

Bestimmung der natürlichen Isotopenverhältnisse der organischen Hauptbestandteile von Urin für die Anwendung in der Sportwissenschaft und Dopinganalytik: Harnstoff ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ), Kreatinin/Kreatin ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) und Bicarbonat ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ )

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Frank Hülsemann

aus Duisburg-Homberg

2007

Berichtersteller: Prof. Dr. H.-G. Schmalz  
Prof. Dr. W. Schänzer

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 04.07.2007

Die Bestimmung der Isotopenverhältnisse der organischen Hauptbestandteile des Urins: Harnstoff, Kreatin/Kreatinin und Bicarbonat sind für die Sportwissenschaft und/oder Dopinganalytik von Interesse. Mit Hilfe der Isolierung des Harnstoffes durch die quantitative Fällung durch Xanthydrol und Bestimmung der Stickstoffisotopenverhältnisse per EA-IRMS können Aussagen zum endogenen Aminosäurestoffwechsel gemacht werden. Im Rahmen einer Fallstudie konnten so bei einem 24-h-Radrennen katabole und anabole Zustände bei körperlicher Belastung identifiziert werden. Die Isolierung von Kreatinin aus humanem Urin per Kationenaustauschchromatographie ermöglicht sowohl die Analyse der Stickstoffisotopenverhältnisse für Kreatinin per EA-IRMS als auch die indirekte Bestimmung der Stickstoffisotopenverhältnisse von Kreatin. Mit Hilfe dieser Methode können exogene Gaben von synthetischem Kreatin-Monohydrat durch Analyse des Stickstoffisotopenverhältnisses von urinärem Kreatinin und Gesamtkreatinin identifiziert werden. Die Kohlenstoffisotopenverhältnisse von urinärem Bicarbonat können durch Fällung mit Barytwasser und anschließender Messung in einem modifizierten EA-IRMS-System bestimmt werden. Die im Rahmen einer Fallstudie bestimmten Kohlenstoffisotopenverhältnisse für humanes Bicarbonat unterscheiden sich signifikant von den Kohlenstoffisotopenverhältnissen des urinären Gesamtstickstoffes und weisen auf die Einnahme technischen Bicarbonates hin. Die Methode eignet sich daher grundsätzlich für die Anwendung als Dopingnachweis für exogene Bicarbonatgaben im Pferdesport.

The determination of the isotope ratios of the urinary main compounds urea, creatine/creatinine and bicarbonate are interesting for sports science and doping analysis. The isolation of urea by quantitative precipitation with Xanthydrol and isotope ratio analysis by EA-IRMS allows recent investigations of the human amino acid metabolism. Within a case study performed during and after a 24-hour bicycle race catabolic and anabolic status could be identified. Isolation of creatinine by means of cation-exchange-chromatography allows the analysis of the nitrogen isotope ratios of creatinine by EA-IRMS and the indirect determination of the nitrogen isotope ratios of creatine. Exogenous administration of creatine-monohydrate can be identified by analysis of the nitrogen isotope ratios of urinary creatinine and total creatinine. The carbon isotope ratios of urinary bicarbonate can be determined by precipitation with saturated barium hydroxide solution and measurement on a modified EA-IRMS-system. Carbon isotope ratios of human urinary bicarbonate indicate administration of technical bicarbonate and differ significant from the carbon isotope ratios of total urinary carbon. The method is basically suitable for the implementation of a new doping test for exogenous bicarbonate administration in equestrian sport.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Schänzer für die Überlassung des Themas, die Aufnahme im *Institut für Biochemie* der *Deutschen Sporthochschule Köln* und für die Unterstützung während der experimentellen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. H.-G. Schmalz danke ich für die Übernahme der formalen Betreuung.

Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des *Institutes für Biochemie* der *Deutschen Sporthochschule Köln*, die mich während der Arbeit unterstützt haben, und insbesondere den Mitarbeitern der IRMS-Abteilung für die vielen Fachgespräche und Anregungen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Ebenfalls danke ich den Probanden der Fallstudien, den Mitarbeitern des *Instituts für Trainingswissenschaft und Sportinformatik* und des *Institutes für Kreislaufforschung und Sportmedizin* der *Deutschen Sporthochschule Köln* für die Kooperation bei der Durchführung der Projekte, sowie der Firma *Degussa* für die zur Verfügung gestellten Proben.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>12</b>
<b>2 Grundlagen .....</b>	<b>15</b>
2.1 Harnstoff .....	15
2.1.1 Physiologie des Harnstoffes .....	15
2.1.2 Harnstoff und körperliche Belastung .....	16
2.2 Kreatin und Kreatinin .....	17
2.2.1 Biosynthese und Physiologie des Kreatins .....	18
2.2.2 Kreatin in Lebensmitteln und als Nahrungsergänzungsmittel .....	21
2.2.3 Industrielle Synthese von Kreatin-Monohydrat .....	23
2.2.4 Kreatin und Doping .....	24
2.3 Bicarbonat .....	25
2.3.1 Physiologie des Bicarbonats .....	26
2.3.2 Bicarbonat und Doping .....	27
2.4 Isotopenverhältnismassenspektrometrie (IRMS) .....	29
2.4.1 EA-IRMS .....	29
2.4.2 Standards und Vergleichsmaterialien für die IRMS .....	32
2.4.3 Anwendung der IRMS in der Dopinganalytik .....	33
2.4.4 Anwendung der IRMS in der Authentizitäts- und Herkunftskontrolle ...	34
2.5 Isotopenfraktionierung .....	35
2.5.1 Natürliche Variation der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in der Biosphäre .....	36
2.5.2 Natürliche Variation der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte in der Biosphäre .....	37
<b>3 Problemstellung .....</b>	<b>40</b>
<b>4 Experimenteller Teil .....</b>	<b>42</b>
4.1 Isolierung von Harnstoff aus dem Urin für die IRMS .....	42
4.2 Kreatin und Kreatinin .....	42
4.2.1 Untersuchung von Nahrungsergänzungsmitteln .....	42
4.2.2 Isolierung von Kreatinin per Kationenaustauschchromatographie .....	43
4.2.3 Isolierung von Kreatin per Kationenaustauschchromatographie .....	44

4.2.4	Isolierung von Gesamtkreatinin .....	44
4.2.5	Regeneration und Aktivierung des Kationenaustauschers .....	46
4.2.6	Quantifizierung von Kreatin und Kreatinin .....	46
4.3	Isolierung von Bicarbonat für die IRMS .....	49
4.4	Aufbereitung von Gesamturin für die IRMS .....	50
4.5	Isolierung von Serum-Proteinen für die IRMS .....	50
4.6	Präparation von Struktur-Proteinen für die IRMS .....	50
4.7	Aufbereitung von Nahrungsmitteln für die IRMS .....	51
4.8	EA-IRMS .....	51
4.8.1	Aufbau und Methoden .....	51
4.8.2	Kalibrierung und Linearität .....	55
4.8.3	Abhängigkeit der Isotopenwerte von EA-Geräteparametern .....	57
4.8.4	Laborstandards .....	59
4.8.5	Gasanalyse .....	61
4.9	Überprüfung der Präzision und Richtigkeit der Methoden .....	62
4.10	Analyse von Urinproben .....	63
4.10.1	Versuchsdurchführung $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Harnstoff bei Belastung .....	63
4.10.2	Versuchsdurchführung Fallstudie Supplementierung mit Kreatin- Monohydrat .....	65
4.10.3	Bicarbonat .....	65
4.10.3.1	Humanurin .....	66
4.10.3.2	Pferdeurin .....	66
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>67</b>
5.1	Bestimmung des $\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff aus Urin .....	67
5.1.1	Richtigkeit der Methode .....	68
5.1.2	Präzision der Methode .....	70
5.1.3	Stabilität von Harnstoff im Urin hinsichtlich des $\delta^{15}\text{N}$ .....	71
5.1.4	$\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff bei körperlicher Belastung .....	74
5.1.4.1	$\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zu den Harnstoff-Konzentrationen ....	82
5.1.4.2	$\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zum urinären Gesamtstickstoff .....	84
5.1.4.3	$\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zu Serum-Proteinen .....	88
5.1.4.4	$\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zu Struktur-Proteinen .....	91
5.1.4.5	$\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zur Ernährung .....	95

---

5.1.4.6	$\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zu physiologischen Parametern .....	100
5.1.4.7	Modell zur Erklärung der belastungsinduzierten Änderungen der $\delta^{15}\text{N}$ von urinärem Harnstoff .....	102
5.2	Bestimmung des $\delta^{15}\text{N}$ von Kreatin und Kreatinin aus Urin .....	111
5.2.1	Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden .....	111
5.2.2	Kationenaustauschchromatographie .....	113
5.2.2.1	Ionenstärke und Wahl des Puffers .....	113
5.2.2.2	Adsorption von Kreatin und Kreatinin .....	115
5.2.2.3	Trennung von Kreatin und Kreatinin .....	117
5.2.2.4	Desorption von Kreatinin .....	121
5.2.2.5	Umwandlung von Kreatin zu Kreatinin .....	125
5.2.3	Präzision und Richtigkeit der Methode .....	127
5.2.4	Synthetische Kreatin-Monohydrate .....	130
5.2.5	Fallstudie Kreatin-Monohydrat-Supplementierung .....	136
5.3	Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ von Bicarbonat aus Urin .....	140
5.3.1	Richtigkeit der Methode .....	141
5.3.2	Präzision der Methode .....	144
5.3.3	Analyse von Humanurin .....	145
5.3.4	Analyse von Pferdeurin .....	147
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>151</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>154</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>166</b>
Anhang 1	Chemikalienliste .....	166
Anhang 2	Experimentelle Daten Belastungsstudie .....	167
Anhang 3	Verlauf der Konzentrationen stickstoffhaltiger Substanzen während der Belastungsstudie .....	173
Anhang 4	Bestimmung der Urinmenge über die Kreatininkonzentrationen .....	176
Anhang 5	Auswertung der Ernährungsprotokolle Belastungsstudie .....	176
Anhang 6	Untersuchte Nahrungsmittel .....	186
Anhang 7	Sauerstoffdruck des Blutes bei der Belastungsstudie .....	187
Anhang 8	Daten Modellrechnung .....	188

