosphatpuffern sind in Abbildung 11 dargestellt und die Daten dazu sind in Anhang 5. In Abbildung 12 ist das Gesamtergebn der Mittelwerte der Wiederfindungsraten und den Standardabweichungen von elf SARM zusammen in den drei Puffern von den drei unterschiedlichen NEM und dem LW vereint gezeigt, welches für die Entscheidung der Wahl

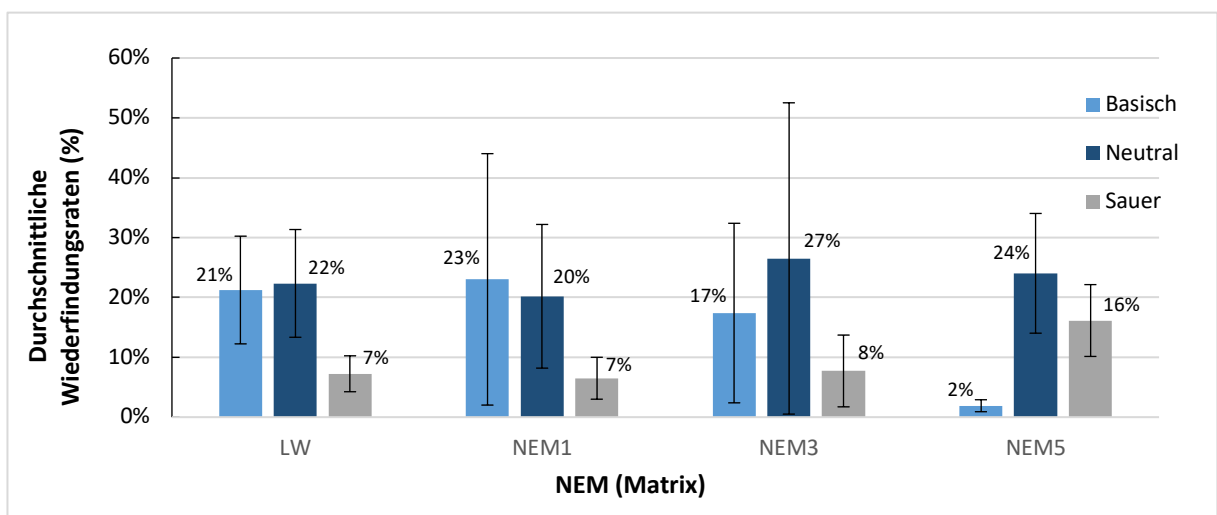


Abbildung 11: Mittelwerte der Wiederfindungsraten (%) von elf SARM zusammen pro NEM + LW in drei verschiedenen Puffern

In Abbildung 11 sind die Mittelwerte der Wiederfindungsraten von elf SARM zusammen in den dotierten Proben der drei unterschiedlichen NEM und dem Leerwert mit Hilfe von drei verschiedenen Phosphatpuffern dargestellt. Drei NEM und der LW wurden dafür durch Zugabe von 50µL ($c=2,5\mu\text{g/g}$) des ISTDs und, je einmal undotiert und einmal mit 50µL ($c=0,250\mu\text{g/g}$) SARM-Standard-Mischung dotiert, aufgearbeitet und mit LC-MS vermessen. In der Abbildung 12 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Wiederfindungsraten dieser elf SARM zusammen in den dotierten Proben bezogen auf die jeweiligen Substanzen in der QC-Probe im basischen Puffer als blaue Balken, im neutralen Puffer als dunkelblaue Balken und im sauren Puffer als graue Balken dargestellt. Die Wiederfindungsrate wurde anhand der Signalhöhe der Area der jeweiligen Substanz in den drei NEM und dem LW in Bezug auf die Signalhöhe der Area der jeweiligen Substanz in der positiven Kontrolle (QC) berechnet. Aus diesen Einzelwerten der Wiederfindungsraten der elf untersuchten Substanzen wurde der Mittelwert für jedes NEM und dem LW in den drei Puffern berechnet. Die Standardabweichungen sind als Intervall um den Mittelwert $\pm\text{STD}$ gezeigt.

Abbildung 11 stellt die Mittelwerte samt Standardabweichungen der Wiederfindungsraten der elf SARM zusammen pro NEM oder LW in drei Phosphatpuffern in jeweils unterschiedlichen pH-Werten dar. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate der elf SARM zusammen ist in allen drei NEM und dem LW im neutralen Puffer am höchsten, außer in NEM 01, in welchem der basische Puffer mit rund 21% leicht höhere Messergebnisse liefert. Der saure Puffer zeigt in allen drei NEM und dem LW die niedrigsten durchschnittlichen Wiederfindungsraten der SARM, außer in NEM 05, wo der basische Puffer die niedrigsten Werte ergibt. In NEM 05 hat der basische Puffer keine zufriedenstellenden Ergebnisse geliefert, da hier die Wiederfindungsrate allgemein sehr niedrig ist im Vergleich zu den anderen NEM.

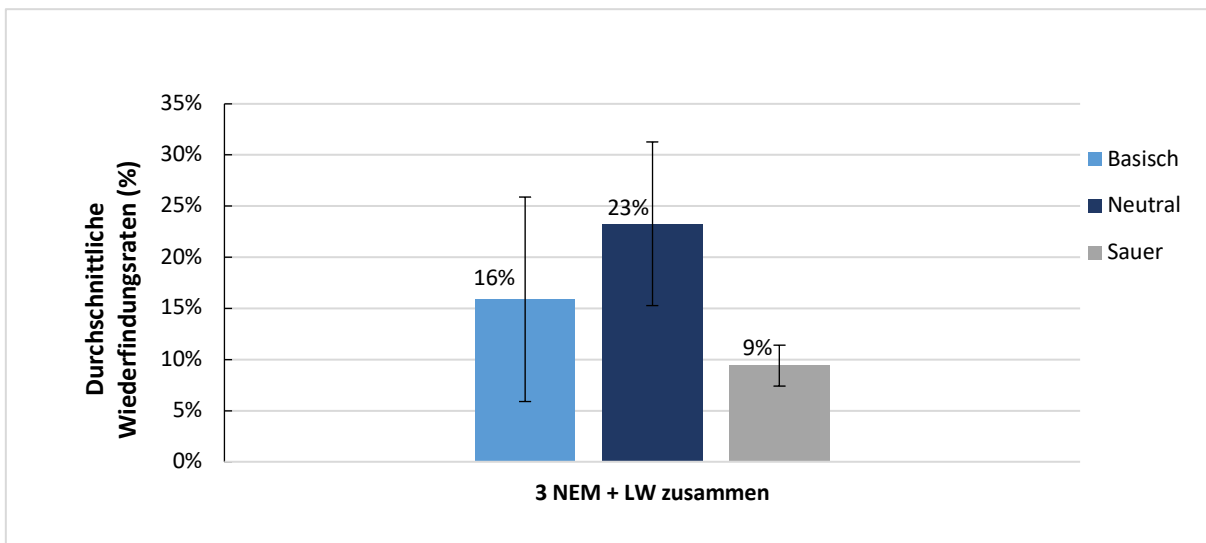


Abbildung 12: Mittelwerte der Wiederfindungsraten (%) von elf SARM zusammen in drei NEM + LW vereint in drei verschiedenen Puffern

In Abbildung 12 sind die Mittelwerte der Wiederfindungsraten von elf SARM zusammen in den dotierten Proben der drei unterschiedlichen NEM zusammen mit dem Leerwert in drei verschiedenen Phosphatpuffern dargestellt. Drei NEM und der LW wurden dafür mit 50 µL ($c=2,5\mu\text{g/g}$) des ISTDs versetzt und, je einmal undotiert und einmal dotiert mit 50 µL ($c=0,25\mu\text{g/g}$) SARM-Standard-Mischung, aufgearbeitet und mit LC-MS vermessen. In der Abbildung 12 ist die durchschnittliche Wiederfindungsrate in den dotierten Proben im basischen Puffer als blaue Balken, im neutralen Puffer als dunkelblaue Balken und im sauren Puffer als graue Balken dargestellt. Die Wiederfindungsrate wurde dabei anhand der Area der Substanzen in den dotierten Proben in den drei NEM und dem Leerwert in Bezug auf die Area der jeweiligen Substanz in der positiven Kontrolle (QC) berechnet. Aus den Einzelwerten der Wiederfindungsraten der Substanzen wurde der Mittelwert in den drei NEM und dem LW zusammen in den drei Puffern berechnet. Die Standardabweichungen sind als Intervall um den Mittelwert $\pm\text{STD}$ gezeigt.

Abbildung 12 verdeutlicht, warum der neutrale Puffer für weitere Probenaufarbeitungen ausgewählt wurde. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate der elf SARM zusammen in allen drei NEM und dem Leerwert vereint beträgt im neutralen Phosphatpuffer rund 23% und ist somit um 7% höher als im basischen Puffer und um 14% höher als im sauren Puffer. Die Streuung der Messwerte angedeutet in den schwarzen Intervallen als Standardabweichung fällt wieder höher aus, da die einzelnen Substanzen unterschiedliche Wiederfindungsraten in den drei NEM und der Leerwertmatrix gezeigt haben.

5.1.3 Optimierung der Instrumentenmethode

Das HPLC-System besteht wie bereits oben beschrieben aus einer gepackten Säule, durch welche die mobile Phase hindurchfließt, wobei der Analyt durch verschiedene Wechselwirkungen an der stationären Phase adsorbiert und somit verzögert retardiert wird. Hinzukommend besteht ein NEM aus vielen verschiedenen Inhaltsstoffen, welche zusammen als Matrix in dieser Arbeit beschrieben wurden. Diese Inhaltsstoffe sind meist auch nicht homogen in den einzelnen Darreichungsformen verteilt. Es wurde versucht, die störenden Komponenten, welche andere Eigenschaften als die gesuchten Analyten aufweisen, in der Probenaufarbeitung weitestgehend abzutrennen. Lipophile Inhaltsstoffe aus dem NEM, welche ebenfalls durch das XAD-4 extrahiert wurden, befinden sich dennoch zum Ende der Aufarbeitung mit in der Probe. Bei der Auswertung der Dreifachmessung der einzelnen SARM während des Validierungsprozesses wurde festgestellt, dass die Messergebnisse untereinander teilweise stark variierten und die RSD der drei Messungen bei manchen SARM bei knapp 25% lag. Auch wenn der Mittelwert der drei Messergebnisse für die weiteren Berechnungen herangezogen wurde, muss dieser Verlust der Präzision berücksichtigt werden. Bei der Dreifachbestimmung vieler Proben wurde teilweise ein Muster erkennbar, da die erste der drei Messungen jeweils die höchsten Signalintensitäten lieferte und die dritte Messung die niedrigsten. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten diese störenden Inhaltsstoffe in den NEM sein, welche in der Säule verblieben sind und so das Signal derselben Probe beim darauffolgenden Messvorgang wegen des Matrixeffekts inkonstant abschwächten. Um dies zu verbessern, wurde die Instrumentenmethode verändert, indem die Gesamtlaufzeit einer Probenmessung auf 15 Minuten ausgeweitet wurde und davon die letzten fünf Minuten die Säule mit dem Lösungsmittel A, Methanol und 0,2%-Ameisensäure durchgespült wurde. Außerdem wurde nach jedem NEM ein zusätzlicher Waschschrift hinzugefügt.

Ein weiterer Verbesserungsschritt der Methode selbst wurde durch Änderung der Temperatur im Autosampler bewerkstelligt. Durch die Kühlung der Proben im Autosampler auf eine Temperatur von 4°C konnte YK-11 besser stabilisiert werden und lieferte somit detektierbare Peaks für die Auswertungen. Die übrigen Analyten wurden dadurch aber nicht negativ in ihrer Stabilität beeinflusst.

5.2 Ergebnisse der Validierungsparameter

5.2.1 Selektivität

Zur Bestimmung der Selektivität wurden negative Blankproben des NEM mit den dotierten Proben desselben NEM verglichen. Die aufgenommenen substanzspezifischen Übergänge der jeweiligen Substanzen wurden dabei in den zwei Proben gegenübergestellt. Im Idealfall wird in der Blankprobe kein Signal zur spezifischen Retentionszeit der Substanz gemessen, während die dotierten Proben der NEM ein eindeutiges Signal detektiert wird. Zur Veranschaulichung der Selektivität werden in Abbildung 13 vier Chromatogramme der ausgewählten Übergänge von Andarin bei einem m/z-Verhältnis von 261 und 150 dargestellt.

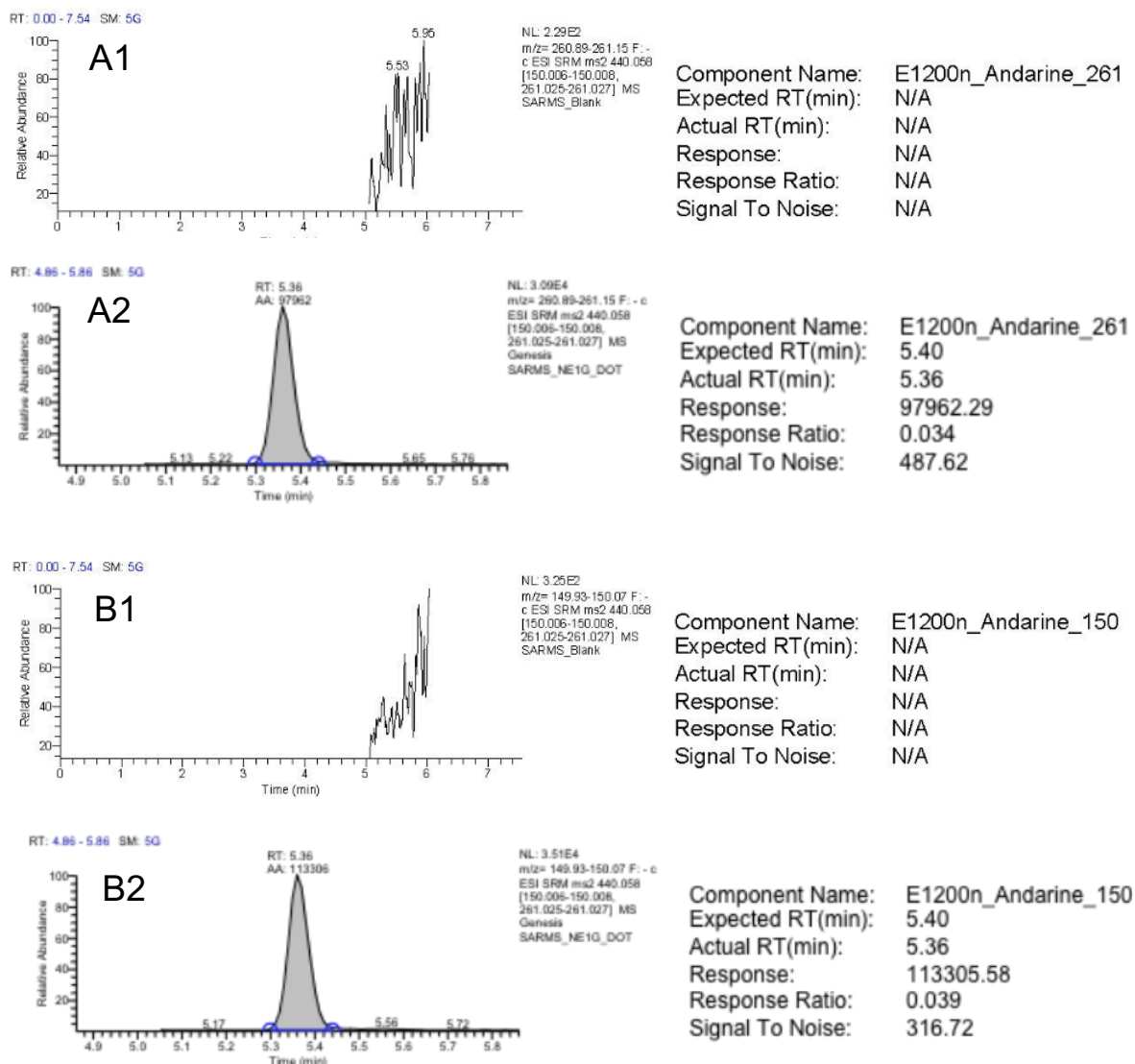


Abbildung 13: Vier Chromatogramme von zwei selektiven Übergängen von Andarin in der undotierten (Blank) und in der mit dem SARM-Standard dotierten Probe eines NEM

Abbildung 13 zeigt vier Chromatogramme von zwei selektiven Übergängen von Andarin bei einem m/z-Verhältnis von 261 (A1,A2) und 150 (B1,B2). In A1 und B1 sind die Hintergrundsignale der Andarin-selektiven Massenübergänge in der undotierten NEM-Probe dargestellt. In A2 und B2 sind die integrierten Flächen des jeweiligen Andarin-Peaks in der dotierten NEM-Probe nach Zusatz von 1 µL SARM-Standard (c=0,005 µg/g) dargestellt. Alle Chromatogramme wurden zur Retentionszeit (5,36 Min) von Andarin aufgenommen. Das Signal von Andarin ist bei der undotierten Probe (A1,B1) nicht vorhanden, während in der dotierten Proben (A2,B2) ein integrierbarer Peak mit einer dazugehörigen Fläche gemessen werden konnte.

In Abbildung 13 sind vier Chromatogramme von zwei spezifischen Übergängen von Andarin mit einem m/z-Verhältnis von 261 und 150 zu einer Retentionszeit von 5,36 Minuten dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass in den zwei Chromatogrammen der undotierten Probe (A1,B1) nur Hintergrundrauschen detektiert wurde. Allerdings zeigen die zwei Chromatogramme der dotierten Probe, ein eindeutiges Signal. Die Methode in dieser Arbeit kann deswegen als selektiv für die Substanzgruppe der SARM angesehen werden, da in den nicht dotierten Proben kein Signal und in den dotierten Proben ein substanzspezifisches Signal zu den passenden Retentionszeiten gemessen wurde.

5.2.2 Präzision

Die Präzision wurde anhand der Messpräzision bestimmt. Diese wurde durch zehnfache Injektion derselben Probe ins LC-MS-Gerät erstellt. Dabei wurden fünf unterschiedliche Konzentrationen des SARM-Standard-Gemisches ohne Probenaufarbeitung zehnmal hintereinander vermessen. Der Mittelwert und die relative Standardabweichung (RSD) von jeder Substanz bei diesen fünf Konzentrationen zusammen ergibt die Gerätepräzision. Sie gibt Aufschluss darüber wie präzise die Substanzgruppe der SARM durch das Analysengerät selbst erfasst werden kann. Eine hohe Präzision wird dabei durch eine niedrige RSD angezeigt. In Abbildung 14 ist das Ergebnis dieser Messung graphisch dargestellt und im Anhang 6 die entsprechenden Daten dazu aufgelistet.

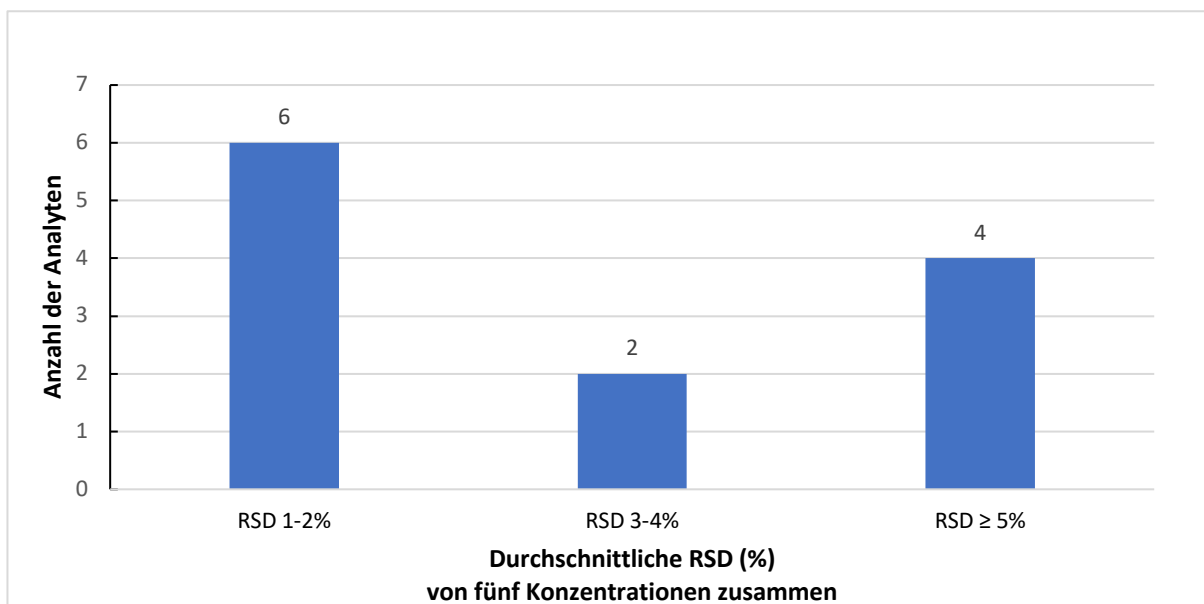


Abbildung 14: Anzahl der SARM in verschiedenen Bereichen der RSD (%) in fünf verschiedenen Konzentrationen zusammen

Abbildung 14 bildet die Anzahl der SARM in verschiedenen Bereichen der RSD in fünf unterschiedlichen Konzentrationen zusammen gerechnet, ab. Dazu wurden fünf Proben mit Rekonstitutionsflüssigkeit und damit ohne Matrix und ohne Probenaufarbeitung mit fünf unterschiedlichen Volumina (1µL, 5µL, 10µL, 25µL, 50µL entspricht 20pg, 100pg, 200pg, 500pg, 1000pg bei 10µL Injektionsvolumen) des SARM-Standard-Gemisches dotiert und jede Probe zehnmal hintereinander mit LC-MS vermessen. Die blauen Balken im Diagramm geben die Anzahl der zwölf untersuchten Analyten an, welche im Durchschnitt bei allen fünf Konzentrationen eine entsprechende RSD gezeigt haben.

Tabelle 12: Durchschnittliche RSD aller SARM über fünf verschiedene Konzentrationen zusammen

RSD 1-2%	RSD 3-4%	RSD ≥ 5%
GSK2881078_190 (1%) RAD140_223 (1%) LGD-4033_220 (1%) SARM AC-262536_169 (1%) ACP-105_193 (1%) LGD-3303_245 (1%)	Andarin_150 (4%) Ostarin_185 (3%)	S1_260 (5%) S23_144 (5%) S9_260 (5%) YK-11_325 (33%)

Aus der Abbildung 14 und der Tabelle 12 ist ersichtlich, dass sechs der zwölf untersuchten Substanzen eine niedrige RSD im Durchschnitt über alle fünf Konzentrationen zusammen mit maximal bis zu 2% zeigen. Dabei ergeben S1, S9 und S23 bei der Probe, in welche 10µL SARM-Standard-Mischung hinzugefügt wurde, eine RSD bei den zehn Messungen von über 10%, weswegen für diese drei Analyten ein Mittelwert der RSD von 5% über alle fünf Konzentrationen hinweg berechnet wurde. Mit Abstand die höchste RSD und damit einen Ausreißer zeigt die Substanz YK-11, welche bei einem Mittelwert von 33% liegt. Daraufhin wurde die oben bereits beschriebene Änderung der Temperatur im Autosampler vorgenommen, was zu besseren Signalen bei den darauffolgenden Messungen dieser Substanz führte. Im Allgemeinen kann die Präzision des LC-MS-Gerät für die Substanzgruppe aber als ausreichend gut bewertet werden, da die RSD der Messwerte für elf der zwölf Substanzen im Bereich zwischen 0 und 5% liegen.