Anhang 9	Liste der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel .....	192
Anhang 10	Experimentelle Daten Fallstudie Kreatin-Monohydrat- Supplementierung .....	195
Anhang 11	Liste der untersuchten Pferdeurine .....	196
Anhang 12	Abbildungsverzeichnis .....	198
Anhang 13	Tabellenverzeichnis .....	202

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$1\sigma$	Standardabweichung
$\delta^{13}\text{C}$	Isotopenverhältnis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , ausgedrückt in ‰
$\delta^{15}\text{N}$	Isotopenverhältnis $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , ausgedrückt in ‰
$\varepsilon$	Fraktionierungsfaktor
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\varphi$	Stofffluss
AA	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AGAT	Arginin-Glycin-Amidino-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
BSIA	Bulk Sample Isotope Analysis
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
CEC	Kationenaustauschchromatographie
CF-IRMS	Continuous-Flow-Isotopenverhältnismassenspektrometrie
cm	Zentimeter
Cr	Kreatin
Crn	Kreatinin
CSIA	Compound Specific Isotope Analysis
d	Tage
D	Diät
E	Epitestosteron
EA	Elementaranalysator
EA-IRMS	Elementaranalysator-Isotopenverhältnismassenspektrometrie
g	Gramm
GAMT	Guanidinoacetat-Methyl-Transferase

GC	Gaschromatograph
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-C-IRMS	Gaschromatographie-Verbrennungs-Isotopenverhältnismassenspektrometrie
GS	Gesamtstickstoff
h	Stunden
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HS	Harnstoff
I	Ionenstärke
IAEA	International Atomic Energy Agency
IOC	Internationales Olympisches Komitee
IRMS	Isotopenverhältnismassenspektrometrie
k	Geschwindigkeitskonstante
kcal	Kilokalorien
kg	Kilogramm
kPa	kiloPascal
m	Meter
M	Molar
mAU	Milli-Ampere-Unit
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	Stoffmenge
MS	Massenspektrometer
n	Anzahl
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
nm	Nanometer
L	Liter
LC-IRMS	Liquid-Chromatography-Isotopenverhältnismassenspektrometrie
ln	dekadischer Logarithmus
P	Proteine
PO <sub>2</sub>	Sauerstoffdruck

---

P(O <sub>2</sub> )	Sauerstoffpartialdruck
PDB	Pee Dee Belemnite
pH	potentia Hydrogenii
pK <sub>s</sub>	Säurekonstante
R	Verhältnis
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
RE	Referenzgaseinlass
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDT	sample delay time
t	Zeit
T	Testosteron
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TCO <sub>2</sub>	Gesamtcarbonat
TCrn	Gesamtkreatinin
™	Trademark
U	Urin
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v/v	volume/volume
VE	Verdünnungseinheit
VIS	visible
VPDB	Vienna Pee Dee Belemnite
W	Watt
w/w	weight/weight
WADA	World Anti Doping Agency
y	Jahr
z	Ladungszahl
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

Die Untersuchung der natürlichen Verteilung der stabilen Isotope mit Hilfe der Isotopenverhältnismassenspektrometrie (IRMS) ist ein in den letzten Jahrzehnten stark gewachsenes Feld in der angewandten Chemie. Ursprünglich aus der Geochemie stammend, wird die IRMS heutzutage in der Ökologie, Biologie, Archäologie, Biochemie, der forensischen Forschung und in verwandten Fächern zur Untersuchung der Isotopenverteilung hauptsächlich der Bioelemente C, N, O, H, und S genutzt.

Die Analyse der natürlichen Verteilung der stabilen Isotope erlaubt es, Aussagen über Stoffströme in bio-geochemischen Systemen zu machen [1-3] und unterschiedliche Quellen und Herkunftsorte von einzelnen Substanzen oder kompletten Organismen zu lokalisieren [1, 4, 5].

Die IRMS und die Untersuchung natürlicher Isotopenverhältnisse der stabilen Isotope beim Menschen wird im Sport bisher nur in der Dopinganalytik angewendet. Da sich synthetisch hergestellte oder modifizierte Substanzen häufig von ihren natürlichen Analoga in den Isotopenverhältnissen unterscheiden, eignet sich die IRMS für die Differenzierung von exogenen im Sport nicht zugelassenen Verbindungen von endogenen Substanzen. Die Standardanwendung für die IRMS in der Dopinganalytik ist die Gaschromatographie-Verbrennungs-Isotopenverhältnismassenspektrometrie (GC-C-IRMS), mit der Steroide routinemäßig analysiert werden [6], aber auch weitere in der Dopinganalytik interessante Stoffe wie Koffein [7], Kokain [4] und Ephedrin [8] untersucht werden können. Das Prinzip der GC-C-IRMS erfordert zur Analyse leicht flüchtige Substanzen, weshalb nicht alle Substanzgruppen mit Hilfe der GC-C-IRMS untersucht werden können. Die Elementaranalyse-Isotopenverhältnismassenspektrometrie (EA-IRMS) ermöglicht die Bestimmung von Isotopenverhältnissen von nicht per GC-C-IRMS zu analysierenden Stoffen.

Drei solcher nicht per GC-C-IRMS zugänglichen, aber für die Sportwissenschaft und/oder Dopinganalytik interessante Substanzen, sind die organischen Hauptbestandteile des menschlichen Urins: Harnstoff, Kreatinin (bzw. Kreatin) und Bicarbonat (Hydrogencarbonat).

Harnstoff, als organischer Hauptbestandteil des menschlichen Urins, ist das Endprodukt des Stickstoff- bzw. Proteinmetabolismus des menschlichen Körpers. Die

Konzentration von Proteinen im Urin wurde schon Anfang des letzten Jahrhunderts zur Interpretation von physiologischen Zuständen herangezogen [9] und die Messung der Harnstoff-Konzentrationen im Urin nach körperlicher Aktivität wird in der Sportmedizin zur Identifizierung von katabolen Zuständen vorgeschlagen [10]. Im Tierversuch und bei Studien am Menschen konnte in den letzten Jahren festgestellt werden, dass sich die Stickstoffisotopenverhältnisse verschiedener Kompartimente eines Organismus bei verschiedenen körperlichen Zuständen unterscheiden [11-14]. Die Analyse der Verhältnisse der stabilen Isotope des Stickstoffes von urinärem Harnstoff könnte daher bei der Interpretation von Stoffwechselfvorgängen helfen.

**Tab. 1:** Minimale und maximale Anteile der organischen Hauptbestandteile des menschlichen Urins (Harnstoff, Kreatinin/Kreatin und Bicarbonat) am Gesamt-Kohlenstoff bzw. Gesamt-Stickstoff des Urins. Die minimalen und maximalen Werte sind bedingt durch verschiedene physiologische Zustände des Organismus [15].

Substanz	Anteil am Gesamt-C [%]	Anteil am Gesamt-N [%]
Harnstoff	42 - 60	50 - 95
Kreatinin	6,5 - 10	~ 5
Kreatin	0 - 10	0 - 5
Bicarbonat	0 - 30	-

Kreatin und Kreatinin als sein Metabolit spielen bei dem Energiestoffwechsel des Menschen eine wichtige Rolle. Kreatin wird vom Organismus über die Nahrung aufgenommen oder *in vivo* synthetisiert. Industriell hergestelltes Kreatin-Monohydrat wird als Nahrungsergänzungsmittel im Leistungs- und Breitensport in großen Mengen konsumiert, obwohl bis heute nicht einwandfrei geklärt ist, zu welchem Anteil Kreatin vom Organismus über den Verdauungstrakt aufgenommen und an seine Wirkungsstätte im Muskel transportiert wird. Denn der größte Teil des oral eingenommenen Kreatins wird innerhalb weniger Stunden mit dem Urin ausgeschieden [16]. Durch die Analyse der stabilen Isotope des urinären Kreatinins und Kreatins sollte es möglich sein, zwischen endogenem und exogenem Kreatin zu unterscheiden, und so auf eine Applikation von synthetischem Kreatin-Monohydrat zurück schließen zu können.