5.2.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) eines Analyten wurde anhand des Vorhersageintervalls und des kritischen Wertes laut DIN 32645 berechnet. Die genauen Messergebnisse des LOD und des LOQ sind im Anhang 7 einzusehen. Je niedriger dabei die Nachweisgrenze einer Substanz, desto kleiner sind die Mengen der Substanz, welche in einem bestimmten NEM mit 50% Wahrscheinlichkeit rein qualitativ nachgewiesen werden können. Analog dazu entspricht die Bestimmungsgrenze einem Wert, welcher umso niedriger ist, umso weniger Substanz mit einer gewissen Irrtumswahrscheinlichkeit noch quantifiziert werden kann [42]. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse zu den Mittelwerten der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der zwölf SARM zusammen pro NEM und damit in sechs unterschiedlichen Matrices dargestellt. In Abbildung 16 sind die Mittelwerte der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen pro SARM in den sechs NEM zusammen abgebildet. Die Abbildungen sind der folgenden Seite zu entnehmen.

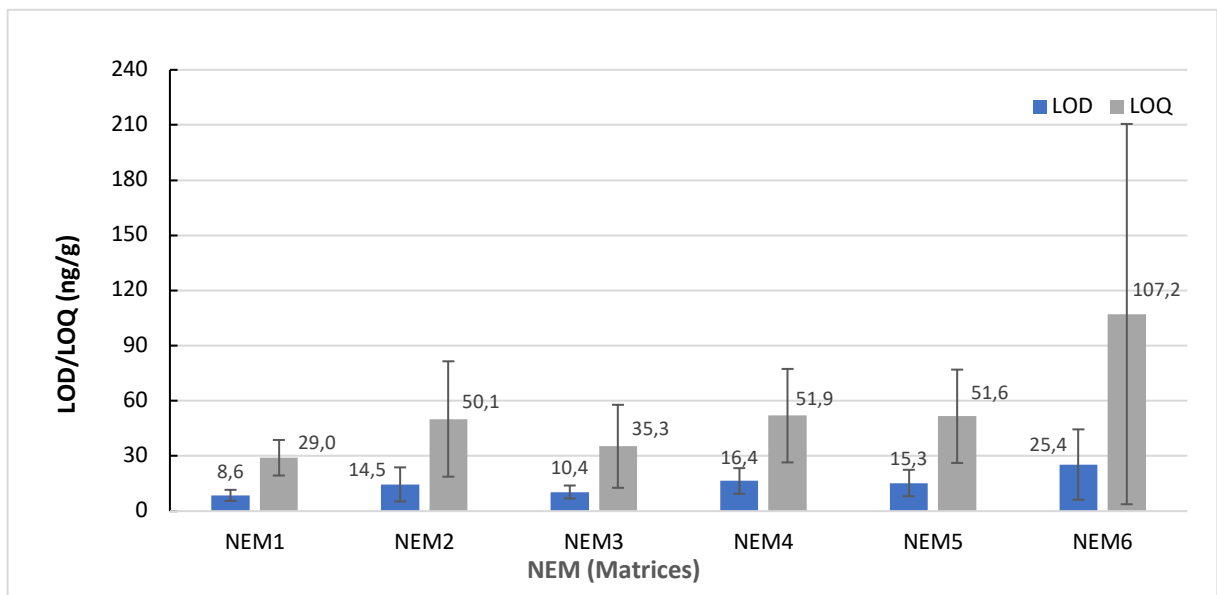


Abbildung 15: Mittelwerte der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (ng/g) aller zwölf SARM zusammen pro NEM (Matrix)

Abbildung 15 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der zwölf SARM zusammen in sechs unterschiedlichen NEM (Matrices) in ng/g. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Daten der Linearität und wurde nach DIN 32645 mit dem Vorhersageintervall und dem kritischen Wert des niedrigsten Kalibrierpunkts kalkuliert. Von diesen berechneten Werten der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen aller zwölf SARM wurde der Mittelwert für jedes NEM kalkuliert und im Balkendiagramm abgebildet. Die Mittelwerte der Nachweisgrenzen sind dabei in blauen und die Mittelwerte der Bestimmungsgrenzen in grauen Balken dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Intervalle um den Mittelwert $\pm$ STD gezeigt.

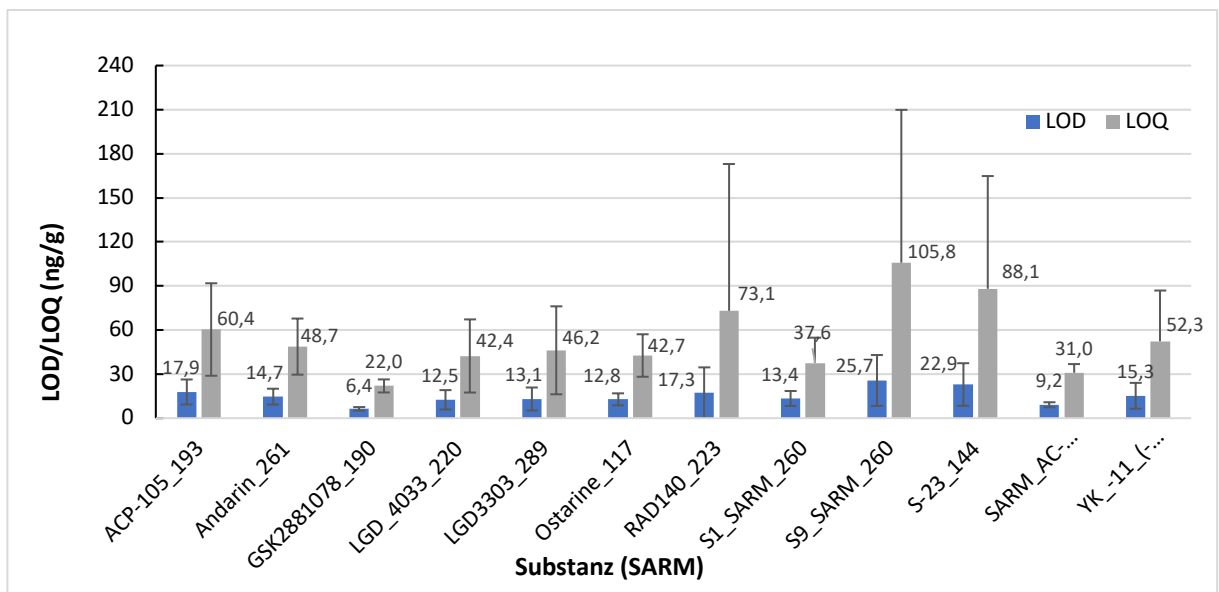


Abbildung 16: Mittelwerte der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (ng/g) pro Substanz in sechs NEM zusammen

Abbildung 16 zeigt die Mittelwerte der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der zwölf SARM in sechs unterschiedlichen NEM (Matrices) zusammen in ng/g. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Daten der Linearität und wurde nach DIN 32645 mit dem Vorhersageintervall und dem kritischen Wert der niedrigsten Kalibrierpunkts kalkuliert. Von diesen berechneten Werten der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen wurde für alle zwölf SARM der Mittelwert in allen sechs NEM zusammen kalkuliert und im Balkendiagramm abgebildet. Die Mittelwerte der Nachweisgrenzen sind dabei in blauen und die Mittelwerte der Bestimmungsgrenzen in grauen Balken dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Intervalle um den Mittelwert $\pm$ STD gezeigt.

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass die Mittelwerte der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in NEM 1 mit $8,6 \pm 3,0 \text{ ng/g}$ bzw. mit $29 \pm 10 \text{ ng/g}$ am niedrigsten und in NEM 6 mit $25 \pm 19 \text{ ng/g}$ bzw. $107 \pm 103 \text{ ng/g}$ am höchsten sind. Das NEM 1 stellt nämlich einen öligen Kapselinhalt mit angenommenen Störkomponenten in der Matrix dar, wohingegen NEM 6 aus dem pulvrigen Inhalt einer Kreatinkapsel mit weniger Störfaktoren besteht. Erkennbar an den Intervallen variieren auch die Standardabweichungen nach dem gleichen Schema. Im Gesamten kann im Durchschnitt von allen zwölf SARM zusammen über alle NEM hinweg eine Nachweisgrenze von $15 \pm 6,0 \text{ ng/g}$ und eine Bestimmungsgrenze von $54 \pm 28 \text{ ng/g}$ errechnet werden.

In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass acht der zwölf Analyten im Durchschnitt über alle sechs NEM eine Nachweisgrenze von 10-20 ng/g zeigen. Dabei weisen GSK2881078 mit $6,4 \pm 1,0 \text{ ng/g}$ und $22 \pm 2,0 \text{ ng/g}$ die niedrigsten und S9 mit $26 \pm 9,0 \text{ ng/g}$ und $106 \pm 52 \text{ ng/g}$ die höchsten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Durchschnitt auf. Interessanterweise konnte YK-11 in Lösung stabilisiert werden, weswegen auch für diesen SARM annehmbare Daten berechnet werden konnten.

5.2.4 Linearität

Die Linearität gibt den Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalintensität des Analyten wieder. Dazu wurden die sechs NEM mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen der SARM-Standard-Mischung dotiert, aufgearbeitet und mittels LC-MS vermessen. Die anschließende Berechnung erfolgte anhand einer Dreifachbestimmung jeder einzelnen Probe. Die errechneten Mittelwerte jedes SARM wurde ins Verhältnis mit den Mittelwerten der ISTD-Mischung aus derselben Probe gesetzt. Dieses Verhältnis wurde gegen ihre Konzentration aufgetragen, um so eine Kalibriergerade zu erhalten. Jedoch wurde im Zuge der Auswertung erkannt, dass die höchste Konzentration mit $0,25 \mu\text{g/g}$ bei vielen SARM außerhalb ihres linearen Bereiches lag. Somit wurde diese höchste Konzentration nicht in die nachfolgenden Berechnungen hineingenommen. Exemplarisch wird dies an den zwei Kalibriergeraden von Ostarin in Abbildung 17 und 18 veranschaulicht. Die Daten dazu befinden sich im Anhang 8.

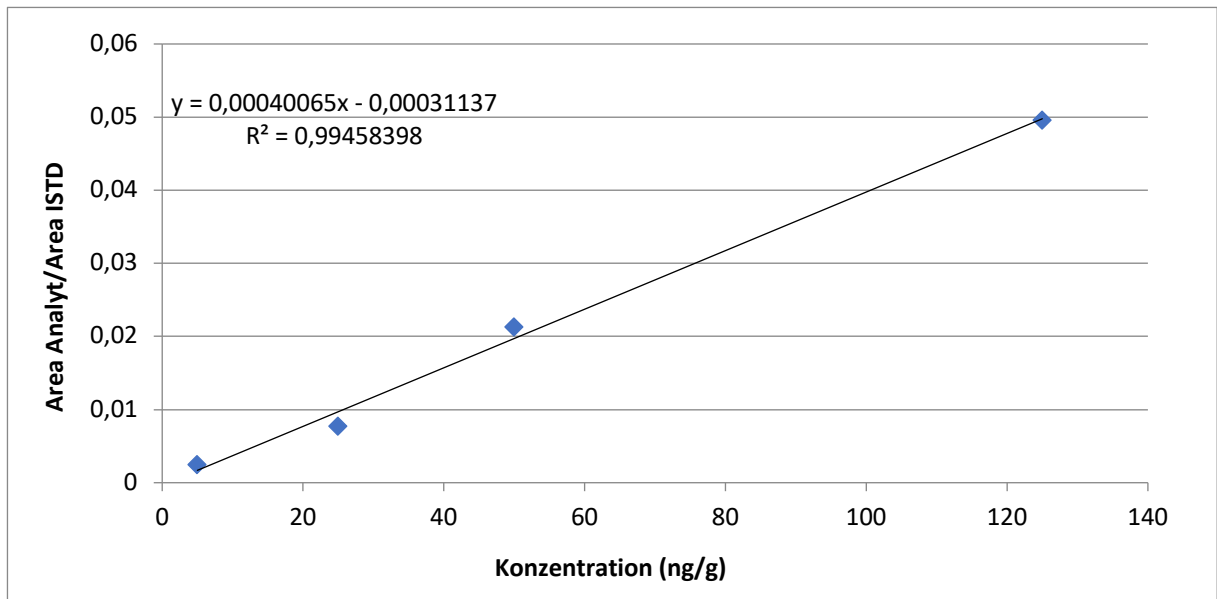


Abbildung 17: Kalibriergerade von Ostarin in NEM 1 (1)

Abbildung 17 zeigt die erstellte Kalibriergerade von Ostarin in NEM 1 mit vier Kalibrierpunkten. Dazu wurden Proben des NEM 1 mit vier unterschiedlichen Volumina (1µL, 5µL, 10µL, 25µL) der SARM-Standard-Mischung dotiert, aufgearbeitet und mittels LC-MS vermessen. Das Verhältnis jedes einzelnen Analyten zum ISTD wurde dazu gegen die Konzentration aufgetragen, umso eine Kalibriergerade zu erhalten. Geradenfunktion: $y = 0,00040065x - 0,00031137$, Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,99458398$

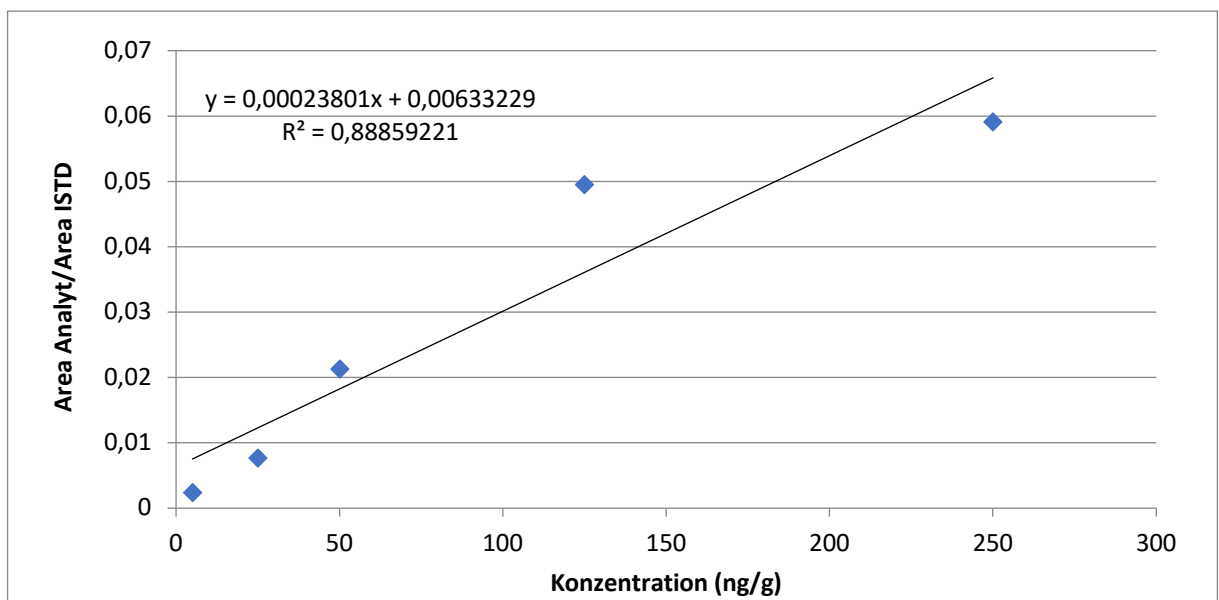


Abbildung 18: Kalibriergerade von Ostarin in NEM 1 (2)

Abbildung 18 zeigt die erstellte Kalibriergerade von Ostarin in NEM 1 mit fünf Kalibrierpunkten. Dazu wurden Proben des NEM 1 mit fünf unterschiedlichen Volumina (1µL, 5µL, 10µL, 25µL, 50µL) der SARM-Standard-Mischung dotiert, aufgearbeitet und vermessen. Das Verhältnis jedes einzelnen Analyten zum ISTD wurde dabei gegen die Konzentration aufgetragen, umso eine Kalibriergerade zu erhalten. Geradenfunktion $y = 0,00023801x - 0,00633229$, Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,88859221$

Am Beispiel von Ostarin ist zu erkennen, dass die Substanz nur in einem gewissen Bereich ein lineares Signal liefert, in welchem eine bestimmte Konzentration des SARM auch eine dazu korrelierende Signalintensität der Area wiedergibt. Durch Hinzunahme des fünften Kalibrierpunktes mit der höchsten Konzentration ist sichtbar, dass die Gerade dadurch deutlicher den Nullpunkt verfehlt und das Bestimmtheitsmaß abnimmt. Durch Hinzunahme des fünften Kalibrierpunktes konnte ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Nachweisgrenzen wahrgenommen werden. Aufgrund des nicht linearen Verhaltens einiger SARM in diesem Bereich wurde die höchste Konzentration ($c=0,25\mu\text{g/g}$) bei der Erstellung der Kalibriergeraden und Berechnungen des Bestimmtheitsmaßes bei allen NEM ausgeschlossen.

In Abbildung 19 wird das Ergebnis der Linearität in Form der Mittelwerte der Bestimmtheitsmaße aller zwölf SARM zusammen in den sechs verschiedenen NEM dargestellt. Je näher dabei das Bestimmtheitsmaß an 1 liegt, desto besser liegen die Kalibrierpunkte auf einer linearen Regressionsgerade. Dazu wurden die Mittelwerte der Bestimmtheitsmaße für alle untersuchten Substanzen pro NEM mit vier Kalibrierpunkten berechnet und als Balkendiagramm auf der folgenden Seite dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Intervalle um den Mittelwert $\pm\text{STD}$ abgebildet.

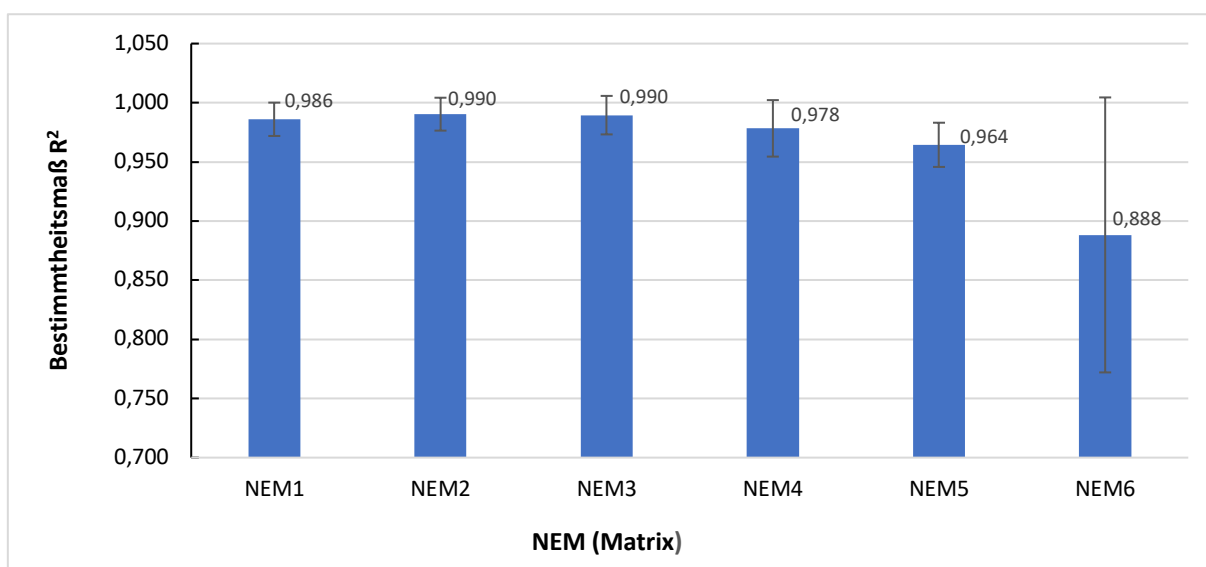


Abbildung 19: Mittelwerte der Bestimmtheitsmaße R^2 aller zwölf SARM zusammen pro NEM

Abbildung 19 zeigt die Mittelwerte der Bestimmtheitsmaße R^2 aller zwölf SARM zusammen pro NEM. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Werte der erstellten Kalibrierkurven der jeweiligen Substanzen in jedem der sechs NEM. Von diesen berechneten Werten der Bestimmtheitsmaße aller zwölf SARM wurde der Mittelwert für jedes NEM kalkuliert und als Balkendiagramm graphisch dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Intervalle um den Mittelwert $\pm\text{STD}$ gezeigt.

In Abbildung 19 ist erkennbar, dass gleichsam wie bei den Ergebnissen zur Nachweis- und Bestimmungsgrenze und entgegen den Erwartungen NEM 6 mit Abstand das niedrigste Bestimmtheitsmaß im Durchschnitt von allen zwölf SARM zusammen mit $0,888\pm 0,116$ in den sechs vermessenen NEM aufweist. Der Gesamtmittelwert des Bestimmtheitsmaßes über alle SARM hinweg in allen sechs NEM zusammen beträgt $0,966\pm 0,039$. NEM 2 und NEM 3 zeigen jeweils mit einem Bestimmtheitsmaß von $0,990\pm 0,014$ die höchsten Werte.

5.2.5 Verschleppung von Substanzen

Die Ergebnisse der Selektivität waren verantwortlich, dass dieser Validierungsparameter in diese Arbeit aufgenommen wurde. Denn in den undotierten Proben konnte zumindest für manche Analyten bei der entsprechenden Retentionszeit ein kleines Signal gemessen werden. Für die Bestimmung der Verschleppung der Substanzen im Gerät wurde zunächst eine hohe Konzentration des Analyten in einer dotierten Probe mit 200µL (c=1µg/g) SARM-Standard und 50µL (c=2,5µg/g) ISTD-Gemisch ins HPLC-MS-System injiziert. Anschließend wurden drei Blanklösungen hintereinander folgend vermessen, in welche nur 50µL der ISTD-Mischung, jedoch keine SARM-Standard-Mischung hinzugefügt wurde. Für die anschließende Berechnung der prozentualen Verschleppungsrate wurde das Verhältnis der Fläche der jeweiligen Substanz zur Fläche des ISTDs in den Blank-Proben dividiert durch das Verhältnis der Fläche der Substanz zur Area des ISTDs in der positiven Probe. Dieser Validierungsparameter wurde nur anhand des NEM2 und der reinen Matrix ohne NEM evaluiert. In der folgenden Tabelle werden die prozentualen Verschleppungsraten von allen zwölf SARM tabellarisch angegeben.

Tabelle 13: Verschleppungsrate (%) in Bezug auf die positive Probe

Verschleppungsrate (%) in Bezug auf die positive Probe						
	Ohne Matrix			NEM2		
	Blank 1	Blank 2	Blank 3	Blank 1	Blank 2	Blank3
GSK2881078_190	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Andarine_150	0,026%	0,003%	0,002%	0,009%	0%	0%
RAD140_223	0,023%	0%	0%	0%	0%	0%
Ostarine_185	0,039%	0%	0%	0%	0%	0%
LGD_4033_220	0%	0%	0%	0%	0%	0%
SARM_AC-262536_169	0,019%	0%	0%	0%	0%	0%
S1_SARM_260	0,064%	0,015%	0,007%	0%	0%	0%
ACP-105_193	0%	0%	0%	0%	0%	0%
LGD3303_245	0,12%	0%	0%	0%	0%	0%
S-23_144	0,095%	0,021%	0,012%	0%	0%	0%
S9_SARM_260	0,12%	0,030%	0,015%	0%	0%	0%
YK_-11_(-CH3OH)_325	0,073%	0,023%	0%	0%	0%	0%

Tabelle 13 zeigt, dass alle zwölf SARM sehr niedrige Verschleppungen von weniger als 1% aufweisen. Lediglich für LGD3303 und S9 werden Verschleppungen von ungefähr 0,1% bezogen auf die zuvor vermessene hochkonzentrierte Probe nachgewiesen. Interessanterweise werden die Substanzen ohne NEM-Matrix besser verschleppt als mit NEM-Matrix, da nur Andarin als einzige Substanz in der Blanklösung 1 bei der NEM2-Matrix zumindest in kleinen Mengen nachgewiesen werden konnte. Trotzdem handelt es bei allen Raten um sehr kleine Werte, deswegen kann davon ausgegangen werden, dass die untersuchten SARM nicht signifikant in den darauffolgenden Messvorgang verschleppt werden.