Bicarbonat ist Bestandteil des komplexen Puffersystems des Körpers und spielt bei anaerober körperlicher Belastung eine wichtige Rolle [17]. Aus diesem Grund wird seit längerem ein positiver Effekt einer Natriumbicarbonatgabe vor einem

Wettkampf im Human- und Pferdesport diskutiert [18-21]. Im Pferdesport wird eine Gabe von Bicarbonat vor einem Wettkampf als ein Verstoß gegen die Doping-Regeln betrachtet [22]. Die bisherige, auf der Messung von Bicarbonat-Konzentrationen basierende, Nachweismethode könnte durch die Analyse der Kohlenstoffisotopie des Bicarbonats im Pferdeurin unterstützt werden.

Die Analyse der Isotopenverhältnisse der drei Hauptbestandteile Harnstoff, Kreatinin und Bicarbonat mit Hilfe der EA-IRMS erfordert eine Isolierung und Reinigung der Substanzen aus dem Urin. Hierbei muss insbesondere darauf geachtet werden, dass es zu keinen Isotopenfraktionierungen oder Verunreinigungen mit anderen kohlenstoff- oder stickstoffhaltigen Substanzen kommt. Die Entwicklung der Isolierungsmethoden und erstmalige Bestimmungen der natürlichen Isotopenverhältnisse von Stickstoff für urinären Harnstoff und Kreatinin/Kreatin sowie für Kohlenstoff des Bicarbonates werden in dieser Arbeit vorgestellt.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Harnstoff

Harnstoff (Kohlensäurediamid,  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) ist das Endprodukt des Protein-Stoffwechsels und der Ammoniak-Entgiftung bei Säugetieren und dem Menschen und die Hauptstickstoffverbindung des Urins. Der Mensch scheidet täglich 20 bis 30 g Harnstoff mit dem Urin aus, bei gemischter Kost werden 80-90 % des mit der Nahrung aufgenommenen Stickstoffes in Form von Harnstoff ausgeschieden. Harnstoff entsteht vorwiegend in der Leber im so genannten Harnstoffzyklus.

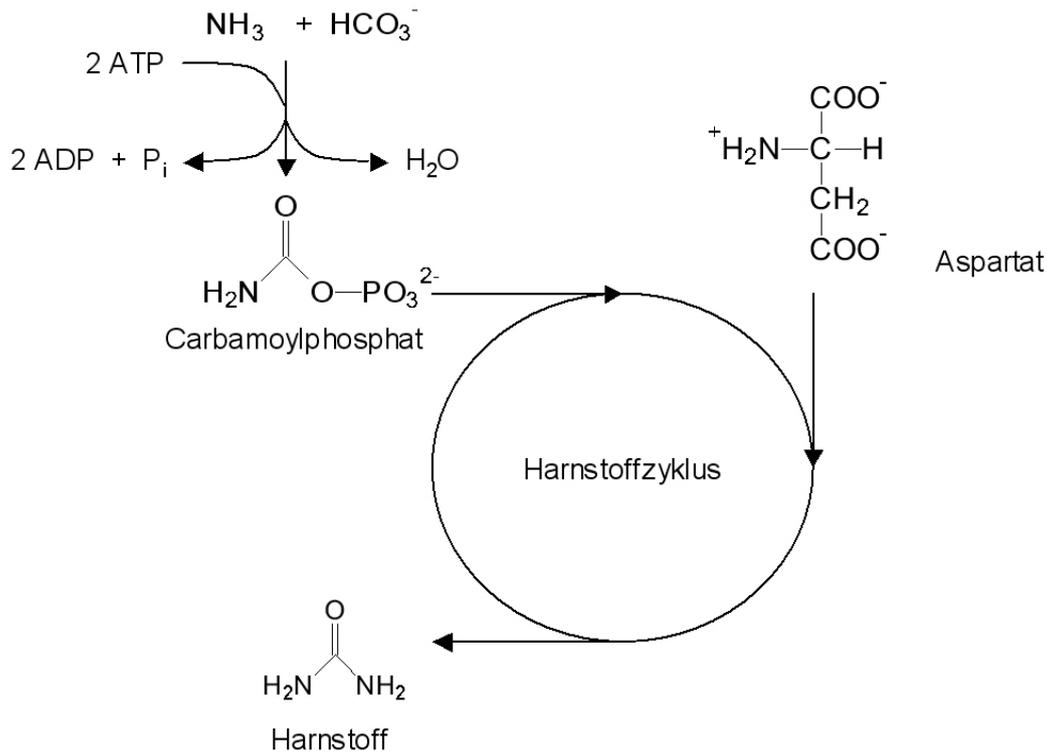
Harnstoff wurde 1729 von Boerhave und erneut 1733 von *Rouelle* im Harn entdeckt, *Fourcroy* und *Vauquelin* stellten 1797 mit Harnstoff weitere chemische Untersuchungen an. Im Jahre 1828 wurde Harnstoff von *Friedrich Wöhler* als erste organische Verbindung synthetisch hergestellt [23].

Harnstoff ist auf Grund seines hohen Stickstoffgehaltes das weltweit bedeutendste Stickstoffdüngemittel, weitere Verwendung findet synthetischer Harnstoff in der Industrie als pharmazeutischer Zusatzstoff und in der Herstellung von Kunstharzen.

#### 2.1.1 Physiologie des Harnstoffes

Die Stickstoffmoleküle des Harnstoffes stammen zum einen Teil aus dem im Körper durch Desaminierung von Aminosäuren produzierten Ammoniak, der in einer Kondensationsreaktion mit Bicarbonat in einem dem Harnstoffzyklus vorgeschalteten Schritt reagiert. Das zweite Stickstoffmolekül des Harnstoffes wird in einer Transaminierungsreaktion von Glutaminsäure auf Asparaginsäure übertragen und im Harnstoffzyklus in das spätere Harnstoffmolekül eingebaut (Abbildung 1).

Die Harnstoffbildung und -ausscheidung ist der Proteinzufuhr proportional, sie ist erhöht sowohl bei proteinreicher Kost, aber auch bei einer negativen Stickstoffbilanz, wenn der Körper mehr Proteine ab- als aufbaut (kataboler Stoffwechsel).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Harnstoffzyklusses zur Verdeutlichung der Herkunft der Stickstoffatome des Harnstoffes. Ammonium (Ammoniak) und Bicarbonat reagieren in einem dem Harnstoffzyklus vorgeschalteten Schritt zu Carbamoylphosphat, welches in den Harnstoffzyklus eintritt. Im weiteren Verlauf wird von Asparaginsäure ein weiteres Stickstoffatom auf das letztendliche Reaktionsprodukt Harnstoff übertragen.

Erniedrigt ist die Harnstoffkonzentration im Urin unter anderem bei einer positiven Stickstoffbilanz (anaboler Stoffwechsel). Der Anteil des Harnstoffes am Gesamtstickstoff des Urins variiert somit mit der Proteinaufnahme und dem Stoffwechsel und schwankt zwischen 50-60 % (proteinfreie Kost) und 90 % (proteinreiche Kost) [15].

Die Harnstoffbildung findet hauptsächlich in den Leberzellen statt, der Harnstoff wird anschließend mit dem Blut zur Niere transportiert und renal ausgeschieden.

### 2.1.2 Harnstoff und körperliche Belastung

Auf Grund der direkten Beziehung des Harnstoffes als Hauptmetabolit des Aminosäure- bzw. Proteinstoffwechsels zum Stickstoffhaushalt des Menschen werden die Stickstoffkonzentrationen im Blut und Urin schon seit über 100 Jahren zur

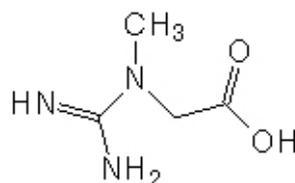
Interpretation des Einflusses von körperlichen Belastungen auf den menschlichen Organismus herangezogen [9].

Bereits im 19. Jahrhundert wurden Studien zur Stickstoffausscheidung nach Belastung durchgeführt, so wurden bereits 1863 die Auswirkungen von körperlicher Belastung bei Bergsteigern untersucht [24]. Die Analyse der Harnstoffkonzentrationen in Blut und Urin bei verschiedenen Ausdauerbelastungsumfängen seit den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts haben Änderungen des Stickstoffhaushaltes und ein Anstieg der Harnstoffkonzentrationen in Blut und Urin bei und nach körperlicher Belastung angezeigt [25-27]. Der Grund für den Anstieg der Harnstoffkonzentrationen wird in einer erhöhten Aminosäureoxidation gesehen, bei der vermehrt Ammoniak als Abbauprodukt anfällt und als Harnstoff ausgeschieden wird [28, 29]. Das Auftreten erhöhter Harnstoffkonzentrationen wird in der Sportmedizin sowohl zur Klassifizierung von Überlastungszuständen herangezogen als auch direkt mit einem katabolen Stoffwechsel in Zusammenhang gebracht [10].

Neben der Bestimmung der Harnstoffkonzentrationen bei Ausdauerbelastungen wurden auch Experimente unter Verabreichung von  $^{15}\text{N}$ -markierten Substanzen vorgenommen, um genauere Aufschlüsse über den Proteinmetabolismus und die beteiligten Aminosäuren zu erhalten [30, 31].