5.2.6 Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate gibt den Verlust der einzelnen Analyten während des Aufarbeitungsprozesses an. Die Wiederfindungsrate wurde dabei anhand der Formel aus 2.6.6 berechnet, indem das Verhältnis der Areas der jeweiligen Substanz zum ISTD in der NEM-Probe, zu welcher der SARM-Standard zu Beginn hinzugefügt wurde zum Area-Verhältnis der Substanz zum ISTD in der NEM-Probe, zu welcher der SARM-Standard erst zum Ende der Aufarbeitung hinzugegeben worden ist, bestimmt wurde. Aus diesen berechneten Verhältnissen wurde wieder der Mittelwert zusammen mit der Standardabweichung pro SARM oder pro NEM kalkuliert. In Abbildung 20 ist der Mittelwert samt Standardabweichungen dieser Wiederfindungsraten aller zwölf SARM zusammen pro NEM und LW in zwei unterschiedlichen Konzentrationen als Balkendiagramm angegeben. In Abbildung 21 ist der Mittelwert der Wiederfindungsraten samt Standardabweichungen der einzelnen Substanzen über alle sechs NEM hinweg zusammen in den zwei unterschiedlichen Konzentrationen graphisch dargestellt. Die Daten dazu sind in Anhang 9 einzusehen.

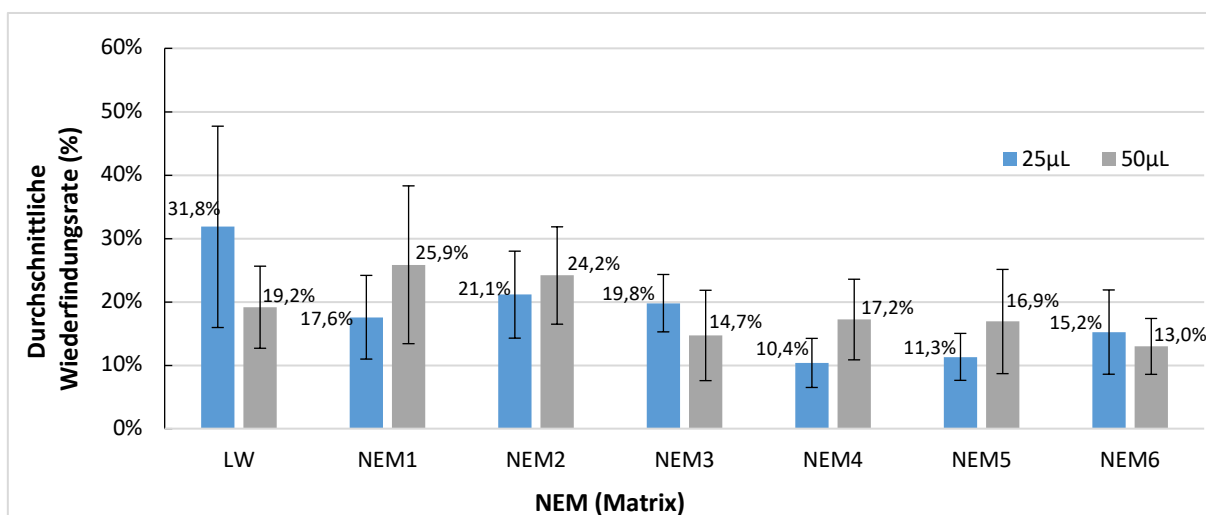


Abbildung 20: Mittelwerte der Wiederfindungsraten (%) aller zwölf SARM pro NEM + LW bei zwei Konzentrationen

In Abbildung 20 sind die Mittelwerte der Wiederfindungsraten der zwölf untersuchten SARM zusammen in den mit 25µL als blaue Balken und in den mit 50µL als graue Balken dotierten Proben in den sechs unterschiedlichen NEM und dem Leerwert dargestellt. Sechs NEM und der LW wurden dafür durch Zugabe von 50µL ($c=2,5\mu\text{g/g}$) des ISTDs und, je einmal mit 25µL ($c=0,125\mu\text{g/g}$) und je einmal mit 50µL ($c=0,25\mu\text{g/g}$) SARM-Standard-Mischung zu unterschiedlichen Zeitpunkten dotiert, aufgearbeitet und mit LC-MS vermessen. Die Wiederfindungsrate wurde anhand der Signalthöhe der Area der jeweiligen Substanz zum ISTD in der NEM-Probe, in welche zu Beginn der SARM-Standard hinzugefügt wurde, in Bezug auf die Signalthöhe der Area der jeweiligen Substanz zum ISTD in der NEM-Probe, zu welcher vor dem Eindampfen die SARM-Standard-Mischung hinzuversetzt wurde, berechnet. Aus diesen Einzelwerten der Wiederfindungsraten der zwölf untersuchten Substanzen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung für jedes NEM und der LW-Matrix in den zwei unterschiedlichen Konzentrationen berechnet. Die Standardabweichungen sind als Intervalle um den Mittelwert $\pm\text{STD}$ gezeigt.

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass in der LW-Matrix mit der Dotierung von 25µL die höchste durchschnittliche Wiederfindungsrate mit $31\pm 16\%$ von allen zwölf SARM zusammen gefunden wurde. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da in dieser Probe keine Matrixeffekte und somit keine Störfakten bei der Messung durch das NEM auftreten sollten. In den LW-Matrix-Proben mit der niedrigeren Konzentration, zu welchen 25µL SARM-Standard hinzugefügt wurden, wurde um 13% mehr Substanz wiedergefunden als im Vergleich zu den höher dosierten Proben, zu welchen 50µL SARM-Standard-Gemisch hinzugegeben wurde. Generell zeigen NEM4, NEM5 und NEM6 die niedrigsten Wiederfindungsraten mit 14% im Durchschnitt der zwei Konzentrationen. NEM1 und NEM2 stellen mit einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate von 22% und 23% der beiden Konzentrationen zusammen den höchsten Wert von den NEM dar. Die Spanne der Wiederfindungsraten aller zwölf SARM zusammen geht bei den weniger konzentrierten Proben (25µL) von 32% in der LW-Matrix bis zu 10% in NEM4 und bei der Zugabe von 50µL SARM-Standard-Mischung von höchstens 26% in NEM1 bis zu 13% in NEM6. Alle zwölf SARM zusammen in allen sechs NEM-Proben und dem LW ergeben eine gesamte Wiederfindungsrate im Durchschnitt von $18\pm 7,0\%$ bei einer SARM-Standard Zugabe von 25µL und $19\pm 5,0\%$ bei einer SARM-Standard Zugabe von 50µL.

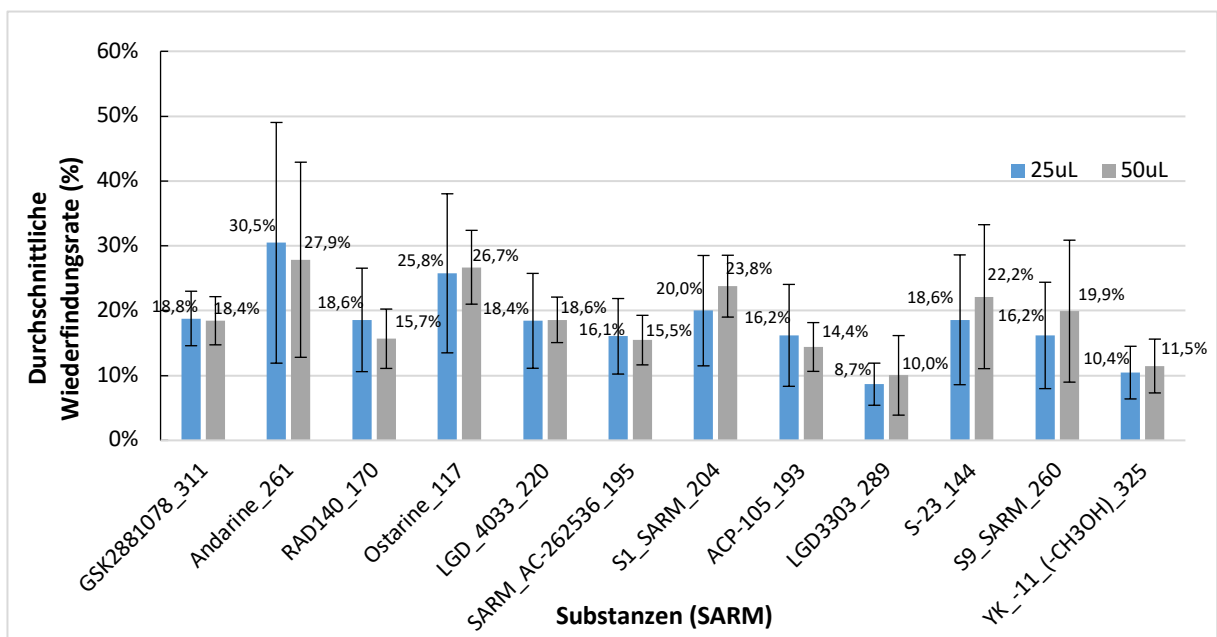


Abbildung 21: Mittelwerte der Wiederfindungsraten (%) aller zwölf SARM in sechs NEM + LW zusammen von zwei Konzentrationen

In Abbildung 21 sind die Mittelwerte samt Standardabweichungen der einzelnen Wiederfindungsraten der zwölf untersuchten SARM in den mit 25µL als blaue Balken und in den mit 50µL als graue Balken dotierten Proben in den sechs unterschiedlichen NEM und dem Leerwert zusammen dargestellt. Sechs NEM und der LW wurden dafür durch Zugabe von 50µL ($c=2,5\mu\text{g/g}$) des ISTDs und, je einmal mit 25µL ($c=0,125\mu\text{g/g}$) und je einmal mit 50µL ($c=0,25\mu\text{g/g}$) SARM-Standard-Mischung zu unterschiedlichen Zeitpunkten dotiert, aufgearbeitet und mit LC-MS vermessen. Die Wiederfindungsrate wurde anhand der Signalthöhe der Area der jeweiligen Substanz zum ISTD in der NEM-Probe, in welche zu Beginn der SARM-Standard hinzugefügt wurde, in Bezug auf die Signalthöhe der Area der jeweiligen Substanz zum ISTD in der NEM-Probe, zu welcher vor dem Eindampfen die SARM-Standard-Mischung hinzuversetzt wurde, berechnet. Aus diesen Einzelwerten der Wiederfindungsraten der zwölf untersuchten Substanzen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung in allen sechs NEM und dem LW zusammen in den zwei Konzentrationen berechnet. Die Standardabweichungen sind als Intervalle um den Mittelwert $\pm\text{STD}$ gezeigt.

In Abbildung 21 ist erkennbar, dass jeder Analyt mehr oder weniger gleiche Wiederfindungsraten unabhängig der Volumenzugabe des SARM-Standards in den sechs NEM und dem LW zusammen zeigt. Dabei stellen Andarin und Ostarin mit 29% und 26% die höchsten Wiederfindungsraten im Schnitt über beide Konzentrationen dar. LGD 3303 konnte im Durchschnitt am schlechtesten mit knapp 10% wieder detektiert werden.

5.2.7 Matrixeffekte

Matrixeffekte bedingt durch andere störende Komponenten in einem NEM erschweren die Nachweisstärke einer Methode und können zu Verlusten oder Erhöhungen der Signalintensitäten oder zu Retentionszeitverschiebungen einzelner Substanzen führen. Dies muss bei den Matrices eines NEM stets berücksichtigt werden, da NEM keine homogenen Stoffgemische darstellen und jede Substanz unterschiedlich stark von diesen Einflüssen geprägt wird. Die folgenden Ergebnisse spiegeln deswegen keine genauen Quantifizierungen dieser Störfaktoren wider, aber sollen Aufschluss über die Größenordnung dieser Effekte geben, um diese einigermaßen abschätzen zu können. Dazu wurden die sechs NEM-Matrices erstmal ohne Dotierung aufgearbeitet und extrahiert. Dabei wurde genau auf die entsprechend gleichen Voluminaentnahmen und -zugaben bei jedem Schritt der Aufarbeitung geachtet, um das Ergebnis dadurch nicht zu verfälschen, da hier nicht auf den internen Standard Bezug genommen wurde, weil dieser ebenfalls verschiedensten Matrixeffekten unterliegt. Vor dem Eindampfen wurde gleichsam neben der NEM-Probe auch eine QC-Probe ohne Matrix mit 25µL bzw. mit 50µL SARM-Standard-Mischung dotiert, auf welche die Matrix-Proben bezogen wurden. Die QC-Probe wird als Referenzwert herangezogen, da keine NEM-Matrix und damit keine Störungen der Signalwiedergabe vorhanden sind. Die Ergebnisse zu den Matrixeffekten sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt und die Daten und Berechnungen dazu sind Anhang 10 zu entnehmen.

In Abbildung 22 sind die durchschnittlichen Signalverluste der Areas aller zwölf Substanzen zusammen in den unterschiedlichen NEM abgebildet. Es ist erkennbar, dass hauptsächlich Signalminderungen aufgrund der ME aufgetreten sind, die in einer Größenordnung von ungefähr 50% liegen. Dabei verzeichnen die Substanzen in NEM5 und NEM6 im Durchschnitt mit $64 \pm 15\%$ und $66 \pm 14\%$ die höchsten und in NEM2 mit $46 \pm 20\%$ die niedrigsten Verluste der Signalintensitäten der Flächen. Im Durchschnitt über alle sechs NEM von allen zwölf SARM wurde ein Signalintensitätsverlust von $56 \pm 8,0\%$ gemessen.

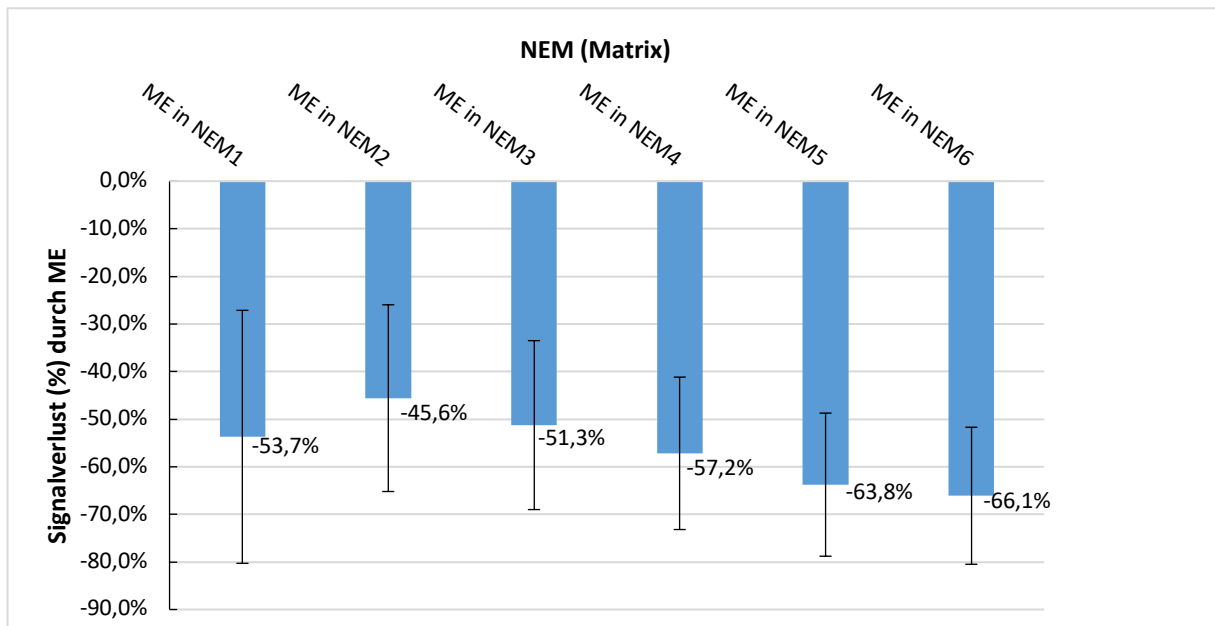


Abbildung 22: Mittelwerte der Matrixeffekte (%) aller zwölf SARM und in zwei Konzentrationen zusammen pro NEM (Matrix)

In Abbildung 22 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Matrixeffekte (%) der zwölf untersuchten SARM zusammen in den mit 25µL und mit 50µL dotierten Proben in den sechs unterschiedlichen NEM (Matrices) zusammen dargestellt. Sechs NEM wurden dafür mit je 25µL ($c=0,125\mu\text{g/g}$) oder 50µL ($c=0,25\mu\text{g/g}$) SARM-Standard-Mischung am Ende der Probenaufarbeitung dotiert und mittels LC-MS vermessen. Zusätzlich wurde gleichsam eine Kontrollprobe (QC) mit den gleichen Volumina an SARM-Standard, jedoch ohne Matrix mit vermessen. Die Matrixeffekte wurden anhand der Signalthöhe der Area der jeweiligen Substanz in der NEM-Probe in Bezug auf die Signalthöhe der Area der jeweiligen Substanz in QC-Probe ohne Matrix berechnet. Aus diesen Einzelwerten der Matrixeffekte der zwölf untersuchten Substanzen in jedem NEM wurde der Mittelwert und die Standardabweichung über beide Konzentrationen hinweg zusammen berechnet und als Signalverluste aller Substanzen im jeweiligen NEM als blaue Balken angegeben. Die Standardabweichungen sind als Intervalle um den Mittelwert $\pm\text{STD}$ gezeigt.

In Abbildung 23 ist erkennbar, wie hoch die Signalverluste der einzelnen Substanzen in den sechs NEM und in den zwei Konzentrationen zusammen sind. Während YK-11 einen Verlust der Signalintensität von über $75\pm 8,0\%$ verzeichnet, bedingt teilweise auch durch Hydrolyseprozesse, unterliegt LGD 3033 mit $11\pm 12\%$ im Durchschnitt einer niedrigeren Minderung der Signalintensität. In NEM1 konnte sogar eine geringfügige Verstärkung des Signals für diesen Analyten festgestellt werden. Grundsätzlich kann aus Abbildung 22, wie auch aus Abbildung 24 ein grundlegendes Verständnis dafür gewonnen werden, dass ME bei der Analyse und Interpretation der Ergebnisse der nachfolgend durchgeführten Feldstudie nicht außer Acht gelassen werden dürfen. Die Bestimmung der Matrixeffekte durch die anderen Komponenten in den in der Feldstudie gemessenen Produkten könnte durch solche Experimente ebenfalls besser abgeschätzt werden.

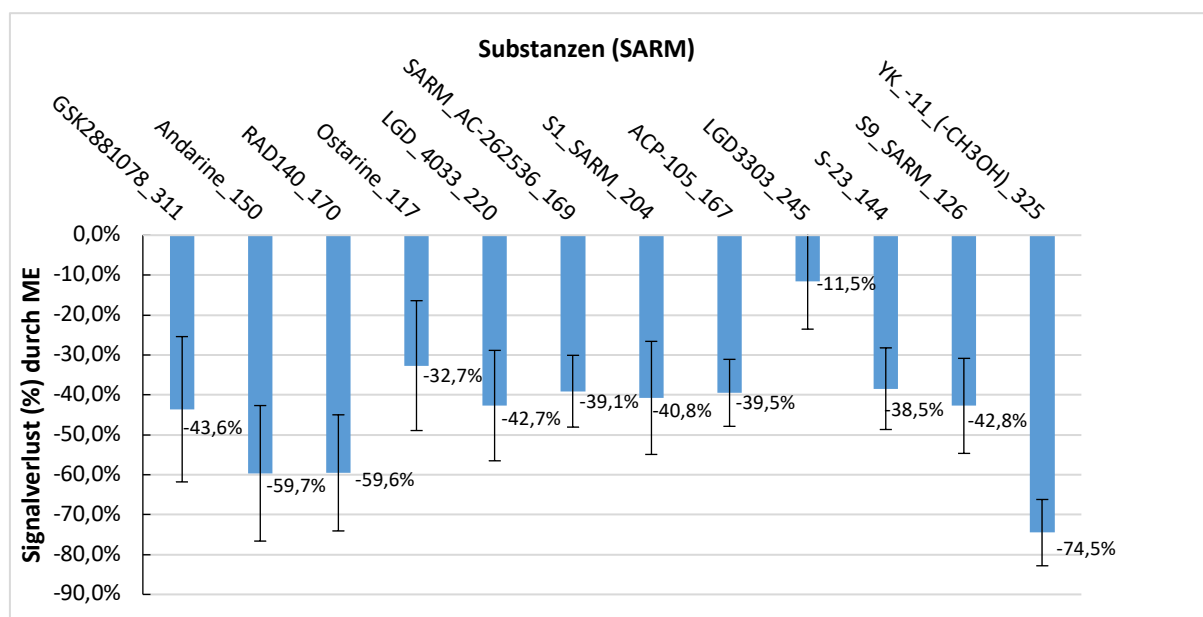


Abbildung 23: Mittelwerte der Matrixeffekte (%) pro Substanz in sechs NEM (Matrices) und in zwei Konzentrationen zusammen

In Abbildung 23 sind die Mittelwerte der Matrixeffekte (%) der einzelnen untersuchten SARM in den mit 25µL und mit 50µL dotierten Proben in den sechs unterschiedlichen NEM (Matrices) zusammen dargestellt. Sechs NEM wurden dafür mit je 25µL ($c=0,125\mu\text{g/g}$) oder 50µL ($c=0,25\mu\text{g/g}$) SARM-Standard-Mischung am Ende der Probenaufarbeitung dotiert und mittels LC-MS vermessen. Zusätzlich wurde gleichsam eine Kontrollprobe (QC) mit den gleichen Volumina an SARM-Standard, jedoch ohne Matrix mit vermessen. Die Matrixeffekte wurden anhand der Signalhöhe der Area der jeweiligen Substanz in der NEM-Probe in Bezug auf die Signalhöhe der Area der jeweiligen Substanz in QC-Probe ohne Matrix berechnet. Aus diesen Einzelwerten der Matrixeffekte der zwölf untersuchten Substanzen in jedem NEM wurde der Mittelwert und die Standardabweichung über beide Konzentrationen hinweg zusammen berechnet und als Signalverlust der jeweiligen Substanz als blaue Balken angegeben. Die Standardabweichungen sind als Intervalle um den Mittelwert $\pm\text{STD}$ gezeigt.

5.3 Ergebnisse der Feldstudie

In der Feldstudie wurden sechs Produkte aus dem Probenlager von Seibersdorf, welche aus dem Internet von Athleten gekauft wurden, sieben Produkte aus einer öffentlichen Apotheke in Niederösterreich und acht NEM aus einem Sportnahrungsergänzungsmittelshop in Wien mit dieser neuen Methode auf das Vorkommen von SARM analysiert. Dazu unterliefen alle 21 Produkte dem üblichen Aufarbeitungsprozess und wurden anschließend wieder mit LC-MS gemessen. Neben der im Vorfeld bestimmten Konzentration wurde die mit dieser neuen Methode gemessene Konzentration mit Hilfe der Kalibriergeraden der jeweiligen Substanz von NEM 6 aus der Validierung semiquantitativ abgeschätzt. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der 21 NEM mit den Konzentrationen den detektierten SARM dargestellt und in Anhang 11 die Daten und Berechnungen dazu.

Tabelle 14: Ergebnisse der Feldstudie (alle Produkte)

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft	Im Vortest ermittelte Substanz	Im Zuge dieser Arbeit ermittelte Substanzen
NEM 7	Glucosamin 1000mg	Seibersdorf Lager	Ostarin (ca. 5ng/g) Andarin (ca.30ng/g) LGD 4033 (ca.12ng/g)	Ostarin (< BG) Zusätzlich: Andarin (ca. 50ng/g) LGD-4033 (ca. 9ng/g)
NEM 8	5-HTP	Seibersdorf Lager	LGD-4033: (ca.700ng/g)	LGD-4033: (ca.2670ng/g) Zusätzlich Ostarin: (<BG) Andarin: (ca. 196ng/g) S-23: (<BG.)
NEM 9	5-HTP	Seibersdorf Lager	LGD-4033: (ca.700ng/g)	LGD-4033: (ca. 1893ng/g) Zusätzlich Andarin (<BG.) Ostarin: (<BG.) S-23: (ca. 11,4ng/g)
NEM 12	Beta-Ecdysterone	Seibersdorf Lager	S-23: (ca.20ng/g)	S-23: (<BG) Zusätzlich LGD-4033: (ca. 34ng/g)
NEM 13	Ecdysone	Seibersdorf Lager	S-23: (ca.1,8ng/g)	S-23: (<BG.) Zusätzlich: LGD-4033: (ca. 40ng/g)
NEM 14	Ecdysone	Seibersdorf Lager	S-23: (ca.1,8ng/g)	S-23: (ca. 7,7ng/g) Zusätzlich: LGD-4033: (ca. 78ng/g)
NEM 15	My Whey	Sportshop	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 16	Testo Extreme	Sportshop	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 17	Black Test	Sportshop	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 18	Brutal Anadrol	Sportshop	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 19	Tribulus Maximus	Sportshop	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 20	M-Stak	Sportshop	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 21	Fat-Burner Plus	Sportshop	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 22	R-Weiler Focus Shot	Sportshop	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 23	Fitness Eiweiss	Apotheke	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 24	Kreatin	Apotheke	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 25	Pur light Sport	Apotheke	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 26	Instant Eiweißpulver Protein pur	Apotheke	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 27	Dr. Böhm Magne- sium Sport + Aminosäuren	Apotheke	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 28	Tribulus terrestris Extrakt	Apotheke	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)
NEM 29	Ayurveda Tribulus terrestris	Apotheke	Nicht detektiert (<BG.)	Nicht detektiert (<BG.)

Tabelle 14 zeigt, dass in den NEM sowohl aus der Apotheke als auch aus dem Sportnahrungsmittelshop keine der im Analyseumfang befindlichen SARM nachgewiesen werden konnten. Diese Produkte sind somit nicht kontaminiert oder verunreinigt mit den im Analyseumfang befindlichen SARM. Lediglich in den Produkten aus Seibersdorf, wo bereits im Vorfeld einzelne SARM detektiert werden konnten, konnten die entsprechenden SARM nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, dass die Voranalysen nur auf jeweils eine, in Verbindung mit einem Dopingfall stehende Zielsubstanz ausgerichtet waren, während die gegenständliche Methode einen Multisubstanznachweis ermöglicht. Daher wurde im Vergleich zu den Voranalysen jeweils mehr SARM nachgewiesen. Somit kann die in dieser Arbeit auf Basis einer XAD-4 Extraktion entwickelte Methode als vergleichbar in qualitativer Hinsicht eingestuft werden.

Bei einzelnen SARM-Verbindungen erfolgte die Ermittlung der Konzentration im Zuge dieser Arbeit über eine semiquantitative Schätzung mit Hilfe der Kalibriergeraden von NEM 6 aus den Validierungsexperimenten. Da manche Konzentrationen aber außerhalb der Kalibriergeraden von NEM 6 und damit unter der Bestimmungsgrenze lagen, wurde somit nur ein qualitativer Nachweis erbracht. Zum Beispiel konnte Ostarin in NEM 7 in den Voranalysen mit einer Konzentration von 5ng/g bestimmt werden, wohingegen die semiquantitativ abgeschätzte Konzentration hier nicht angegeben werden konnte, da dieser Punkt auf der Kalibriergerade eine negative Konzentration angezeigt hätte.

Allgemein stellt dies jedoch eine Abschätzung der Größenordnung des jeweiligen Konzentrationsbereiches aufgrund der unterschiedlichen Matrixeffekte der jeweiligen Produkte dar.

Dies ist jedoch für diese Arbeit ausreichend und erlaubt in aller Regel eine Plausibilitätsprüfung, ob eine positive Dopingprobe die Folge eines Konsums eines bestimmten, mit einem SARM kontaminierten NEM ist, oder nicht.

6 Diskussion und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin eine neue, generelle Methode zu entwickeln, mit der die dopingrelevante Stoffgruppe der SARM nach Extraktion aus NEM mittels HPLC/MS-Analyse nachgewiesen werden kann. Dies konnte auf Basis des neu eingeführten Probenvorbereitungsprozesses mittels modifizierter Festphasenextraktion mit XAD-4 bewerkstelligt werden. Im Laufe der initialen Austestungen wurde sowohl die Aufarbeitungsmethode selbst durch Pufferauswahl als auch die Instrumentenmethode der LC/MS in den Vorversuchen optimiert, um eine für den Nachweis relevante Ausbeute aller SARM aus den NEM zu gewährleisten. Nach abgeschlossener Validierung, in welcher sieben Parameter (Selektivität, Präzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität, Verschleppung von Substanzen, Wiederfindungsrate, Matrixeffekte) untersucht wurden, konnte die Analysenmethode anschließend bei verschiedenen NEM aus einer Apotheke, aus den Beständen von Seibersdorf Laboratories und aus einem Sportnahrungsshop aus Wien erprobt und damit weiter verifiziert werden.

Nachdem sich zunächst die Vorversuche und die erstmaligen Austestungen der Aufarbeitungsmethode als erfolgreich herausstellten, wurde der neutrale Phosphatpuffer aufgrund einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate von 23% von elf der zwölf SARM zusammen in den drei NEM und dem LW vereint für die weiterführenden Experimente ausgewählt. Bei diesen Versuchen sollte aber berücksichtigt werden, dass der basische Puffer bei NEM05 nicht ausreichend gut funktioniert hat, um eine endgültige Aussage treffen zu können, welcher Puffer geeigneter sei. Zusätzlich konnte in den Vorversuchen durch die Anpassung der Instrumentenmethode in Hinblick auf die Temperaturregulierung im Autosampler YK-11 in der Lösung stabilisiert werden.

Nach den Vorversuchen wurde die neue Analysenmethode anhand sechs unterschiedlicher NEM mit deren sechs unterschiedlichen Matrices validiert, indem sie sieben ausgewählten Validierungsparametern unterzogen wurde. Aufgrund der zeitlichen Limitierung dieser Arbeit war eine Beschränkung auf diese sieben Validierungsparameter und diese sechs verschiedenen Matrices notwendig. Weiterführende Arbeiten könnten hinsichtlich der Validierungsparameter beispielsweise die Robustheit der Methode oder die Inter-Day-Präzision in Erwägung ziehen. Außerdem könnten weitere Matrices wie Sportriegeln oder Sportgele für diese Experimente herangezogen werden.

Die neue Methode konnte als selektiv für die Substanzgruppe der SARM bestätigt werden, da alle SARM in den Proben mit der niedrigsten SARM-Standardkonzentration im Gegensatz zur reinen Blanklösung detektiert werden konnten. Obwohl in manchen Blanklösungen ein unspezifisches Signal bei der entsprechenden Retentionszeit mancher SARM-Verbindungen

gemessen werden konnte, wurde dies als nicht relevante Menge der jeweiligen Substanz eingestuft.

Die Ergebnisse zur Präzision wurden mit Hilfe der relativen Standardabweichung der zehn aufeinanderfolgenden Messungen der fünf unterschiedlichen Konzentrationen zusammen berechnet. Die Mittelwerte der Messpräzision lag dabei von elf der zwölf Substanzen über alle fünf Konzentrationen zusammen in einem Bereich von 0-5%, was bei nicht durchgeführter Probenaufarbeitung annehmbar ist. Dennoch zieht sich das Problem der teilweise hohen Abweichungen bei den hintereinander durchgeführten Messvorgängen über alle Validierungsparameter, weswegen die zusätzlichen Waschschrte nach den einzelnen Messungen hinzugefügt wurden. Die Vermutung, dass einzelne Bestandteile der NEM in der Säule der HPLC zurückbleiben und erst bei der darauffolgenden Messung eluiert werden und somit Einfluss auf das Ergebnis nehmen können, konnte durch die Verbesserung der Präzision nach Hinzunahme der Waschschrte zumindest teilweise bestätigt werden. Dennoch sollte hier zukünftig dem Problem weiter auf den Grund gegangen werden, damit diese Methode in Zukunft noch präzisere Messergebnisse liefern kann.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden mit Hilfe der linearen Regressionsgerade anhand der Bestimmungen von DIN32645 berechnet. Dabei konnte für zehn der zwölf SARM-Substanzen eine Nachweisgrenze von bis zu maximal 20ng/g nachgewiesen werden. Entgegen den Erwartungen waren die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Durchschnitt bei NEM1 am niedrigsten, wohingegen NEM6 die höchsten Werte diesbezüglich lieferte, obwohl NEM1 eine ölige Suspension und NEM6 ein Monokreatinpulver aus einer Kapsel darstellte. Mit dieser indirekten Berechnungsmethode über die Kalibriergerade fallen die errechneten Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen im Durchschnitt relativ hoch aus. Eine andere Methode wie beispielsweise über das Signal-Rausch-Verhältnis-Verfahren hätte womöglich niedrigere Werte der beiden Grenzen ergeben.

Die Ergebnisse zur Linearität wurden anhand der Kalibriergeraden mit den vier unterschiedlichen Konzentrationen berechnet. Das höchste Bestimmtheitsmaß wurde in der Matrix von NEM2 und NEM3 mit 0,990 im Durchschnitt über alle zwölf Substanzen gemessen und berechnet. An dieser Stelle wurde der höchste Kalibrierpunkt mit einer Konzentration von 250ng/g außer Acht gelassen, da einige Analyten in diesem hohen Konzentrationsbereich ein nicht lineares Verhalten zeigten. Durchaus würde für weitere Experimente eine weitere Verdünnung unterhalb der niedrigsten Konzentration ($c=0,005\mu\text{g/g}$) des SARM-Standards bezüglich der Ergebnisse von sowohl der Linearität als auch der Nachweis- und Bestimmungsgrenze Sinn ergeben, da durch das Miteinbeziehen eines fünften niedrigeren Kalibrierpunkts die Ergebnisse zur Linearität und der Grenzen vermutlich verbessert würden. Aus Zeitgründen konnte dies jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit bewerkstelligt werden.

Die Verschleppungsrate wurde aufgrund der Ergebnisse zur Selektivität und teilweise wegen der niedrigen Präzision in das Repertoire der Validierungsparameter in diese Masterarbeit aufgenommen. Dabei wurden aber nur die Proben von NEM2 und die Proben ohne NEM-Matrix auf die Verschleppung von Substanzen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Verschleppungsrate aller zwölf SARM in den darauffolgenden Messvorgang bei maximal rund 0,1% lag. Dieser Wert kann damit als eine nicht-signifikante Verschleppungsrate der Analyten gedeutet werden. In zukünftigen Experimenten könnten die anderen NEM mit den anderen Matrices auf die gleiche Art und Weise untersucht und mit diesen Ergebnissen verglichen werden, um herauszufinden, ob eine Verschleppung von Substanzen bei diesen NEM eine Rolle spielt.

Die Wiederfindungsrate ist ein Maß dafür, welche Mengen an Analyten während der Probenaufarbeitung verloren gehen. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate für diese Methode über alle Analyten hinweg liegt bei ungefähr 19%. Dabei zeigte Andarin über beide untersuchten Konzentrationen in allen sechs NEM zusammen die höchste Wiederfindung mit im Mittel 29%. Da diese durchschnittliche Wiederfindungsrate für eine konklusive analytische Methode gering ist, sollte mit den unten angeführten Verbesserungsvorschlägen während des Probenaufarbeitungsprozesses in zukünftigen Experimenten ausgetestet werden, ob die Rate dadurch angehoben und möglicherweise weiter verbessert werden kann. Des weiteren wäre interessant herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt im Aufarbeitungsprozess die höchsten Verluste der Analyten verzeichnet werden. Dies könnte durch Probennahme nach jedem Schritt in der Aufarbeitung und anschließender Konzentrationsbestimmung bewerkstelligt werden. Jedoch muss der Umstand, dass ungefähr 80% des Analyten während der gesamten Probenvorbereitung verloren gehen bzw. Matrixeffekte zusätzlich hineinspielen können, bei der Interpretation der Ergebnisse immer im Hinterkopf behalten werden. Es wäre jedenfalls von Vorteil, wenn die Wiederfindungsrate erhöht werden könnte, um zuverlässigere Analysenergebnisse zu erhalten.

Die Matrixeffekte sind bedingt durch die einflussnehmenden Störfaktoren, welche aus den Komponenten des NEM selbst resultieren. Sie äußern sich durch Retentionszeitverschiebungen oder abweichende Signalintensitäten in den Ergebnissen. Zum besseren Verständnis wurden dafür Proben mit den Analyten in einer Matrix mit derselben Konzentration der Analyten in Proben ohne Matrix verglichen, aber dabei nicht auf den internen Standard bezogen, weil dieser ebenfalls Matrixeffekten unterliegt. Im Gesamten konnte im Durchschnitt ein Matrixeffekt von ungefähr 56% von allen zwölf Analyten zusammen in allen sechs NEM vereint verzeichnet werden. Dies stellt aber keineswegs eine genaue Quantifizierung dieser Störkomponenten dar, sondern soll lediglich aufzeigen, dass neben der teilweise schwankenden Präzision die Matrixeffekte ebenfalls für die Abweichungen unter den Ergebnissen verantwortlich sein können. Gleichsam wie der Verlust in der Probenaufarbeitung muss auch der Einfluss der

Matrixbestandteile für die Bewertung der Ausbeute von den NEM in der anschließenden Feldstudie mitberücksichtigt werden.

Die Feldstudie wurde mit Produkten aus der Apotheke, aus dem Probenlager von Seibersdorf Laboratories (Internet) und aus einem Sportnahrungsshop in Wien durchgeführt. Dabei konnten manche SARM-Verbindungen in den Produkten aus Seibersdorf Laboratories bereits im Vorfeld quantitativ nachgewiesen werden. Deswegen konnte die neue Methode dieser Arbeit mit diesen Produkten in einer Art Proof-of-Concept-Überprüfung ausgetestet werden, ob annähernd dieselben Ergebnisse wie in der Voranalyse mit der anderen Methode gemessen werden können. Es hat sich gezeigt, dass weder in den getesteten NEM-Produkten aus der Apotheke noch in den des Sportnahrungsshops im Analyseumfang befindliche SARM-Verbindungen detektiert wurden. Jedoch ist der im Rahmen dieser Arbeit geringe Stichprobenumfang der NEM zu berücksichtigen und gegebenenfalls zu vergrößern, um repräsentativere Aussagen machen zu können. Dennoch entsprechen Produkte aus dem Internet möglicherweise nicht diesem Qualitätsstandard und sollten deswegen mit Vorsicht genutzt werden. In den Produkten, welche aus dem internen Lager von Seibersdorf Laboratories stammen, welche aus dem Internet bezogen wurden, in welchen im Vorhinein bereits das Vorhandensein mancher SARM-Verbindungen bestätigt werden konnte, wurde das Vorkommen der entsprechenden und von anderen SARM-Substanzen ebenfalls bestätigt. Obwohl Abweichungen zwischen den Konzentrationen aus der Voruntersuchung und der semiquantitativ abgeschätzten Konzentrationen dieser Messung aufgrund der Berechnung mit der Kalibriergerade von NEM6, vorhanden sind, könnte die Methode durchaus auch zur semiquantitativen Abschätzung der Konzentration in der Praxis angewendet werden, indem eine Art Standard-Additionsverfahren durchgeführt wird.

Weitere Überlegungen zur zukünftigen Verbesserung der Methode könnten Modifizierungen in den einzelnen Probenaufarbeitungsschritten betreffen, um den Aufarbeitungsprozess und die Ausbeute noch effizienter zu gestalten. Beispielsweise könnte das gesamte Prozedere gegebenenfalls erneut mit einem anderen Puffersystem oder in einem anderen pH-Wert-Milieu ausgetestet werden. Ein Karbonat- oder Acetatpuffer würden dazu zur Verfügung stehen. Weiters könnte möglicherweise eine Änderung der verschiedenen Lösungsmittelkomponenten während der Probenvorbereitung zu höheren Ausbeuten beitragen. Das organische Desorptionsmittel im Zuge der Destillation, welches sich aus einer 1:1-Mischung Ethylacetat:Methanol in dieser Arbeit zusammensetzte, könnte dementsprechend auf reines Methanol oder eine Acetonitril:Methanol-Mischung verändert werden, um störende Bestandteile der NEM während des Zirkulierens bei der Destillation nicht vom XAD-4 zu lösen. Zusätzlich könnte das XAD-4 selbst auf ein anderes XAD, welches eine unterschiedliche Oberflächenmodifizierung aufweist, gewechselt werden, um eine noch spezifischere Extraktion der SARM zu bewerkstelligen [57]. Auch verschiedene Rekonstitutionsflüssigkeiten könnten zwecks Peakformverbesserung bei

der LC/MS in Erwägung gezogen werden. Die Einführung weiterer Waschschrirte bzw. Abtrennungsschrirte der ungewollten Substanzen während der Aufarbeitung könnte ebenfalls in Betracht gezogen werden, um etwaige Matrixeffekte zu minimieren.

Weiters könnte das Analysesystem der LC/MS und damit die Instrumentenmethode selbst adaptiert werden. Eine Umstellung der mobilen Phase auf beispielsweise Acetonitril oder ein anderer Elutionsgradient der beiden Phasen wäre zu überdenken, um das Verhalten der einzelnen SARM-Verbindungen zu untersuchen. Außerdem könnte das Experiment mit unterschiedlichen stationären Phasen wie beispielsweise einer Phenyl- oder einer Cyano-Säule ausgetestet werden.

Um gegebenenfalls bessere Analysenergebnisse zu erhalten, wäre der Einsatz von isotooenmarkierten SARM-Standardsubstanzen als interner Standard von Vorteil, da diese Substanzen sich exakt gleich wie die gesuchten Analyten verhalten würden. Dies war jedoch für diese Masterarbeit nicht möglich, da die Beschaffung zu kosten- und zeitintensiv gewesen wäre.

7 Conclusio

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Masterarbeit eine neue Multi-analytmethode entwickelt werden konnte, welche eine Extraktion der dopingrelevanten Substanzgruppe der SARM mittels XAD-4 in einer abgewandelten Festphasenextraktion mit einer dazu erstellten Messmethode für die LC/MS-Untersuchung von NEM auf das mögliche Vorhandensein dieser Substanzgruppe vereint. Damit kann den von der WADA akkreditierten Laboratorien ein weiteres Werkzeug in die Hand gelegt werden, um NEM in Hinblick auf diese Substanzgruppe zu untersuchen. So können bis in den unteren Nanogramm pro Gramm-Bereich mit SARM kontaminierte Produkte analysiert werden und gegebenenfalls eine positive Dopingprobe auf die Anwendung solcher Produkte zurückgeführt werden. Auch wenn die Validierungsergebnisse aufzeigen, dass störende Matrixeffekte, niedrige Wiederfindungsraten und teilweise noch unpräzise Messergebnisse in der Validierung der Methode zu berücksichtigen sind, konnte durch diese Masterarbeit durchaus ein erster Einblick gewonnen und Überlegungen zu Verbesserungen der Methode angestellt werden, sodass zukünftige Experimente noch effizienter gestaltet werden können. Jedoch konnte die Analysenmethode durch die anschließende Feldstudie und damit der Testung der auf das Vorkommen von SARM bereits positiv getesteter NEM-Produkte für die Praxisanwendung weiter verifiziert werden.