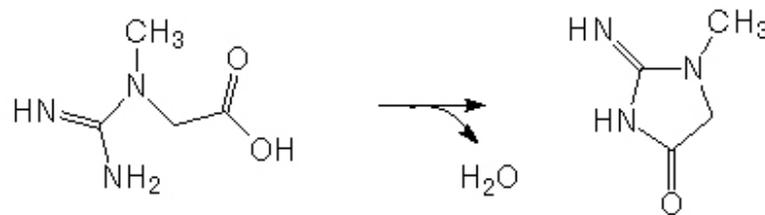
## 2.2 Kreatin und Kreatinin

Kreatin gehört zu den nicht-proteinogenen Aminosäuren, es wird dem menschlichen Organismus durch Nahrungsmittel tierischer Herkunft zugeführt oder im Körper synthetisiert. Die Hauptfunktion von Kreatin im Körper ist die Bereitstellung von energiereichem Phosphat für die Muskelkontraktion, hierzu wird Kreatin im Muskel in Form von Kreatinphosphat gespeichert.



**Abb. 2:** Strukturformel Kreatin (*N*-Amidinosarkosin, Methylguanidinessigsäure)

Kreatinin ist das nicht-enzymatische Abbauprodukt des Kreatins und des Kreatinphosphats, physiologisch unwirksam und wird über die Niere ausgeschieden. In wässriger Lösung *in vitro* steht Kreatin mit Kreatinin im Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht kann durch die Senkung des pH-Wertes oder durch Temperaturerhöhung zum Kreatinin hin verschoben werden [32]. *In vivo* ist die Umwandlung von Kreatin zu Kreatinin irreversibel [33]. Kreatin wird in der Niere rückresorbiert, das Auftreten von Kreatin im Urin wird daher zur Interpretation von Nierenfunktionsstörungen herangezogen.



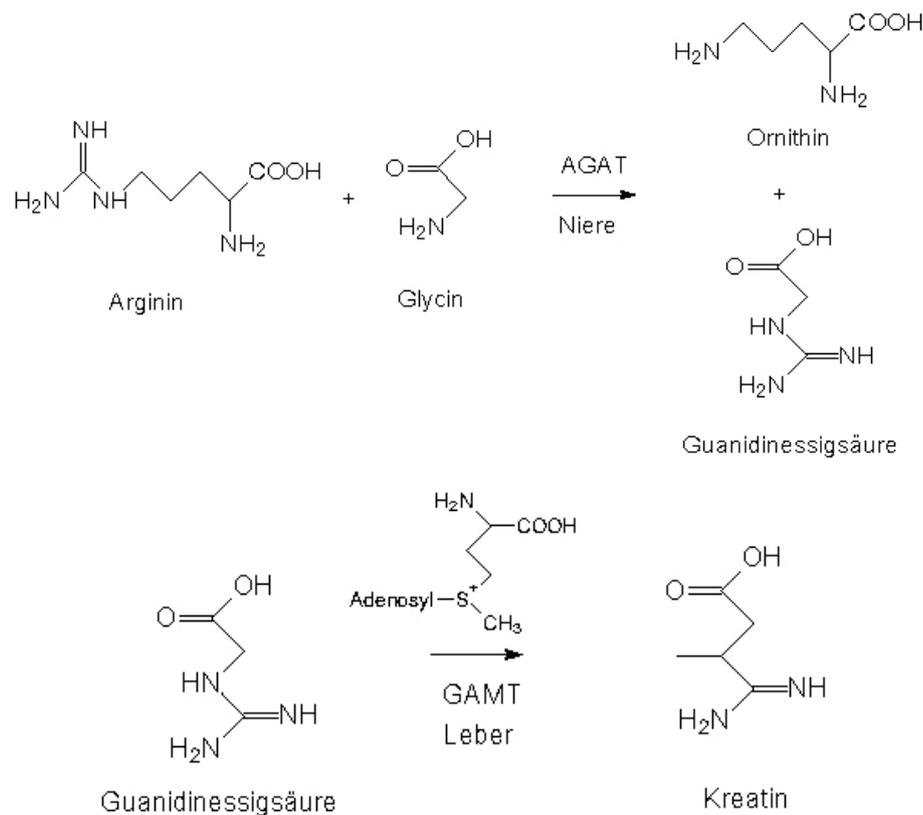
**Abb. 3:** Schematische Darstellung der nicht-enzymatischen Umwandlung von Kreatin in Kreatinin

1832 wurde Kreatin zum ersten Mal vom französischen Wissenschaftler *Chevreul* als Bestandteil von Fleisch (kréas, griechisch = Fleisch) erwähnt [34]. Im Jahre 1844 berichtete *Max Josef Pettenkofer* von 'einem neuen stickstoffhaltigen Körper im Harne' [35], dem *Justus Liebig* später den Namen Kreatinin gab. *Liebig* isolierte Kreatin aus dem Fleisch von Säugetieren, und entdeckte, dass Fleisch von wilden Füchsen bis zu zehnmal mehr Kreatin als das Fleisch von gefangenen Tieren enthielt. Er schloss daraus, dass Muskelaktivität zu einem Anstieg der Kreatinkonzentration im Muskel führt [36]. Es wurde zu dieser Zeit schon über den Zusammenhang zwischen Muskelmasse und Kreatininausscheidung spekuliert. Bereits in den 20er Jahren des 19. Jahrhunderts war Kreatin als 'kommerzielles Produkt' erhältlich und die Kreatinspeicherung im Körper nach Kreatin-Aufnahme wurde quantifiziert [16].