Zusammenfassende Erkenntnisse dieser Arbeit

- Validierte Multianalytmethode, die den Nachweis von SARM in NEM erlaubt
- Nachweis von SARM im Nanogramm pro Gramm Bereich und damit in einem für positive Dopingfälle relevanten Bereich möglich
- Korrelation eines positiven Dopingergebnisses mit kontaminiertem NEM mit entwickelter Methode möglich
- Vergleichstest mit bereits erfolgten Vortests zeigen Methodeneignung als Multimethode
- Produkte aus dem Internet stellen potentiell eine Gefahr für Sportler dar
- In lokal erhältlichen Produkten wurden keine Verunreinigungen innerhalb der im Analyseumfang befindlichen Substanzen nachgewiesen
- Weitere Optimierungen der Methode hinsichtlich Standardaddition, Variation der Extraktions- sowie Messparameter wird für zukünftige Arbeiten angeregt

8 Abkürzungen

NEM	Nahrungsergänzungsmittel
NEMV	Nahrungsergänzungsmittelverordnung
LMSVG	Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz
AGES	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
BASG	Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen
AAF	Adverse Analytical Finding
WADA	Welt-Anti-Doping-Agentur
SARM	Selektive-Androgen-Rezeptor-Modulatoren
LC	Flüssigchromatographie
MS	Massenspektrometrie
AR	Androgen Rezeptor
DHT	Dihydrotestosteron
WADC	Welt-Anti-Doping-Code
IOC	Internationale Olympische Komitee
NADA	Nationale-Anti-Doping-Agentur
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
FSH	Folikelstimulierendes Hormon
LH	Luteinisierendes Hormon
LBM	Lean Body Mass
SERM	Selektive-Östrogen-Rezeptor-Modulatoren
ER	Östrogenrezeptor
TUE	Therapeutic Use Exemption
ADAMS	Anti-Doping Administration & Management System
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
RT	Retentionszeit
NP-HPLC	Normalphasen HPLC
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC
GC	Gaschromatographie
EI	Elektronenstoßionisation
CI	chemische Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
TOF	Time-of-Flight
TIC	Totalionen-Chromatogramm

SIM	Selected-Ion-Monitoring
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
SRM	Selected-Reaction-Monitoring
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SPE	Festphasenextraktion
RSD	Relative Standardabweichung
LOD	Nachweisgrenze, Limit of Detection
LOQ	Bestimmungsgrenze, Limit of Quantification
S/N-Ratio	Signal/Rausch-Verhältnis
ISTD	Interner Standard
ME	Matrixeffekt
PCI	Nach-Säulen-Infusion
FWHM	Breite bei halber Höhe
CE	Kollisionsenergie

9 Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES HPLC-SYSTEMS	13
ABBILDUNG 2: STRUKTURELLER AUFBAU EINES KIESELGELS.....	15
ABBILDUNG 3: PROZESSSCHRITTE DER CHEMISCHEN MODIFIZIERUNG EINES SILICAGELS.....	15
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES MASSENSPEKTROMETERS	16
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER ELEKTROSPRAY-IONISATION	19
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE AUFBAU EINES QUADRUPOLS	20
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES TRIPLE-QUADRUPOLS.....	21
ABBILDUNG 8: SYNTHESE VON VERNETZTEN STYREN-DIVINYLBENZEN-POLYMEREN.....	22
ABBILDUNG 9: FLIEßSCHEMA ZUR PROBENAUFARBEITUNG	43
ABBILDUNG 10:MITTELWERTE DER WIEDERFINDUNGSRATEN (%) PRO SUBSTANZ IN ALLEN ZEHN NEM ZUSAMMEN	49
ABBILDUNG 11: MITTELWERTE DER WIEDERFINDUNGSRATEN (%) VON ELF SARM ZUSAMMEN PRO NEM + LW IN DREI VERSCHIEDENEN PUFFERN	51
ABBILDUNG 12:MITTELWERTE DER WIEDERFINDUNGSRATEN (%) VON ELF SARM ZUSAMMEN IN DREI NEM + LW VEREINT IN DREI VERSCHIEDENEN PUFFERN.....	52
ABBILDUNG 13: VIER CHROMATOGRAMME VON ZWEI SELEKTIVEN ÜBERGÄNGEN VON ANDARIN IN DER UNDOTIERTEN (BLANK) UND IN DER MIT DEM SARM-STANDARD DOTIERTEN PROBE EINES NEM	54
ABBILDUNG 14: ANZAHL DER SARM IN VERSCHIEDENEN BEREICHEN DER RSD (%) IN FÜNF VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN ZUSAMMEN	55
ABBILDUNG 15: MITTELWERTE DER NACHWEIS- UND BESTIMMUNGSGRENZEN (NG/G) ALLER ZWÖLF SARM ZUSAMMEN PRO NEM (MATRIX).....	57
ABBILDUNG 16: MITTELWERTE DER NACHWEIS- UND BESTIMMUNGSGRENZEN (NG/G) PRO SUBSTANZ IN SECHS NEM ZUSAMMEN	57
ABBILDUNG 17: KALIBRIERGERADE VON OSTARIN IN NEM 1 (1).....	59
ABBILDUNG 18: KALIBRIERGERADE VON OSTARIN IN NEM 1 (2).....	59
ABBILDUNG 19: MITTELWERTE DER BESTIMMTHEITSMASSE R2 ALLER ZWÖLF SARM ZUSAMMEN PRO NEM ...	60
ABBILDUNG 20: MITTELWERTE DER WIEDERFINDUNGSRATEN (%) ALLER ZWÖLF SARM PRO NEM + LW BEI ZWEI KONZENTRATIONEN	62
ABBILDUNG 21: MITTELWERTE DER WIEDERFINDUNGSRATEN (%) ALLER ZWÖLF SARM IN SECHS NEM + LW ZUSAMMEN VON ZWEI KONZENTRATIONEN.....	63
ABBILDUNG 22: MITTELWERTE DER MATRIXEFFEKTE (%) ALLER ZWÖLF SARM UND IN ZWEI KONZENTRATIONEN ZUSAMMEN PRO NEM (MATRIX).....	65
ABBILDUNG 23: MITTELWERTE DER MATRIXEFFEKTE (%) PRO SUBSTANZ IN SECHS NEM (MATRICES) UND IN ZWEI KONZENTRATIONEN ZUSAMMEN	66
TABELLE 1:NAMEN, SYNONYME, STRUKTURFORMEL UND IUPAC NAME VON NICHT STEROIDALEN UND STEROIDALEN SARM.....	4
TABELLE 2:STATISTIK DER FÄLLE AUS DEM WADA-BERICHT IM LAUFE DER JAHRE [30].	12
TABELLE 3: VERWENDETE SUBSTANZEN UND REAGENZIEN.....	31
TABELLE 4: VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN	32
TABELLE 5: ZUSAMMENSETZUNG DES INTERNEN STANDARDS	35
TABELLE 6: ZUSAMMENSETZUNG DES SARM-STANDARDS	36
TABELLE 7: PRODUKTAUSWAHL FÜR DIE VALIDIERUNG	37
TABELLE 8: PRODUKTAUSWAHL FÜR DIE FELDSTUDIE.....	38
TABELLE 9: PARAMETER DER ANGEWANDTEN HPLC-METHODE	40
TABELLE 10: PARAMETER DER ANGEWANDTEN MS-METHODE	41
TABELLE 11: RETENTIONSZEIT, POLARITÄT, KOLLISIONSENERGIE DES INTERNEN UND SARM-STANDARDS	41
TABELLE 12:DURCHSCHNITTliche RSD ALLER SARM ÜBER FÜNF VERSCHIEDENE KONZENTRATIONEN ZUSAMMEN	56
TABELLE 13: VERSCHLEPPUNGSRATE (%) IN BEZUG AUF DIE POSITIVE PROBE.....	61
TABELLE 14: ERGEBNISSE DER FELDSTUDIE (ALLE PRODUKTE).....	67
FORMEL 1: BERECHNUNG DER RELATIVEN STANDARDABWEICHUNG (RSD)	23
FORMEL 2: LINEARE KALIBRIERFUNKTION	24
FORMEL 3: BERECHNUNG DER WIEDERFINDUNGSRATE.....	26

10 Literaturverzeichnis

- [1] Garthe I, Maughan RJ. Athletes and Supplements: Prevalence and Perspectives. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2018 Mar 1;28(2):126-138.
- [2] Bundesgesetz über Sicherheitsanforderungen und weitere Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchsgegenstände und kosmetische Mittel zum Schutz der Verbraucherinnen und Verbraucher (Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz – LMSVG); online verfügbar unter https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/Lebensmittel/rechtsvorschriften/oesterreich/LMSVG_Fassung_vom_19_10_2023.pdf?9gg6z6 (Stand: 07.03.2024)
- [3] Richtlinie 2002/46/EG vom 10. Juni 2002 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Nahrungsergänzungsmittel (ABl. Nr. L 183 vom 12. Juli 2002); online verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:183:0051:0057:DE:PDF> (Stand 07.03.2024)
- [4] Wierzejska RE. Dietary Supplements-For Whom? The Current State of Knowledge about the Health Effects of Selected Supplement Use. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Aug 24;18(17):8897.
- [5] Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES); Nahrungsergänzungsmittel; online verfügbar unter <https://www.ages.at/mensch/ernaehrung-lebensmittel/lebensmittelinformationen/nahrungsergaenzungsmittel> (Stand 07.03.2024)
- [6] WADA (2024). World Anti-Doping Code International Standard Prohibited List 2024. Online verfügbar unter [2024list_en_final_22_september_2023.pdf](https://www.wada-ama.org/en/resources/prohibited-list/2024) (wada-ama.org) (Stand 11.03.2024)
- [7] Thevis M, Schänzer W. Detection of SARMS in doping control analysis. *Mol Cell Endocrinol.* 2018 Mar 15;464:34-45.
- [8] Maughan, R.J., Shirreffs, S.M., & Vernec, A. (2018b). Making decisions about supplement use. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 28(2), 212–219.
- [9] Geyer H, Parr MK, Koehler K, Mareck U, Schänzer W, Thevis M. Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *J Mass Spectrom.* 2008 Jul;43(7):892-902.
- [10] Kozhuharov VR, Ivanov K, Ivanova S. Dietary Supplements as Source of Unintentional Doping. *Biomed Res Int.* 2022 Apr 22;2022:8387271.
- [11] HEIMSPIELE GmbH & Co. KG (2024). Kölner Liste. Online verfügbar unter <https://www.koelnerliste.com/> (Stand 12.03.2024).
- [12] Thevis M, Volmer DA. Mass spectrometric studies on selective androgen receptor modulators (SARMS) using electron ionization and electrospray ionization/collision-induced dissociation. *Eur J Mass Spectrom (Chichester).* 2018 Feb;24(1):145-156.

- [13] Solomon ZJ, Mirabal JR, Mazur DJ, Kohn TP, Lipshultz LI, Pastuszak AW. Selective Androgen Receptor Modulators: Current Knowledge and Clinical Applications. *Sex Med Rev*. 2019 Jan;7(1):84-94.
- [14] Narayanan R, Coss CC, Dalton JT. Development of selective androgen receptor modulators (SARMs). *Mol Cell Endocrinol*. 2018 Apr 15;465:134-142.
- [15] Bhasin S, Jasuja R. Selective androgen receptor modulators as function promoting therapies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009 May;12(3):232-40.
- [16] Dachverband Osteologie, S3-Leitlinie 183-001 Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern ab dem 50. Lebensjahr. Version 2.1, 06.09.2023, online verfügbar unter <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/183-001> (Stand 21.03.2024)
- [17] Yatsu T, Kusakabe T, Kato K, Inouye Y, Nemoto K, Kanno Y. Selective Androgen Receptor Modulator, YK11, Up-Regulates Osteoblastic Proliferation and Differentiation in MC3T3-E1 Cells. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(3):394-398.
- [18] Gao W, Kearbey JD, Nair VA, Chung K, Parlow AF, Miller DD, Dalton JT. Comparison of the pharmacological effects of a novel selective androgen receptor modulator, the 5alpha-reductase inhibitor finasteride, and the antiandrogen hydroxyflutamide in intact rats: new approach for benign prostate hyperplasia. *Endocrinology*. 2004 Dec;145(12):5420-8.
- [19] Shankaran M, Shearer TW, Stimpson SA, Turner SM, King C, Wong PY, Shen Y, Turnbull PS, Kramer F, Clifton L, Russell A, Hellerstein MK, Evans WJ. Proteome-wide muscle protein fractional synthesis rates predict muscle mass gain in response to a selective androgen receptor modulator in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016 Mar 15;310(6):E405-17.
- [20] Crawford J, Prado CM, Johnston MA, Gralla RJ, Taylor RP, Hancock ML, Dalton JT. Study Design and Rationale for the Phase 3 Clinical Development Program of Enobosarm, a Selective Androgen Receptor Modulator, for the Prevention and Treatment of Muscle Wasting in Cancer Patients (POWER Trials). *Curr Oncol Rep*. 2016 Jun;18(6):37.
- [21] Dalton JT. The long and winding road for selective androgen receptor modulators. *Br J Clin Pharmacol*. 2017 Oct;83(10):2131-2133.
- [22] Coss CC, Jones A, Dalton JT. Selective androgen receptor modulators as improved androgen therapy for advanced breast cancer. *Steroids*. 2014 Nov;90:94-100.
- [23] Yuan Y, Lee JS, Yost SE, Frankel PH, Ruel C, Egelston CA, Guo W, Gillece JD, Folkerts M, Reining L, Highlander SK, Robinson K, Padam S, Martinez N, Tang A, Schmolze D, Waisman J, Sedrak M, Lee PP, Mortimer J. A Phase II Clinical Trial of Pembrolizumab and Enobosarm in Patients with Androgen Receptor-Positive Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist*. 2021 Feb;26(2):99-e217.
- [24] WADA (2024) Who we are| World Anti Doping Agency; online verfügbar unter <https://wada-ama.org/en/who-we-are> (Stand 19.03.2024)

- [25] WADA (2021) Word-Anti-Doping-Code (WADC); online verfügbar unter https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_wada_code.pdf (Stand 20.03.2024)
- [26] Thevis M, Geyer H, Kamber M, Schänzer W. Detection of the arylpropionamide-derived selective androgen receptor modulator (SARM) S-4 (Andarine) in a black-market product. *Drug Test Anal.* 2009 Aug;1(8):387-92.
- [27] Hahamyian HA, Vasireddi N, Voos JE, Calcei JG. Social media's impact on widespread SARMS abuse. *Phys Sportsmed.* 2023 Aug;51(4):291-293.
- [28] Leaney AE, Beck P, Biddle S, Brown P, Grace PB, Hudson SC, Mawson DH. Analysis of supplements available to UK consumers purporting to contain selective androgen receptor modulators. *Drug Test Anal.* 2021 Jan;13(1):122-127.
- [29] Piper T, Dib J, Putz M, Fusshöller G, Pop V, Lagojda A, Kuehne D, Geyer H, Schänzer W, Thevis M. Studies on the in vivo metabolism of the SARM YK11: Identification and characterization of metabolites potentially useful for doping controls. *Drug Test Anal.* 2018 Nov;10(11-12):1646-1656.
- [30] WADA (2023) Anti-Doping-Testing-Figures; online verfügbar unter https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2024-02/2021_anti-doping_testing_figures_en_v2.pdf (Stand 28.03.2024)
- [31] Matissek, R., Fischer, M., Steiner, G. (2018). *Lebensmittelanalytik*, 6. Auflage. Springer Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- [32] Bird IM. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ.* 1989 Sep 23;299(6702):783-7.
- [33] Watson, D.G. (2016). *Pharmaceutical Analysis, A Textbook for Pharmacy Students and pharmaceutical Chemists*, 4 Auflage, Elsevier Health Care Lehrbücher. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto.
- [34] R. Kazakevich, Yuri; LoBrutto, HPLC For Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007, pp. 100
- [35] Reversed-Phase Chromatographie - MZ-Analysentechnik GmbH (mz-at.de); online verfügbar unter <https://mz-at.de//chromatographie/fluessigchromatographie/trenntechniken/reversed-phase-chromatorgraphie/> (Stand 03.04.2024)
- [36] Massenspektrometer z.B. Magnetsektorfeld-Massenspektrometer (dgms.eu); online verfügbar unter <https://dgms.eu/de/ueber-uns-dgms/das-ist-massenspektrometrie/massenspektrometer/> (Stand 04.04.2024)
- [37] Gey, M. H. (2015). *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, 3. Auflage, Springer Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.

- [38] Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem.* 2012;2012:282574.
- [39] Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 2009;30(1):19-34.
- [40] Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 2008;4:222.
- [41] Faktor J, Dvorakova M, Maryas J, Struharova I, Bouchal P. Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies. *Klin Onkol.* 2012;25 Suppl 2:2S70-2S77.
- [42] Kromidas S. (1999). *Validierung in der Analytik*, 1. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto.
- [43] National Association of Testing Authorities [NATA]. (2012) Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. Online verfügbar unter <https://www.demarcheiso17025.com/document/Guidelines%20for%20the%20validation%20and%20verification%20of%20quantitative%20and%20qualitative%20test%20methods.pdf> (Stand 15.04.2024)
- [44] Zeng W, Musson DG, Fisher AL, Wang AQ. A new approach for evaluating carryover and its influence on quantitation in high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry assay. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006;20(4):635-640.
- [45] Fang N, Yu S, Ronis MJ, Badger TM. Matrix effects break the LC behavior rule for analytes in LC-MS/MS analysis of biological samples. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015;240(4):488-497.
- [46] McNaught, Alan D. *Compendium of chemical terminology*. Vol. 1669. Oxford: Blackwell Science, 1997.
- [47] Cortese M, Gigliobianco MR, Magnoni F, Censi R, Di Martino PD. Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. *Molecules.* 2020;25(13):3047.
- [48] Oldekop ML, Herodes K, Rebane R. Study of the matrix effects and sample dilution influence on the LC-ESI-MS/MS analysis using four derivatization reagents. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2014;967:147-155.
- [49] Kintz P. The forensic response after an adverse analytical finding (doping) involving a selective androgen receptor modulator (SARM) in human athlete. *J Pharm Biomed Anal.* 2022;207:114433.
- [50] Torres S, Cerutti S, Raba J, Pacheco P, Silva MF. Preconcentration of seleno-amino acids on a XAD resin and determination in regional olive oils by SPE UPLC-ESI-MS/MS. *Food Chem.* 2014;159:407-413.

- [51] Ahmad A, Siddique JA, Laskar MA, et al. New generation Amberlite XAD resin for the removal of metal ions: A review. *J Environ Sci (China)*. 2015;31:104-123.
- [52] Thermo Fisher Scientific. Use of Accelerated Solvent Extraction for Cleaning and Elution of XAD Resin. Online verfügbar unter <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-347-Cleaning-Elution-XAD-Resin-AN70641-E.pdf> (Stand 24.04.2024)
- [53] Parr MK, Schmidtsdorff S, Kollmeier AS. Nahrungsergänzungsmittel im Sport – Sinn, Unsinn oder Gefahr? [Nutritional supplements in sports - sense, nonsense or hazard?]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2017;60(3):314-322.
- [54] Lee JH, Han JH, Jung EJ, Nallapaneni HK, Kim NS, Kim H, Lee J, Baek SY. Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for screening six selective androgen receptor modulators in dietary supplements. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2021 Jul;38(7):1075-1086.
- [55] Ahmad A, Siddique JA, Laskar MA, et al. New generation Amberlite XAD resin for the removal of metal ions: A review. *J Environ Sci (China)*. 2015;31:104-123.
- [56] Paik M. J, Park J. E, Koo W. H, Chung G. H, Kim J. H, Kim K. R. Modification of Soxhlet Extractor for Rapid and Effective Recovery of Phenolic Pollutants Adsorbed on XAD-4 Resin. *Chromatographia*; 2004; 60, 693–698.
- [57] Dupont water solutions (2020) DuPont™ AmberLite™ XAD™ resins. Online verfügbar unter <https://www.dupont.com/content/dam/dupont/amer/us/en/water-solutions/public/documents/en/IER-AmberLite-XAD-Resins-PI-45-D00733-en.pdf> (Stand 18.06.2024)

11 Anhang

Anhang 1: Prozeduranleitung zur Probenaufarbeitung

Nachweis von SARM in NEM-Proben mittels massenspektrometrischer Methoden

Version 1

Ersteller Sebastian Duda Sebastian

SOP (Angepasst von SOP / DOP / ORG / 008 - FB02)

Prozedurschema Probenaufarbeitung:

- 1) Einwaage: 0.2g des NEM in Falcon (50ml)
- 2) Phosphatpuffer (0.8M, pH=7,4) auf 50ml auffüllen
- 3) 3 Malkugeln hinzufügen
- 4) Homogenisieren (Programm 7, 3 Min, Frequenz = 22Hz)
- 5) QC: Spike (SARM Standard 1µL, 5µL, 10µL, 25µL, 50µL)
- 6) 3mL Puffer vorlegen (transparente Schraubgefäße)
- 7) 50µL Interner Standard zu 3ml hinzufügen
- 8) 20mL Probe hinzufügen
- 9) XAD-Suspension (ca. 1mL) in Netze
- 10) Netze rein, umdrehen, über Nacht bei RT schütteln (70/min)
- 11) Waschschrift: Netze mit MQ-Wasser waschen
- 12) Netze in braune Gefäße überführen
- 13) Zentrifugieren (3000rpm/ 5min)
- 14) 3mL Ethylacetat:Methanol in transparente Schraubgefäße
- 15) Netze hineingeben
- 16) Schraubgefäße mit Soxhlet Extraktion über Sandbad (2h, Stufe 4)
- 17) Netze herausnehmen
- 18) Destillat (organische Phase) mit 3mL Spritze über Membranfilter (0.2µm) filtrieren
- 19) Vaporisierung über Speedvac (50°C, 2-3h)
- 20) Aufnehmen in 500 µL MQ:Methanol (9:1)
- 21) Injektion in LC- MS/MS

Anhang 2: Fotos zu den ausgewählten Produkten der Methodenvalidierung



Foto 1: NE1 Validierung
Seibersdorf



Foto 2: NE2 Validierung
Seibersdorf



Foto 3: NE3 Validierung
Seibersdorf



Foto 4: NE4 Validierung
Seibersdorf



Foto 5: NE5 Validierung
Seibersdorf



Foto 6: NE6 Validierung
Seibersdorf

Anhang 3: Fotos zu den ausgewählten Produkten der Feldstudie

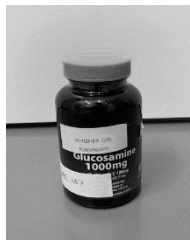


Foto 7: NE7 Validierung
Seibersdorf



Foto 8: NE8 Validierung
Seibersdorf



Foto 9: NE9 Validierung
Seibersdorf



Foto 10: NE12 Validierung Sei-
bersdorf



Foto 11: NE13 Validierung Sei-
bersdorf



Foto 12: NE14 Validierung Sei-
bersdorf



Foto 13: NE15 Validierung
Sportnahrungsshop



Foto 14: NE16 Validierung
Sportnahrungsshop



Foto 15: NE17 Validierung
Sportnahrungsshop



Foto 16: NE18 Validierung
Sportnahrungsshop



Foto 17: NE19 Validierung
Sportnahrungsshop



Foto 18: NE20 Validierung
Sportnahrungsshop



Foto 19: NE21 Validierung
Sportnahrungsshop



Foto 20: NE22 Validierung
Sportnahrungsshop



Foto 21: NE23 Validierung
Apotheke



Foto 22: NE24 Validierung
Apotheke



Foto 23: NE25 Validierung
Apotheke



Foto 24: NE26 Validierung
Apotheke



Foto 25: NE27 Validierung
Apotheke



Foto 26: NE28 Validierung
Apotheke



Foto 27: NE29 Validierung
Apotheke

Anhang 4: Daten und Berechnungen zu 5.1.1 Initiale Methodentests

Substanz	MW Area SARM-Std (QC)	MW Area Dot (10 NEM)	Mittelwerte der Wiederfindungsrate $\pm$ (STW)	Interner Standard
GSK2881078_311	8183950,05	90538,59	2,77% $\pm$ 1%	TestosteroneD3
GSK2881078_190	11179928,54	118899,91	2,66% $\pm$ 1%	TestosteroneD3
Andarine_150	79276936,09	1097636,17	3,46% $\pm$ 1%	Probenecide
Andarine_261	71625641,77	971861,95	3,39% $\pm$ 1%	Probenecide
RAD140_170	6955382,03	32922,80	1,18% $\pm$ 0,2%	TestosteroneD3
RAD140_223	14420334,33	60086,11	1,04% $\pm$ 0,3%	TestosteroneD3
Ostarine_117	171950025,47	7063220,69	10,27% $\pm$ 5%	Probenecide
Ostarine_185	26512031,53	1082727,50	10,21% $\pm$ 5%	Probenecide
LGD_4033_220	30793434,23	376666,70	3,06% $\pm$ 1%	TestosteroneD3
LGD_4033_239	14475749,29	169951,44	2,94% $\pm$ 1%	TestosteroneD3
SARM_AC-262536_169	65459166,18	800721,04	3,06% $\pm$ 1%	TestosteroneD3
SARM_AC-262536_195	79692535,27	983636,19	3,09% $\pm$ 1%	TestosteroneD3
S1_SARM_204	125502014,90	4793570,08	9,55% $\pm$ 5%	Probenecide
S1_SARM_260	239805611,07	9246889,54	9,64% $\pm$ 5%	Probenecide
ACP-105_167	11593494,21	124330,74	2,68% $\pm$ 1%	TestosteroneD3
ACP-105_193	16180321,93	192628,19	2,98% $\pm$ 1%	TestosteroneD3
LGD3303_289	18274014,59	477230,94	6,53% $\pm$ 2%	TestosteroneD3
LGD3303_245	17009121,08	444443,99	6,53% $\pm$ 2%	TestosteroneD3
S-23_269	30054387,96	1400182,37	11,65% $\pm$ 6%	Probenecide
S-23_144	166411037,06	7743120,88	11,63% $\pm$ 6%	Probenecide
S9_SARM_126	51652923,42	2332966,01	11,29% $\pm$ 7%	Probenecide
S9_SARM_260	72562590,09	3285152,44	11,32% $\pm$ 7%	Probenecide
YK_-11_(-CH3OH)_357	9070474,61	17729,58	0,49% $\pm$ 0,2%	TestosteroneD3
YK_-11_(-CH3OH)_325	14699557,89	38898,67	0,66% $\pm$ 0,3%	TestosteroneD3

Anhang 5: Daten und Berechnungen zu 5.1.2 Puffer-pH-Wert Optimierung

Substanz	Wf LW bas	Wf LW neu	Wf LW sau	Wf NE1 bas	Wf NE1 neu	Wf NE1 sau	Wf NE3 bas	Wf NE3 neu	Wf NE3 sau	Wf NE5 bas	Wf NE5 neu	Wf NE5 sau
GSK2881078_311	19%	15%	10%	10%	14%	5%	8%	11%	7%	5%	14%	19%
Andarine_150	6%	8%	3%	4%	8%	2%	4%	7%	2%	1%	11%	6%
RAD140_223	9%	11%	3%	2%	4%	1%	1%	1%	1%	1%	11%	6%
Ostarine_117	20%	23%	8%	18%	20%	4%	22%	20%	5%	2%	26%	20%
LGD_4033_220	15%	19%	5%	11%	13%	5%	7%	8%	6%	2%	19%	9%
SARM_AC-262536_195	22%	21%	10%	16%	18%	6%	11%	17%	9%	3%	22%	18%
S1_SARM_260	27%	31%	7%	34%	26%	9%	23%	41%	9%	1%	32%	20%
ACP-105_193	18%	20%	8%	6%	13%	4%	3%	5%	4%	2%	21%	16%
LGD3303_289	33%	36%	14%	70%	41%	14%	52%	84%	23%	4%	41%	17%
S-23_144	30%	30%	6%	36%	32%	11%	27%	43%	9%	1%	32%	26%
S9_SARM_260	34%	32%	6%	46%	33%	11%	31%	53%	11%	0%	35%	20%
Mittelwerte pro NEM/ LW	21% $\pm$ 9%	22% $\pm$ 9%	7% $\pm$ 3%	23% $\pm$ 21%	20% $\pm$ 12%	7% $\pm$ 4%	17% $\pm$ 15%	27% $\pm$ 26%	8% $\pm$ 6%	2% $\pm$ 1%	24% $\pm$ 10%	16% $\pm$ 6%

	Basisch	Neutral	Sauer
Mittelwert pro NEM/ LW zusammen $\pm$ STW	16% $\pm$ 10%	23% $\pm$ 8%	9% $\pm$ 2%

Anhang 6: Daten und Berechnungen zu 5.2.2 Präzision

	1uL		5uL		10uL		25uL		50uL	
Substanz	Mittelwert (Ratio SARM/ ISTD)	RSD	Mittelwert (Ratio SARM/ ISTD)	RSD	Mittelwert (Ratio SARM/ ISTD)	RSD	Mittelwert (Ratio SARM/ ISTD)	RSD	Mittelwert (Ratio SARM/ ISTD)	RSD
GSK2881078_190	0,0003	1%	0,0014	1%	0,0034	1%	0,0079	1%	0,0157	1%
Andarine_150	0,0035	4%	0,0144	3%	0,0286	7%	0,0593	2%	0,0967	2%
RAD140_223	0,0005	2%	0,0026	1%	0,0060	1%	0,0140	1%	0,0274	1%
Ostarine_185	0,0012	4%	0,0057	2%	0,0117	6%	0,0230	2%	0,0355	2%
LGD_4033_220	0,0010	2%	0,0055	1%	0,0132	1%	0,0301	1%	0,0596	1%
SARM_AC-262536_169	0,0018	2%	0,0094	1%	0,0210	1%	0,0464	0%	0,0886	1%
S1_SARM_260	0,0126	4%	0,0511	3%	0,1145	12%	0,2498	2%	0,4013	2%
ACP-105_193	0,0004	2%	0,0023	1%	0,0054	1%	0,0125	1%	0,0245	1%
LGD3303_245	0,0008	3%	0,0043	2%	0,0107	1%	0,0245	1%	0,0469	1%
S-23_144	0,0087	4%	0,0375	2%	0,0957	13%	0,2117	2%	0,3347	2%
S9_SARM_260	0,0043	5%	0,0186	3%	0,0475	14%	0,1077	2%	0,1729	2%
YK_-11_(-CH3OH)_325	0,0023	34%	0,0112	39%	0,0205	40%	0,0718	34%	0,1680	19%

Anhang 7: Daten und Berechnungen zu 5.2.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

	NE1		NE2		NE3		NE4		NE5		NE6	
Substanz	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
ACP-105_193	10	34	28	94	31	104	17	58	9,1	31	12	41
Andarin_261	17	54	5,8	20	9,8	33	22	72	15	51	19	62
GSK2881078_190	7,1	25	5,2	18	5,7	20	5,0	18	6,5	22	8,6	29
LGD_4033_220	8,0	27	5,9	20	11	35	11	38	13	42	26	91
LGD3303_289	4,1	15	12,6	52	9,4	32	16	52	8,0	27	29	100
Ostarine_117	7,3	25	8,4	28	12	40	19	62	14	46	17	55
RAD140_223	8,9	30	5,5	19	8,9	30	11	37	14	46	55	276
S1_SARM_260	9,7	33	17	55	9,0	30	20	24	19	62	6,6	20
S9_SARM_260	8,4	29	28	99	6,2	22	29	101	24	79	59	307
S-23_144	8,4	29	26	88	6,9	24	26	88	20	67	51	234
SARM_AC-262536_169	5,6	19	9,9	33	9,5	32	9,3	32	9,9	33	11	36
YK_-11_(-CH3OH)_325	8,6	29	22	75	6,1	21	13	42	31	112	11	35
Mittelwert pro NEM	8,6±3,0	29±10	15±9,0	50±31	10±4,0	35±23	16±7,0	52±25	15±7,0	52±25	25±19	107±103

Anhang 8: Daten und Berechnungen zu 5.2.4 Linearität

	NE1	NE2	NE3	NE4	NE5	NE6
Substanz	R²	R²	R²	R²	R²	R²
ACP-105_193	0,982	0,95	0,94	0,986	0,987	0,967
Andarin_261	0,944	0,998	0,989	0,914	0,947	0,933
GSK2881078_190	0,990	0,995	0,995	0,995	0,992	0,987
LGD_4033_220	0,991	0,996	0,993	0,981	0,964	0,878
LGD3303_289	0,997	0,987	0,995	0,976	0,989	0,849
Ostarine_117	0,995	0,998	0,985	0,949	0,96	0,952
RAD140_223	0,982	0,999	0,997	0,987	0,958	0,614
S1_SARM_260	0,990	0,996	0,99	0,991	0,948	0,974
S9_SARM_260	0,991	0,993	0,999	0,996	0,959	0,761
S-23_144	0,992	0,992	1	0,995	0,956	0,788
SARM_AC-262536_169	0,994	1	0,991	0,987	0,98	0,976
YK_-11 (-CH3OH)_325	0,984	0,98	1	0,983	0,933	0,98
Mittelwert pro NEM	0,986±0,014	0,990±0,014	0,990±0,016-	0,978±0,024	0,964±0,019	0,888±0,116

	NE1	NE2	NE3	NE4	NE5	NE6
Substanz	Kalibrier- gerade (y)	Kalibrier-ge- rade (y)	Kalibrier- gerade (y)	Kalibrier- gerade (y)	Kalibrier- gerade (y)	Kalibrier- gerade (y)
ACP-105_193	0,00002636x - 0,00027151	0,00002607x- 0,00060574	0,00002117x - 0,00007124	0,00002940x - 0,00039669	0,00002254 x- 0,00017779	0,00001425x+ 0,00006194
Andarin_261	0,00007413x + 0,00058396	0,00004306x+ 0,00034271	0,00007771x - 0,00056733	0,00006565x + 0,00039749	0,00007015 x+ 0,00006467	0,00002437x+ 0,00079988
GSK2881078_190	0,00000673x - 0,00002783	0,00003548x - 0,00012693	0,00001514x + 0,00006825	0,00001430x - 0,00000335	0,00001211 x - 0,00002904	0,00000996x + 0,00008819
LGD_4033_220	0,00005955x - 0,00007371	0,00004791x + 0,00013894	0,00009346x - 0,00053884	0,00008123x + 0,00009763	0,00006389 x - 0,00005684	0,00003274x + 0,00102243
LGD3303_289	0,00006086x - 0,00016243	0,00007716x - 0,00050806	0,00003681x + 0,00031572	0,00004479x - 0,00033994	0,00001891 x - 0,00003352	0,00001243x + 0,00037708
Ostarine_117	0,00040065x - 0,00031137	0,00025453x + 0,00084780	0,00040811x - 0,00324078	0,00037721x + 0,00147187	0,00041979 x - 0,00134669	0,00016383x + 0,00400944
RAD140_223	0,00001089x - 0,00000526	0,00001350x + 0,00010264	0,00002289x - 0,00006733	0,00002453x + 0,00003933	0,00002246 x - 0,00004670	0,00000644x + 0,00042424
S1_SARM_260	0,00053213x + 0,00008688	0,00037085x + 0,00107162	0,00040606x - 0,00254261	0,00050317x - 0,00113549	0,00041658 x - 0,00226601	0,00028208x + 0,00282218
S9_SARM_260	0,00015072x - 0,00031110	0,00015973x + 0,00005200	0,00008233x + 0,00018617	0,00014727x - 0,00066938	0,00007413 x - 0,00038348	0,00002714x + 0,00175773
S-23_144	0,00036007x - 0,00076925	0,00040401x - 0,00036729	0,00025399x + 0,00000309	0,00036263x - 0,00171751	0,00019674 x - 0,00131369	0,00007781x + 0,00416525
SARM_AC-262536_169	0,00010298x + 0,00000140	0,00004927x + 0,00052557	0,00010926x - 0,00063374	0,00009515x + 0,00009499	0,00009700 x - 0,00024908	0,00005270x + 0,00085847
YK_-11 (-CH3OH)_325	0,00008581x - 0,00051057	0,00008579x - 0,00067741	0,00006301x + 0,00022623	0,00007307x - 0,00055923	0,00002674 x - 0,00005797	0,00003871x + 0,00049280

Anhang 9: Daten und Berechnungen zu 5.2.6 Wiederfindungsrate

	LW		NE1		NE2		NE3		NE4		NE5		NE6	
Substanz	25uL	50uL	25uL	50uL	25uL	50uL	25uL	50uL	25uL	50uL	25uL	50uL	25uL	50uL
GSK2881078_311	26%	22%	20%	23%	16%	22%	23%	15%	16%	19%	14%	15%	18%	14%
Andarine_261	70%	29%	34%	61%	25%	20%	21%	23%	16%	26%	17%	16%	31%	20%
RAD140_170	35%	18%	18%	22%	20%	19%	18%	14%	12%	16%	10%	10%	17%	11%
Ostarine_117	52%	31%	24%	36%	26%	25%	23%	25%	16%	29%	17%	20%	22%	21%
LGD_4033_220	33%	20%	18%	22%	20%	23%	19%	16%	11%	19%	12%	14%	16%	15%
SARM_AC-262536_195	27%	18%	17%	21%	19%	18%	16%	13%	9%	16%	10%	10%	15%	12%
S1_SARM_204	35%	23%	18%	30%	22%	25%	26%	27%	10%	23%	13%	24%	15%	15%
ACP-105_193	31%	16%	15%	18%	23%	20%	14%	10%	9%	14%	10%	11%	12%	12%
LGD3303_289	12%	8%	9%	14%	10%	22%	13%	5%	5%	8%	4%	8%	7%	5%
S-23_144	26%	16%	14%	25%	35%	41%	24%	13%	8%	14%	12%	32%	10%	13%
S9_SARM_260	22%	13%	13%	24%	27%	38%	24%	10%	7%	12%	10%	31%	9%	11%
YK_-11_(-CH3OH)_325	14%	16%	10%	15%	12%	16%	17%	6%	5%	10%	7%	10%	9%	7%
Mittelwert pro NEM	32±1 6%	19± 6%	18± 7%	26±1 2%	21± 7%	24± 8%	20± 5%	15± 7%	10± 4%	17± 6%	11± 4%	17± 8%	15± 7%	13± 4%

Anhang 10: Daten und Berechnungen zu 5.2.7 Matrixeffekte

Substanz (AREA)	Durchschnittlicher Matrixeffekt / NE1	Durchschnittlicher Matrixeffekt / NE2	Durchschnittlicher Matrixeffekt / NE3	Durchschnittlicher Matrixeffekt / NE4	Durchschnittlicher Matrixeffekt / NE5	Durchschnittlicher Matrixeffekt / NE6
GSK2881078_311	-80%	-39%	-35%	-37%	-31%	-40%
Andarine_150	-54%	-85%	-74%	-53%	-38%	-55%
RAD140_170	-81%	-73%	-59%	-51%	-44%	-49%
Ostarine_117	-22%	-62%	-41%	-29%	-19%	-23%
LGD_4033_220	-60%	-58%	-42%	-37%	-28%	-31%
SARM_AC-262536_169	-38%	-56%	-41%	-36%	-31%	-33%
S1_SARM_204	-30%	-60%	-55%	-41%	-33%	-25%
ACP-105_167	-46%	-51%	-43%	-36%	-29%	-32%
LGD3303_245	10%	-9%	-11%	-22%	-22%	-16%
S-23_144	-36%	-43%	-51%	-42%	-39%	-20%
S9_SARM_126	-42%	-45%	-59%	-45%	-43%	-22%
YK_-11_(-CH3OH)_325	-77%	-71%	-76%	-86%	-78%	-60%

Anhang 11a: Daten und Berechnungen zu 5.3 Ergebnisse der Feldstudie (Tabelle geteilt)

SARM	GSK2881078 311	Andarine 150	RAD140 223	Ostarine 185	LGD_4033 220	SARM_AC-262536 169
	Seibersdorf/ Berechnet	Seibersdorf/ Berechnet	Seibersdorf/ Berechnet	Seibersdorf/ Berechnet	Seibersdorf/ Berechnet	Seibersdorf/ Berechnet
NEM7	0/0	0/47,97	0/0	5/-9,4	0/8,75	0/0
NEM8	0/0	0/195,75	0/0	0/-25,2	700/2670	0/0
NEM9	0/0	0/-1,55	0/0	0/-24,98	700/1893	0/0
NEM12	0/0	0/0	0/0	0/0	0/33,6	0/0
NEM13	0/0	0/0	0/0	0/0	0/39,7	0/0
NEM14	0/0	0/0	0/0	0/0	0/78,2	0/0
NEM15	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM16	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM17	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM18	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM19	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM20	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM21	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM22	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM23	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM25	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM26	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM27	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM28	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM29	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Anhang 11b

SARM	S1_SARM 260	ACP-105 193	LGD3303 289	S-23_144	S9_SARM_260	YK_-11_(-CH3OH)_325
	Seibersdorf/ Berechnet	Seibersdorf/ Berechnet	Seibersdorf/ Berechnet	Seibersdorf/ Berechnet	Seibersdorf/ Berechnet	Seibersdorf/Berechnet
NEM7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM8	0/0	0/0	0/0	0/7,6	0/0	0/0
NEM9	0/0	0/0	0/0	0/11,4	0/0	0/0
NEM12	0/0	0/0	0/0	20/-5,5	0/0	0/0
NEM13	0/0	0/0	0/0	1,8/-8,6	0/0	0/0
NEM14	0/0	0/0	0/0	1,8/7,7	0/0	0/0
NEM15	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM16	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM17	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM18	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM19	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM20	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM21	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM22	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM23	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM25	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM26	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM27	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM28	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
NEM29	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

Data File: **SARMS_Blank**

Data Path: **C:\Daten\240314cl**

Acqu.

Smpl Name: **Ism**

Sample

Date: **03/20/24 03:55:11 AM**

Inj. Vol (µl): **10.00**

ID: **1**

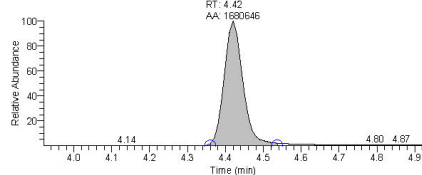
Vial: **Y:B1**

Cal.

Cal. File: **N/A**

Level:

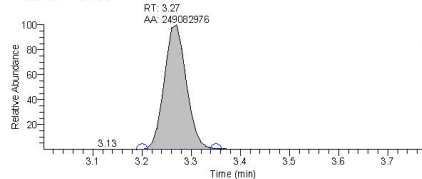
RT: 3.92 - 4.92 SM: 5G



NL: 4.91E5
m/z= 344.83-345.17 F:
- c ESI SRM ms2
381.100
[344.999-345.001] MS
Genesis SARMS_Blank

Component Name: **A0600n_Mefruside_IS**
Expected RT(min): **4.47**
Actual RT(min): **4.42**
Response: **1680645.53**
Response Ratio: **N/A**
Signal To Noise: **684.27**

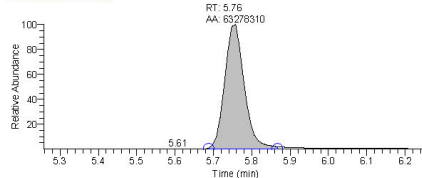
RT: 3.00 - 3.77 SM: 5G



NL: 7.98E7
m/z= 125.04-125.16 F:
+ c ESI SRM ms2
349.060
[125.105-125.107] MS
Genesis SARMS_Blank

Component Name: **A1100p_Formoterol_C13,d3_IS**
Expected RT(min): **3.34**
Actual RT(min): **3.27**
Response: **249082976.14**
Response Ratio: **N/A**
Signal To Noise: **36592.09**

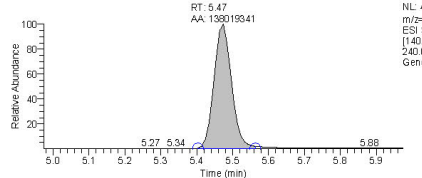
RT: 5.26 - 6.26 SM: 5G



NL: 1.79E7
m/z= 96.99-97.09 F:
+ c ESI SRM ms2
292.240
[97.039-97.041] MS
Genesis SARMS_Blank

Component Name: **A1300p_TestosteroneD3_IS**
Expected RT(min): **5.80**
Actual RT(min): **5.76**
Response: **63278309.83**
Response Ratio: **N/A**
Signal To Noise: **769.98**

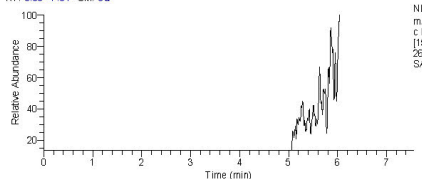
RT: 4.97 - 5.97 SM: 5G



NL: 4.10E7
m/z= 239.98-240.22 F:
- c ESI SRM ms2 284.100
[140.099-140.101]
240.099-240.101] MS
Genesis SARMS_Blank

Component Name: **A2600_Probenecide_IS**
Expected RT(min): **5.52**
Actual RT(min): **5.47**
Response: **138019341.24**
Response Ratio: **N/A**
Signal To Noise: **6645.03**

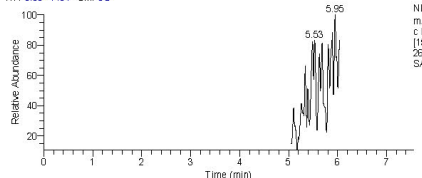
RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 3.25E2
m/z= 149.93-150.07 F:
- c ESI SRM ms2 440.068
[150.006-150.008]
261.025-261.027] MS
SARMS_Blank

Component Name: **E1200n_Andarine_150**
Expected RT(min): **N/A**
Actual RT(min): **N/A**
Response: **N/A**
Response Ratio: **N/A**
Signal To Noise: **N/A**

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 2.29E2
m/z= 260.89-261.15 F:
- c ESI SRM ms2 440.068
[150.006-150.008]
261.025-261.027] MS
SARMS_Blank

Component Name: **E1200n_Andarine_261**
Expected RT(min): **N/A**
Actual RT(min): **N/A**
Response: **N/A**
Response Ratio: **N/A**
Signal To Noise: **N/A**

Instrument

Method: **C:\Methoden\Forschung\SARMS\IS03_SARMS_01**

Page 1 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

Data File: SARMS_Blank

Data Path: C:\Daten\240314cl

Acqu:

Date: 03/20/24 03:55:11 AM

Smpl Name: Ism

Sample

Vial: Y:B1

Inj. Vol (µl): 10.00

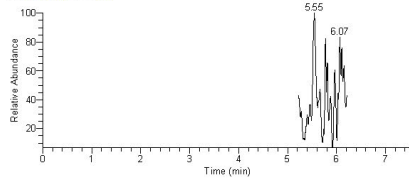
ID: 1

Cal:

Cal. File: N/A

Level:

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 2.39E2
m/z= 117.93-118.06 F.:
c ESI SRM ms2 388.046
[117.990-117.992,
185.001-185.003] MS
SARMS_Blank

Component Name: E1400n_Ostarine_117

Expected RT(min): N/A

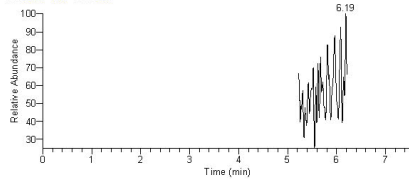
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 3.51E2
m/z= 184.91-185.09 F.:
c ESI SRM ms2 388.046
[117.990-117.992,
185.001-185.003] MS
SARMS_Blank

Component Name: E1400n_Ostarine_185

Expected RT(min): N/A

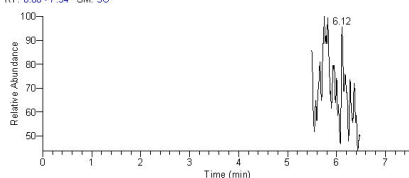
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 1.05E3
m/z= 219.99-220.21 F.:
c ESI SRM ms2 339.092
[220.099-220.101,
239.085-239.087] MS
SARMS_Blank

Component Name: E1500p_LGD_4033_220

Expected RT(min): N/A

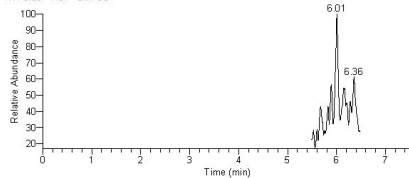
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 2.98E3
m/z= 238.96-239.20 F.:
c ESI SRM ms2 339.092
[220.099-220.101,
239.085-239.087] MS
SARMS_Blank

Component Name: E1500p_LGD_4033_239

Expected RT(min): N/A

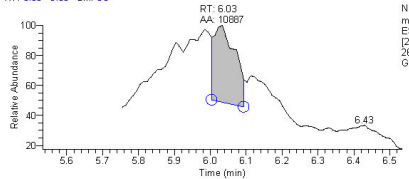
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 5.53 - 6.53 SM: 5G



NL: 5.13E3
m/z= 204.84-205.04 F.:
c ESI SRM ms2 401.000
[204.940-204.942,
260.964-260.966] MS
Genesis SARMS_Blank

Component Name: E1600n_S1_SARM_204

Expected RT(min): 6.11

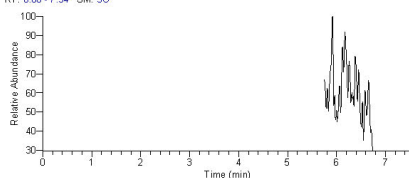
Actual RT(min): 6.03

Response: 10886.95

Response Ratio: 0.000

Signal To Noise: 4.85

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 6.95E2
m/z= 260.83-261.09 F.:
c ESI SRM ms2 401.000
[204.940-204.942,
260.964-260.966] MS
SARMS_Blank

Component Name: E1600n_S1_SARM_260

Expected RT(min): N/A

Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

Instrument

Method: C:\Methoden\Forschung\SARMS\S03_SARMS_01

Page 2 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

Data File: SARMS_Blank

Data Path: C:\Daten\240314cl

Acqu.

Smpl Name: Ism

Sample

Date: 03/20/24 03:55:11 AM

Inj. Vol (µl): 10.00

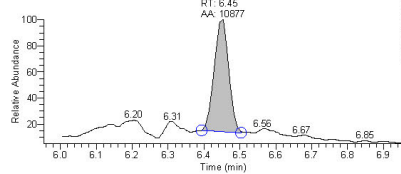
ID: 1

Vial: Y:B1

Level:

Cal. File: N/A

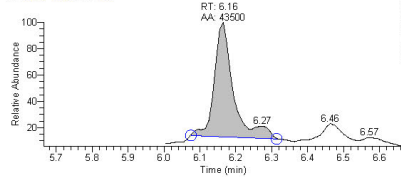
RT: 5.95 - 6.95 SM: 5G



NL: 4.51E3
m/z= 126.84-126.96 F: - c
ESI SRM ms2 416.966
[126.900-126.902
260.966-260.968] MS
Genesis SARMS_Blank

Component Name: E1700n_S9_SARM_126
Expected RT(min): 6.37
Actual RT(min): 6.45
Response: 10877.05
Response Ratio: 0.000
Signal To Noise: 24.95

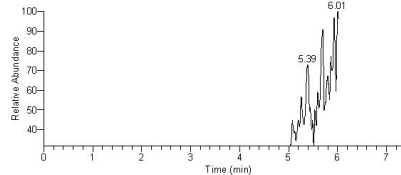
RT: 5.66 - 6.66 SM: 5G



NL: 1.36E4
m/z= 260.83-261.09 F: - c
ESI SRM ms2 416.966
[126.900-126.902
260.966-260.968] MS
Genesis SARMS_Blank

Component Name: E1700n_S9_SARM_260
Expected RT(min): 6.37
Actual RT(min): 6.16
Response: 43500.34
Response Ratio: 0.000
Signal To Noise: 23.30

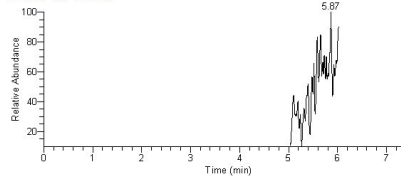
RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 9.98E2
m/z= 170.01-170.19 F: +
c ESI SRM ms2 394.244
[170.106-170.108
223.053-223.055] MS
SARMS_Blank

Component Name: E2000p_RAD140_170
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

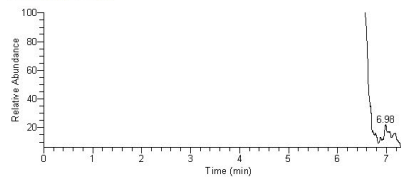
RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 2.70E2
m/z= 223.94-223.16 F: +
c ESI SRM ms2 394.244
[170.106-170.108
223.053-223.055] MS
SARMS_Blank

Component Name: E2000p_RAD140_223
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

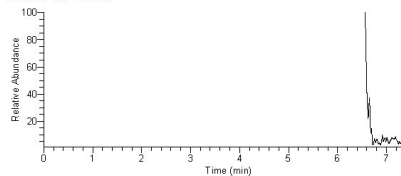
RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 1.81E3
m/z= 325.12-325.44 F: +
c ESI SRM ms2 399.167
[325.279-325.281
357.279-357.281] MS
SARMS_Blank

Component Name: E5700pYK_-11_(-CH3OH)_325
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 7.29E2
m/z= 357.10-357.46 F: +
c ESI SRM ms2 399.167
[325.279-325.281
357.279-357.281] MS
SARMS_Blank

Component Name: E5700pYK_-11_(-CH3OH)_357
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

Instrument

Method: C:\Methoden\Forschung\SARMS\IS03_SARMS_01

Page 3 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

Data File: SARMS_Blank

Data Path: C:\Daten\240314cl

Acqu.

Date: 03/20/24 03:55:11 AM

Smpl Name: Ism

Sample

Vial: Y:B1

ID: 1

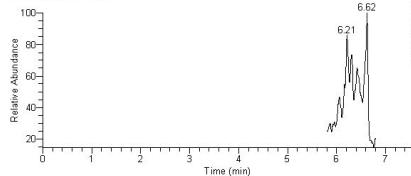
Inj. Vol (µl): 10.00

Cal.

Cal. File: N/A

Level:

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 2.67E3
m/z= 144.91-145.05 F.:
c ESI SRM ms2.415.098
[144.987-144.989,
269.070-269.072] MS
SARMS_Blank

Component Name: E5800n_S-23_144

Expected RT(min): N/A

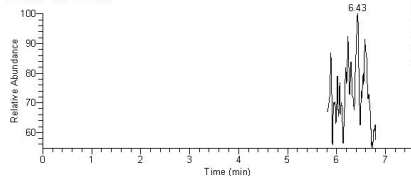
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 1.15E3
m/z= 268.94-269.20 F.:
c ESI SRM ms2.415.098
[144.987-144.989,
269.070-269.072] MS
SARMS_Blank

Component Name: E5800n_S-23_269

Expected RT(min): N/A

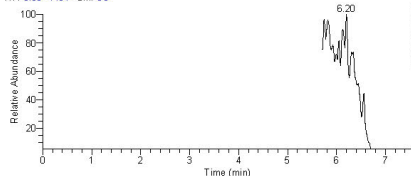
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 3.84E3
m/z= 167.04-167.20 F.:
c ESI SRM ms2.291.126
[167.124-167.126,
193.124-193.126] MS
SARMS_Blank

Component Name: E5900p_ACP-105_167

Expected RT(min): N/A

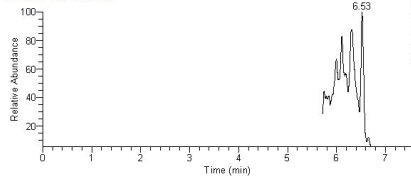
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 8.43E3
m/z= 193.02-193.22 F.:
c ESI SRM ms2.291.126
[167.124-167.126,
193.124-193.126] MS
SARMS_Blank

Component Name: E5900p_ACP-105_193

Expected RT(min): N/A

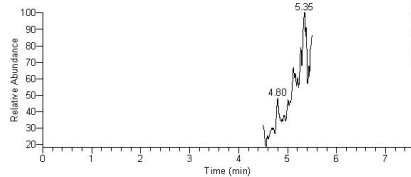
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 5.53E2
m/z= 190.22-190.42 F.:
c ESI SRM ms2.331.072
[190.320-190.322,
311.094-311.096] MS
SARMS_Blank

Component Name: E6000p_GSK2881078_190

Expected RT(min): N/A

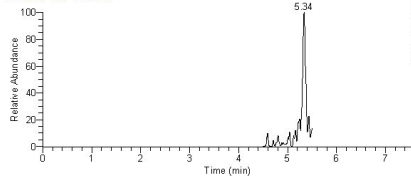
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 3.40E2
m/z= 310.93-311.25 F.:
c ESI SRM ms2.331.072
[190.320-190.322,
311.094-311.096] MS
SARMS_Blank

Component Name: E6000p_GSK2881078_311

Expected RT(min): N/A

Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

Instrument

Method: C:\Methoden\Forschung\SARMS\S03_SARMS_01

Page 4 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

Data File: SARMS_Blank

Data Path: C:\Daten\240314cl

Acqu.

Smpl Name: Ism

Sample

Date: 03/20/24 03:55:11 AM

Inj. Vol (µl): 10.00

ID: 1

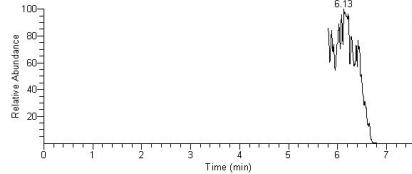
Vial: Y:B1

Cal.

Cal. File: N/A

Level:

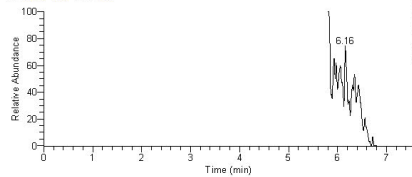
RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 5.61E2
m/z= 244.92-245.16 F: +
c: ESI SRM ms2 342.994
[245.041-245.043,
269.154-269.156] MS
SARMS_Blank

Component Name: E6100p_LGD3303_245
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

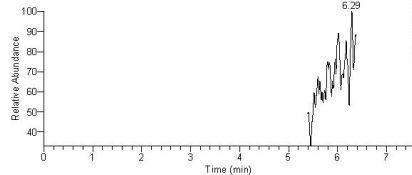
RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 5.52E2
m/z= 269.01-269.29 F: +
c: ESI SRM ms2 342.994
[245.041-245.043,
269.154-269.156] MS
SARMS_Blank

Component Name: E6100p_LGD3303_289
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

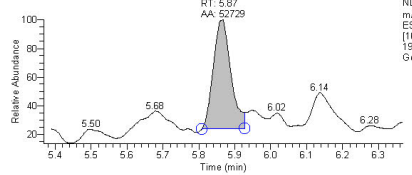
RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 3.38E3
m/z= 169.04-169.30 F: +
c: ESI SRM ms2 279.162
[169.124-169.126,
195.124-195.126] MS
SARMS_Blank

Component Name: E8000p_SARM_AC-262536_169
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

RT: 5.37 - 6.37 SM: 5G



NL: 2.05E4
m/z= 195.02-195.22 F: +c
ESI SRM ms2 279.162
[169.124-169.126,
195.124-195.126] MS
Genesis SARMS_Blank

Component Name: E8000p_SARM_AC-262536_195
Expected RT(min): 5.87
Actual RT(min): 5.87
Response: 52728.84
Response Ratio: 0.001
Signal To Noise: 7.23

Instrument

Method:

C:\Methoden\Forschung\SARMS\IS03_SARMS_01

Page 5 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

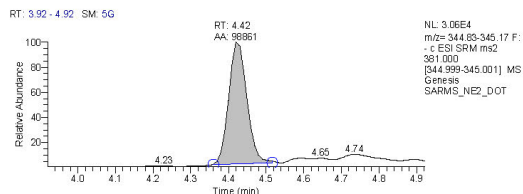
Data File: **SARMS_NE2_DOT**

Smpl Name: **Ism**

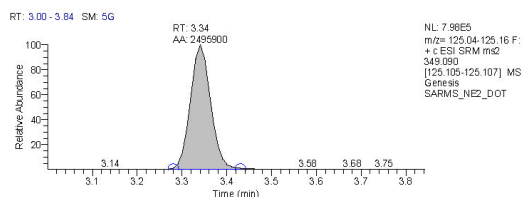
Inj. Vol (µl): **10.00**

Data
Path: **C:\Daten\240314cl**
Sample
ID: **1**
Cal.
Level:

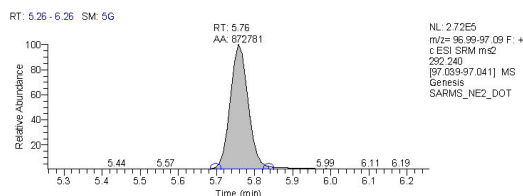
Acqu.
Date: **03/20/24 06:17:09 AM**
Vial: **Y:B9**
Cal. File: **N/A**



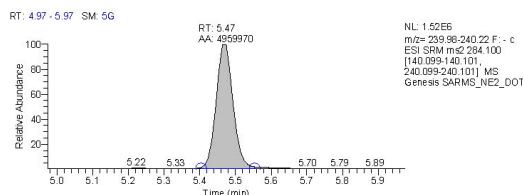
Component Name: **A0600n_Mefruside_IS**
Expected RT(min): **4.47**
Actual RT(min): **4.42**
Response: **98861.39**
Response Ratio: **N/A**
Signal To Noise: **17.61**



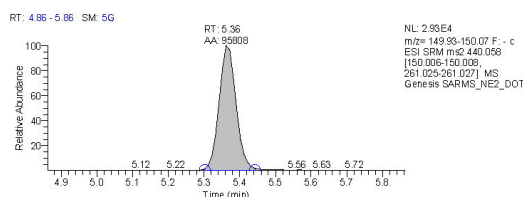
Component Name: **A1100p_Formoterol_C13,d3_IS**
Expected RT(min): **3.34**
Actual RT(min): **3.34**
Response: **2495900.08**
Response Ratio: **N/A**
Signal To Noise: **530.68**



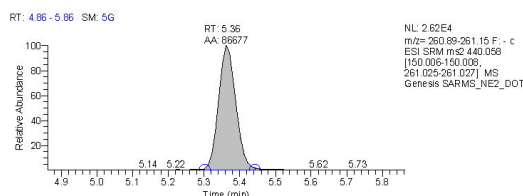
Component Name: **A1300p_TestosteroneD3_IS**
Expected RT(min): **5.80**
Actual RT(min): **5.76**
Response: **872780.87**
Response Ratio: **N/A**
Signal To Noise: **601.59**



Component Name: **A2600_Probenecide_IS**
Expected RT(min): **5.52**
Actual RT(min): **5.47**
Response: **4959969.58**
Response Ratio: **N/A**
Signal To Noise: **633.86**



Component Name: **E1200n_Andarine_150**
Expected RT(min): **5.40**
Actual RT(min): **5.36**
Response: **95808.40**
Response Ratio: **0.019**
Signal To Noise: **453.82**



Component Name: **E1200n_Andarine_261**
Expected RT(min): **5.40**
Actual RT(min): **5.36**
Response: **86677.15**
Response Ratio: **0.017**
Signal To Noise: **304.08**

Instrument
Method: **C:\Methoden\Forschung\SARMS\S03_SARMS_01**

Page 1 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

Data File: SARMS_NE2_DOT

Data Path: C:\Daten\240314.cl

Acqu.

Smpl Name: Ism

Sample

Date: 03/20/24 06:17:09 AM

Inj. Vol (µl): 10.00

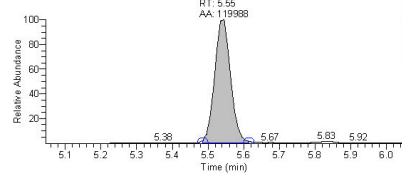
ID: 1

Vial: Y:B9

Level:

Cal. File: N/A

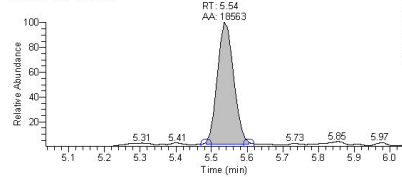
RT: 5.05 - 6.05 SM: 5G



NL: 3.88E4
m/z= 117.93-118.05 F: - c
ESI SRM m/z 386.046
[117.990-117.992]
185.001-185.003 MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E1400n_Ostarine_117
Expected RT(min): 5.58
Actual RT(min): 5.55
Response: 119987.80
Response Ratio: 0.024
Signal To Noise: 354.55

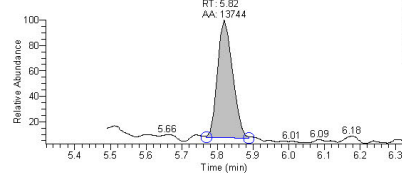
RT: 5.04 - 6.04 SM: 5G



NL: 5.99E3
m/z= 184.91-185.09 F: - c
ESI SRM m/z 386.046
[117.990-117.992]
185.001-185.003 MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E1400n_Ostarine_185
Expected RT(min): 5.58
Actual RT(min): 5.54
Response: 18562.56
Response Ratio: 0.004
Signal To Noise: 48.96

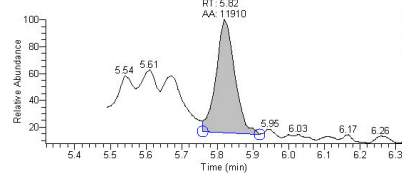
RT: 5.32 - 6.32 SM: 5G



NL: 5.08E3
m/z= 219.99-220.21 F: + c
ESI SRM m/z 339.092
[220.099-220.101]
239.085-239.087 MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E1500p_LGD_4033_220
Expected RT(min): 5.86
Actual RT(min): 5.82
Response: 13743.63
Response Ratio: 0.016
Signal To Noise: 17.40

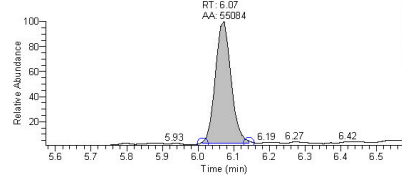
RT: 5.32 - 6.32 SM: 5G



NL: 3.88E3
m/z= 238.96-239.20 F: + c
ESI SRM m/z 339.092
[220.099-220.101]
239.085-239.087 MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E1500p_LGD_4033_239
Expected RT(min): 5.86
Actual RT(min): 5.82
Response: 11910.09
Response Ratio: 0.014
Signal To Noise: 11.64

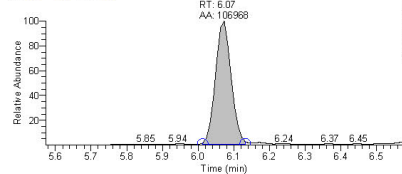
RT: 5.57 - 6.57 SM: 5G



NL: 1.87E4
m/z= 204.84-205.04 F: - c
ESI SRM m/z 401.000
[204.940-204.942]
260.964-260.966 MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E1600n_S1_SARM_204
Expected RT(min): 6.11
Actual RT(min): 6.07
Response: 55083.89
Response Ratio: 0.011
Signal To Noise: 45.16

RT: 5.57 - 6.57 SM: 5G



NL: 3.55E4
m/z= 260.83-261.09 F: - c
ESI SRM m/z 401.000
[204.940-204.942]
260.964-260.966 MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E1600n_S1_SARM_260
Expected RT(min): 6.11
Actual RT(min): 6.07
Response: 106968.22
Response Ratio: 0.022
Signal To Noise: 198.79

Instrument

Method: C:\Methoden\Forschung\SARMS\IS03_SARMS_01

Page 2 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

Data File: SARMS_NE2_DOT

Data Path: C:\Daten\240314cl

Acqu:

Smpl Name: Ism

Sample

Date: 03/20/24 06:17:09 AM

Vial: Y:B9

Inj. Vol (µl): 10.00

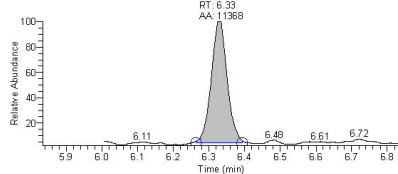
ID: 1

Cal:

Cal. File: N/A

Level:

RT: 5.83 - 6.83 SM: 5G



NL: 3.83E3
m/z= 126.84-126.96 F: - c
ESI SRM m/z 416.966
[126.900-126.902,
260.966-260.968] MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E1700n_S9_SARM_126

Expected RT(min): 6.37

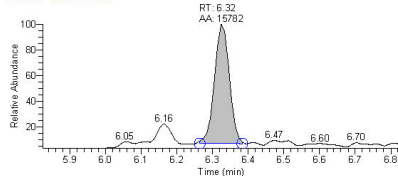
Actual RT(min): 6.33

Response: 11368.02

Response Ratio: 0.002

Signal To Noise: 32.11

RT: 5.82 - 6.82 SM: 5G



NL: 5.88E3
m/z= 260.83-261.09 F: - c
ESI SRM m/z 416.966
[126.900-126.902,
260.966-260.968] MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E1700n_S9_SARM_260

Expected RT(min): 6.37

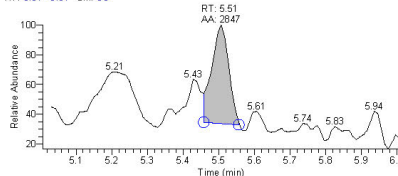
Actual RT(min): 6.32

Response: 15781.88

Response Ratio: 0.003

Signal To Noise: 39.07

RT: 5.01 - 6.01 SM: 5G



NL: 1.30E3
m/z= 170.01-170.19 F: + c
ESI SRM m/z 394.244
[170.106-170.108,
223.053-223.055] MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E2000p_RAD140_170

Expected RT(min): 5.43

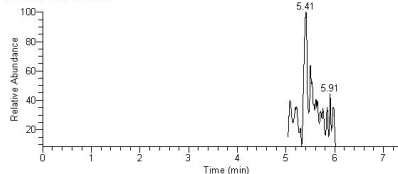
Actual RT(min): 5.51

Response: 2846.55

Response Ratio: 0.003

Signal To Noise: 5.07

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 3.84E2
m/z= 222.94-223.16 F: + c
ESI SRM m/z 394.244
[170.106-170.108,
223.053-223.055] MS
SARMS_NE2_DOT

Component Name: E2000p_RAD140_223

Expected RT(min): N/A

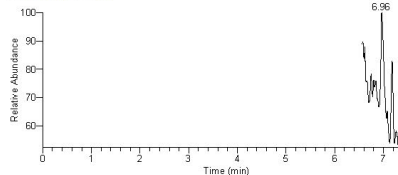
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 2.32E3
m/z= 325.12-325.44 F: + c
ESI SRM m/z 399.167
[325.279-325.281,
357.279-357.281] MS
SARMS_NE2_DOT

Component Name: E5700pYK_-11_(-CH3OH)_325

Expected RT(min): N/A

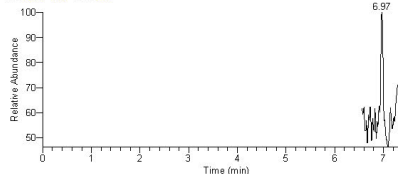
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 1.24E3
m/z= 357.10-357.46 F: + c
ESI SRM m/z 399.167
[325.279-325.281,
357.279-357.281] MS
SARMS_NE2_DOT

Component Name: E5700pYK_-11_(-CH3OH)_357

Expected RT(min): N/A

Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

Instrument

Method: C:\Methoden\Forschung\SARMS\S03_SARMS_01

Page 3 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

Data File: SARMS_NE2_DOT

Data Path: C:\Daten\240314cl

Acqu. Date: 03/20/24 06:17:09 AM

Smpl Name: Ism

Sample

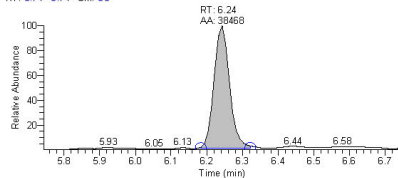
Vial: Y:B9

Inj. Vol (µl): 10.00

ID: 1
Cal.
Level:

Cal. File: N/A

RT: 5.74 - 6.74 SM: 5G



NL: 1.31E4
m/z= 144.91-145.06 F: - c
ESI SRM m/z 415.098
[144.987-144.989]
269.070-269.072] MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E5800n_S-23_144

Expected RT(min): 6.28

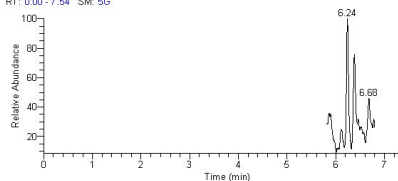
Actual RT(min): 6.24

Response: 38467.94

Response Ratio: 0.008

Signal To Noise: 48.56

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 2.47E3
m/z= 268.94-269.20 F: - c
ESI SRM m/z 415.098
[144.987-144.989]
269.070-269.072] MS
SARMS_NE2_DOT

Component Name: E5800n_S-23_269

Expected RT(min): N/A

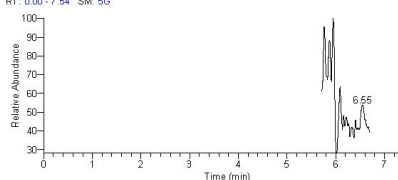
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 5.16E3
m/z= 167.04-167.20 F: + c
ESI SRM m/z 291.126
[167.124-167.126]
193.124-193.126] MS
SARMS_NE2_DOT

Component Name: E5900p_ACP-105_167

Expected RT(min): N/A

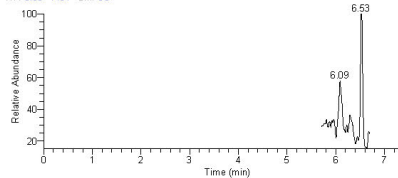
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 6.37E3
m/z= 193.02-193.22 F: + c
ESI SRM m/z 291.126
[167.124-167.126]
193.124-193.126] MS
SARMS_NE2_DOT

Component Name: E5900p_ACP-105_193

Expected RT(min): N/A

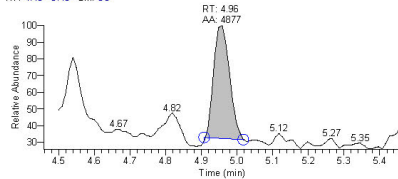
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 4.46 - 5.46 SM: 5G



NL: 2.33E3
m/z= 190.22-190.42 F: + c
ESI SRM m/z 331.072
[190.320-190.322]
311.094-311.096] MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E6000p_GSK2881078_190

Expected RT(min): 5.01

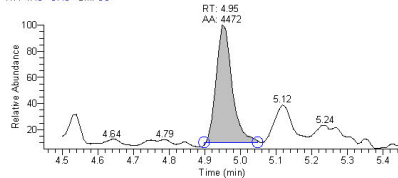
Actual RT(min): 4.96

Response: 4877.21

Response Ratio: 0.006

Signal To Noise: 16.75

RT: 4.45 - 5.45 SM: 5G



NL: 1.62E3
m/z= 310.93-311.25 F: + c
ESI SRM m/z 331.072
[190.320-190.322]
311.094-311.096] MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E6000p_GSK2881078_311

Expected RT(min): 5.00

Actual RT(min): 4.95

Response: 4471.75

Response Ratio: 0.005

Signal To Noise: 8.19

Instrument

Method: C:\Methoden\Forschung\SARMS\IS03_SARMS_01

Page 4 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

Data File: SARMS_NE2_DOT

Data Path: C:\Daten\240314cl

Acqu.

Smpl Name: Ism

Sample

Date: 03/20/24 06:17:09 AM

Vial: Y:B9

Inj. Vol (µl): 10.00

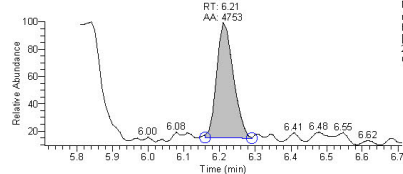
ID: 1

Cal.

Cal. File: N/A

Level:

RT: 5.71 - 6.71 SM: 5G



NL: 1.74E3
m/z= 244.92:245.16 F: + c
ESI SRM m/z 342.994
[245.041:245.043,
289.154:289.156] MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E6100p_LGD3303_245

Expected RT(min): 6.25

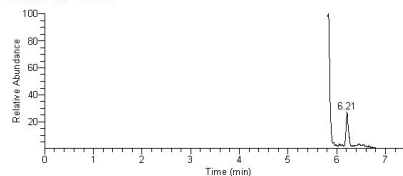
Actual RT(min): 6.21

Response: 4752.66

Response Ratio: 0.005

Signal To Noise: 9.24

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 6.08E3
m/z= 289.01:289.29 F: + c
ESI SRM m/z 342.994
[245.041:245.043,
289.154:289.156] MS
SARMS_NE2_DOT

Component Name: E6100p_LGD3303_289

Expected RT(min): N/A

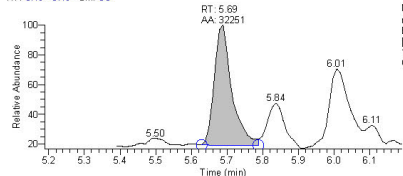
Actual RT(min): N/A

Response: N/A

Response Ratio: N/A

Signal To Noise: N/A

RT: 5.19 - 6.19 SM: 5G



NL: 1.18E4
m/z= 169.04:169.20 F: + c
ESI SRM m/z 279.162
[169.124:169.126,
195.124:195.126] MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E8000p_SARM_AC-262536_169

Expected RT(min): 5.87

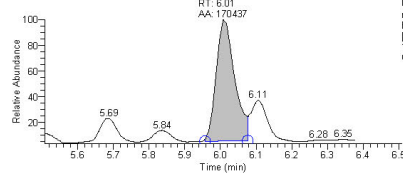
Actual RT(min): 5.69

Response: 32250.70

Response Ratio: 0.037

Signal To Noise: 15.98

RT: 5.51 - 6.51 SM: 5G



NL: 5.03E4
m/z= 195.02:195.22 F: + c
ESI SRM m/z 279.162
[169.124:169.126,
195.124:195.126] MS
Genesis SARMS_NE2_DOT

Component Name: E8000p_SARM_AC-262536_195

Expected RT(min): 5.87

Actual RT(min): 6.01

Response: 170436.66

Response Ratio: 0.195

Signal To Noise: 72.54

Instrument

Method: C:\Methoden\Forschung\SARMS\S03_SARMS_01

Page 5 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

Data File: SARMS_NE2

Data Path: C:\Daten\240314cl

Acqu.

Smpl Name: Ism

Sample

Date: 03/20/24 04:42:30 AM

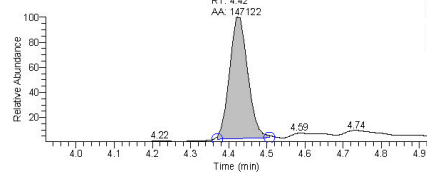
Inj. Vol (µl): 10.00

ID: 1
Cal.
Level:

Vial: Y:B8

Cal. File: N/A

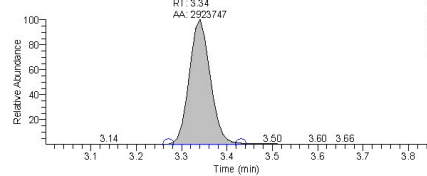
RT: 3.92 - 4.92 SM: 5G



NL: 4.58E4
m/z= 344.83-345.17 F:
+ c ESI SRM m/z
381.000
[344.999-345.001] MS
Genesis SARMS_NE2

Component Name: A0600n_Mefruside_IS
Expected RT(min): 4.47
Actual RT(min): 4.42
Response: 147122.48
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: 19.62

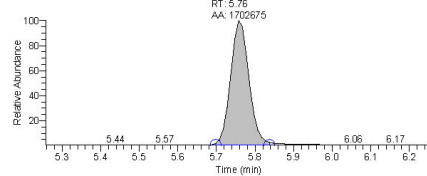
RT: 3.00 - 3.84 SM: 5G



NL: 9.07E5
m/z= 125.04-125.16 F:
+ c ESI SRM m/z
349.080
[125.105-125.107] MS
Genesis SARMS_NE2

Component Name: A1100p_Formoterol_C13,d3_IS
Expected RT(min): 3.34
Actual RT(min): 3.34
Response: 2923746.61
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: 593.67

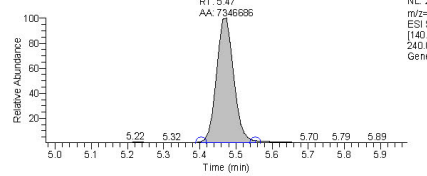
RT: 5.26 - 6.26 SM: 5G



NL: 5.22E5
m/z= 96.99-97.09 F:
+ c ESI SRM m/z
292.240
[97.039-97.041] MS
Genesis SARMS_NE2

Component Name: A1300p_TestosteroneD3_IS
Expected RT(min): 5.80
Actual RT(min): 5.76
Response: 1702675.07
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: 739.78

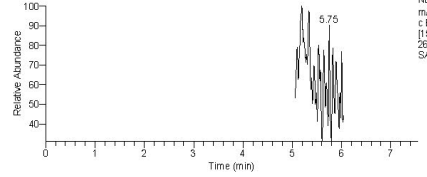
RT: 4.97 - 5.97 SM: 5G



NL: 2.24E5
m/z= 239.98-240.22 F: - c
ESI SRM m/z 284.100
[140.099-140.101]
240.099-240.101] MS
Genesis SARMS_NE2

Component Name: A2600_Probenecide_IS
Expected RT(min): 5.52
Actual RT(min): 5.47
Response: 7346685.63
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: 578.98

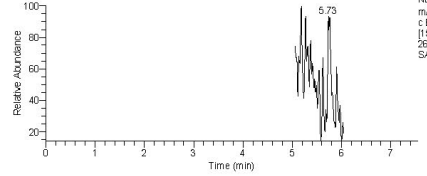
RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 1.82E2
m/z= 149.93-150.07 F: -
c ESI SRM m/z 440.058
[150.006-150.008]
261.025-261.027] MS
SARMS_NE2

Component Name: E1200n_Andarine_150
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 1.92E2
m/z= 260.69-261.15 F: -
c ESI SRM m/z 440.058
[150.006-150.008]
261.025-261.027] MS
SARMS_NE2

Component Name: E1200n_Andarine_261
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

Instrument

Method: C:\Methoden\Forschung\SARMS\IS03_SARMS_01

Page 1 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

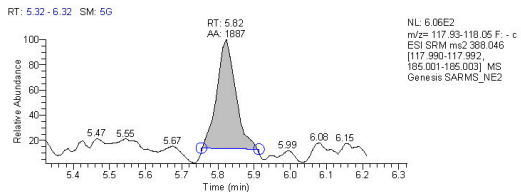
Data File: SARMS_NE2

Smpl Name: Ism

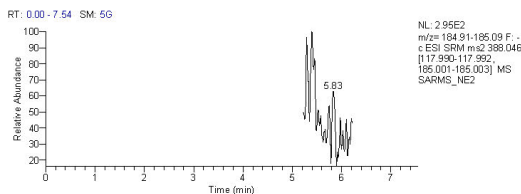
Inj. Vol (µl): 10.00

Data Path: C:\Daten\240314cl
Sample ID: 1
Cal. Level:

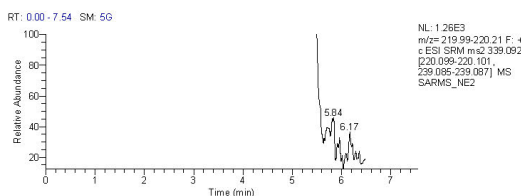
Acqu. Date: 03/20/24 04:42:30 AM
Vial: Y:B8
Cal. File: N/A



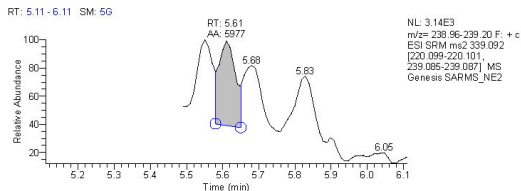
Component Name: E1400n_Ostarine_117
Expected RT(min): 5.58
Actual RT(min): 5.82
Response: 1886.54
Response Ratio: 0.000
Signal To Noise: 5.07



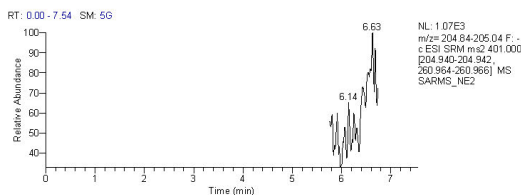
Component Name: E1400n_Ostarine_185
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A



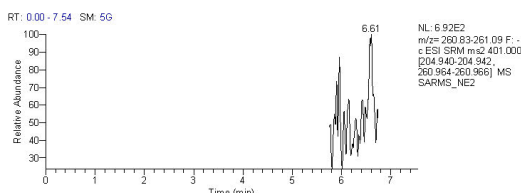
Component Name: E1500p_LGD_4033_220
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A



Component Name: E1500p_LGD_4033_239
Expected RT(min): 5.86
Actual RT(min): 5.61
Response: 5977.24
Response Ratio: 0.004
Signal To Noise: 7.44



Component Name: E1600n_S1_SARM_204
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A



Component Name: E1600n_S1_SARM_260
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

Instrument Method: C:\Methoden\Forschung\SARMS\S03_SARMS_01

Page 2 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

General Form for Confirmation analysis according to SOP AA_DOP_B01

Data File: SARMS_NE2

Data Path: C:\Daten\240314cl

Acqu. Date: 03/20/24 04:42:30 AM

Smpl Name: Ism

Sample ID: 1

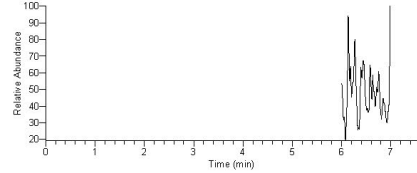
Vial: Y:B8

Inj. Vol (µl): 10.00

Cal. Level:

Cal. File: N/A

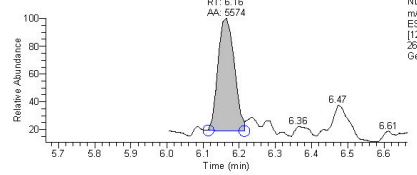
RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 3.09E2
m/z= 126.04-126.96 F: -
c ESI SRM ms2 416.966
[126.900-126.902]
260.966-260.968] MS
SARMS_NE2

Component Name: E1700n_S9_SARM_126
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

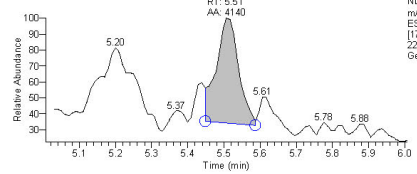
RT: 5.66 - 6.66 SM: 5G



NL: 2.21E3
m/z= 260.83-261.09 F: - c
ESI SRM ms2 416.966
[126.900-126.902]
260.966-260.968] MS
Genesis SARMS_NE2

Component Name: E1700n_S9_SARM_260
Expected RT(min): 6.37
Actual RT(min): 6.16
Response: 5573.50
Response Ratio: 0.001
Signal To Noise: 9.23

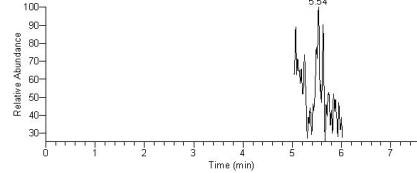
RT: 5.01 - 6.01 SM: 5G



NL: 1.46E3
m/z= 170.01-170.19 F: + c
ESI SRM ms2 394.244
[170.106-170.108]
223.053-223.055] MS
Genesis SARMS_NE2

Component Name: E2000p_RAD140_170
Expected RT(min): 5.43
Actual RT(min): 5.51
Response: 4140.44
Response Ratio: 0.002
Signal To Noise: 5.80

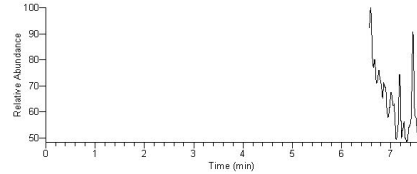
RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 2.38E2
m/z= 222.94-223.16 F: +
c ESI SRM ms2 394.244
[170.106-170.108]
223.053-223.055] MS
SARMS_NE2

Component Name: E2000p_RAD140_223
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

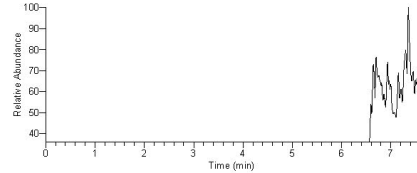
RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 2.20E3
m/z= 325.12-325.44 F: +
c ESI SRM ms2 399.167
[325.279-325.281]
357.279-357.281] MS
SARMS_NE2

Component Name: E5700pYK_11_(-CH3OH)_325
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

RT: 0.00 - 7.54 SM: 5G



NL: 1.10E3
m/z= 357.10-357.46 F: +
c ESI SRM ms2 399.167
[325.279-325.281]
357.279-357.281] MS
SARMS_NE2

Component Name: E5700pYK_11_(-CH3OH)_357
Expected RT(min): N/A
Actual RT(min): N/A
Response: N/A
Response Ratio: N/A
Signal To Noise: N/A

Instrument

Method: C:\Methoden\Forschung\SARMS\S03_SARMS_01

Page 3 of 5

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

.

Welt-Anti-Doping-Code
**INTERNATIONALER
STANDARD**

**VERBOTSLISTE
2025**

Die Liste tritt am 1. Januar 2025 in Kraft.

VERBOTSLISTE 2025
WELT-ANTI-DOPING-CODE
GÜLTIG AB 1. JANUAR 2025

Einleitung

Die *Verbotsliste* ist ein verbindlicher *Internationaler Standard* im Rahmen des Welt-Anti-Doping-Programms.

Die *Liste* wird nach einem umfassenden von der WADA durchgeführten Konsultationsverfahren jährlich aktualisiert. Die *Liste* tritt am 1. Januar 2025 in Kraft.

Der offizielle Wortlaut der *Verbotsliste* wird von der WADA weitergeführt und in englischer und französischer Sprache veröffentlicht. Bei Unstimmigkeiten zwischen der englischen und französischen Fassung ist die englische Fassung maßgebend.

Begriffe, die in dieser *Liste verbotener Substanzen* und *verbotener Methoden* verwendet werden:

Innerhalb des Wettkampfes verboten

Sofern die WADA für eine bestimmte Sportart keinen anderen Zeitraum zugelassen hat, beginnt der Zeitraum „*innerhalb des Wettkampfes*“ grundsätzlich kurz vor Mitternacht (um 23:59 Uhr) am Tag vor einem *Wettkampf*, für den der *Athlet* aufgestellt ist, und endet mit dem Ende dieses *Wettkampfes* und des *Probenahmeverfahrens*.

Zu allen Zeiten verboten

Dies bedeutet, dass *die Substanz* oder die Methode entsprechend der Begriffsbestimmung im *Code* *innerhalb* und *außerhalb des Wettkampfes* verboten ist.

Spezifisch und nichtspezifisch

Nach Artikel 4.2.2 des *Welt-Anti-Doping-Codes* gelten „für die Zwecke der Anwendung des Artikels 10 [...] alle *verbotenen Substanzen* als *spezifische Substanzen* mit Ausnahme derjenigen, die in der *Verbotsliste* anders gekennzeichnet sind. Eine *verbotene Methode* gilt nicht als *spezifische Methode*, es sei denn, sie ist in der *Verbotsliste* ausdrücklich als *spezifische Methode* gekennzeichnet.“ Nach dem Kommentar zu dem Artikel sollen „die in Artikel 4.2.2 genannten *spezifischen Substanzen* und *Methoden* [...] auf keinen Fall als weniger wichtig oder weniger gefährlich als andere Dopingsubstanzen oder -methoden angesehen werden. Es handelt sich dabei einfach um Substanzen und Methoden, bei denen die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass ein *Athlet* sie für andere Zwecke als die Leistungssteigerung eingenommen beziehungsweise angewendet hat.“

Substanzen mit Missbrauchspotential

Nach Artikel 4.2.3 des *Codes* sind *Substanzen mit Missbrauchspotential* jene Substanzen, die als solche gekennzeichnet sind, weil sie in der Gesellschaft häufig außerhalb eines sportlichen Zusammenhangs missbraucht werden. Als *Substanzen mit Missbrauchspotential* gelten: Cocain, Diamorphin (Heroin), Methylenedioxyamfetamin (MDMA/„Ecstasy“) und Tetrahydrocannabinol (THC).

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

S1 Anabole Substanzen

Zu allen Zeiten verboten (*innerhalb und außerhalb des Wettkampfes*)
Alle verbotenen Substanzen in dieser Klasse sind nichtspezifische Substanzen.

Anabole Substanzen sind verboten.

S1.1. Anabol-androgene Steroide (AAS)

Bei exogener Verabreichung, dazu gehören unter anderem

1-Androstendiol (5alpha-Androst-1-en-3beta,17beta-diol);
1-Androstendion (5alpha-Androst-1-en-3,17-dion);
1-Androsteron (3alpha-Hydroxy-5alpha-androst-1-en-17-on);
1-Epiandrosteron (3beta-Hydroxy-5alpha-androst-1-en-17-on);
1-Testosteron (17beta-Hydroxy-5alpha-androst-1-en-3-on);
4-Androstendiol (Androst-4-en-3beta,17beta-diol);
4-Hydroxytestosteron (4,17beta-Dihydroxyandrost-4-en-3-on);
5-Androstendion (Androst-5-en-3,17-dion);
7alpha-Hydroxy-DHEA;
7beta-Hydroxy-DHEA;
7-Keto-DHEA;
11beta-Methyl-19-nortestosteron;
17alpha-Methylepitiostanol (Epistan);
19-Norandrostendiol (Estr-4-en-3,17-diol);
19-Norandrostendion (Estr-4-en-3,17-dion);
Androst-4-en-3,11,17-trion (11-Ketoandrostendion, Adrenosteron);
Androstanolon (5alpha-Dihydrotestosteron, 17beta-Hydroxy-5alpha-androstan-3-on);
Androstendiol (Androst-5-en-3beta,17beta-diol);
Androstendion (Androst-4-en-3,17-dion);
Bolasteron;
Boldenon;
Boldion (Androsta-1,4-dien-3,17-dion);
Calusteron;
Clostebol;
Danazol ([1,2]Oxazolo[4',5':2,3]pregna-4-en-20-yn-17alpha-ol);
Dehydrochlormethyltestosteron (4-Chlor-17beta-hydroxy-17alpha-methylandrosta-1,4-dien-3-on);
Desoxymethyltestosteron (17alpha-Methyl-5alpha-androst-2-en-17beta-ol und 17alpha-Methyl-5alpha-androst-3-en-17beta-ol);
Dimethandrolon (7alpha,11beta-Dimethyl-19-nortestosteron);
Drostanolon;
Epiandrosteron (3beta-Hydroxy-5alpha-androstan-17-on);
Epidihydrotestosteron (17beta-Hydroxy-5beta-androstan-3-on);
Epitestosteron;
Ethylestrenol (19-Norpregna-4-en-17alpha-ol);
Fluoxymesteron;
Formebolon;
Furazabol (17alpha-Methyl[1,2,5]oxadiazolo[3',4':2,3]-5alpha-androstan-17beta-ol);

Anhang
positive Probe (S9 +ISTD)
dotierte Probe (alle SARM+ISTD)
Blank Probe (ISTD)
Verbotsliste

Gestrinon; Mestanolon; Mesterolone; Metandienon (17beta-Hydroxy-17alpha-methylandrosta-1,4-dien-3-on); Metenolon; Methandriol; Methasteron (17beta-Hydroxy-2alpha,17alpha-dimethyl-5alpha-androstan-3-on); Methyl-1-testosteron (17beta-Hydroxy-17alpha-methyl-5alpha-androst-1-en-3-on); Methylclostebol; Methyldienolon (17beta-Hydroxy-17alpha-methylestra-4,9-dien-3-on); Methylnortestosteron (17beta-Hydroxy-17alpha-methylestr-4-en-3-on); Methyltestosteron; Metribolon (Methyltrienolon, 17beta-Hydroxy-17alpha-methylestra-4,9,11-trien-3-on); Miboleron; Nandrolon (19-Nortestosteron); Norboleton; Norclostebol (4-Chlor-17beta-ol-estr-4-en-3-on); Norethandrolon; Oxabolon; Oxandrolon; Oxymesteron; Oxymetholon; Prasteron (Dehydroepiandrosteron, DHEA, 3beta-Hydroxyandrost-5-en-17-on); Prostanozol (17beta-[(Tetrahydropyran-2-yl)oxy]-1'H-pyrazolo[3,4:2,3]-5alpha-androstan); Quinbolon; Stanozolol; Stenbolon; Testosteron; Tetrahydrogestrinon (17-Hydroxy-18a-homo-19-nor-17alpha-pregna-4,9,11-trien-3-on); Tibolon Trenbolon (17beta-Hydroxyestr-4,9,11-trien-3-on) Trestolon (7alpha-Methyl-19-nortestosteron, MENT)
--

und andere Substanzen mit ähnlicher chemischer Struktur oder ähnlicher/n biologischer/n Wirkung(en).

S1.2. Andere anabole Substanzen

Dazu gehören unter anderem

Clenbuterol, Osilodrostat, Ractopamin, Selektive Androgen-Rezeptor-Modulatoren [SARMs, zum Beispiel Andarin, Enobosarm (Ostarin), LGD-4033 (Ligandrol), RAD140, S-23 und YK-11], Zeranol und Zilpaterol.