### 2.2.1 Biosynthese und Physiologie des Kreatins

An der Biosynthese von Kreatin im menschlichen Organismus sind drei Aminosäuren beteiligt: Glycin, Arginin und Methionin. Die letzten Schritte der Synthese im Organismus sind die reversible Transamidinierung von L-Arginin auf

Glycin zu Guanidinessigsäure und deren anschließende irreversible Methylierung mittels S-Adenosylmethionin (Abbildung 4) [37].

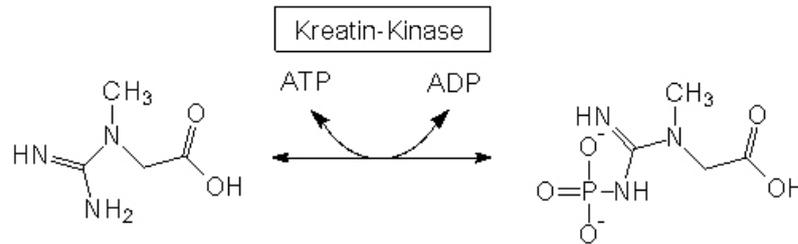


**Abb. 4:** Die letzten Schritte der Biosynthese von Kreatin im menschlichen Körper. In Schritt 1 wird in der Niere durch die Arginin-Glycin Amidino-Transferase (AGAT) Guanidinessigsäure aus Arginin und Glycin gebildet, in Schritt 2 wird in der Leber eine Methylgruppe von dem S-Adenosylmethionin durch die Guanidinoacetat-Methyl-Transferase (GAMT) auf die Guanidinessigsäure irreversibel übertragen.

Im menschlichen Organismus befinden sich die bei der *de Novo* Synthese von Kreatin aktiven Enzyme hauptsächlich in der Leber und der Niere [37]. Dies bedeutet, dass Kreatin außerhalb der Muskeln gebildet und anschließend mit dem Blut in den Muskel transportiert wird. Diese unterschiedlichen Orte für Biosynthese und Verfügbarkeit erlauben eine unabhängige Regulation der einzelnen Prozesse [38]. Die Biosynthese von Kreatin ist von der Konzentration an Kreatin im Muskel abhängig und unterliegt einem physiologischen Kontrollmechanismus. Bei exogener Gabe von Kreatin-Monohydrat kommt es zu einer Down-Regulierung der endogenen Synthese [39, 40].

Nach der Synthese und dem Transport im Blut wird das Kreatin im Muskel gespeichert. Durch enzymatische Phosphorylierung durch die Kreatin-Kinase wird in

den Muskelzellen aus Kreatin und Adenosintriphosphat (ATP) Kreatinphosphat gebildet (Abbildung 5).



**Abb.5:** Umwandlung des Kreatins in das energiereiche Kreatinphosphat durch Kreatin-Kinase.

Die Gesamtmenge von Kreatin und Kreatinphosphat im Körper beträgt zusammen durchschnittlich rund 130 g. 95 % des körpereigenen Kreatins und Kreatinphosphats findet sich in der Skelettmuskulatur, die restlichen 5 % in glatter Muskulatur, Niere, Herz, Gehirn und Hoden. In der Skelettmuskulatur befinden sich davon ungefähr zwei Drittel des Kreatins in der phosphorylierten Form [37].

Die Adenosinphosphate und das Kreatinphosphat stellen die wesentlichen Komponenten des Systems muskulärer Hochenergiephosphate dar: Im Muskel bestehen auf Grund enzymatischer Gleichgewichte enge Beziehungen zwischen den Adenosinphosphaten und dem Kreatinphosphat. Sie nehmen eine zentrale Stellung bezüglich der Regulation muskulärer Stoffwechselreaktionen und der kurzfristigen Energiebereitstellung im Rahmen der Muskelkontraktion ein [37]. Den muskulären Kreatinphosphatspeichern wird eine wesentliche Bedeutung als Energielieferanten im Rahmen von intensiven Kurzzeitbelastungen im Sekundenbereich zugemessen [41, 42].

Die Kreatin-Kinase (Abbildung 5) und die Myokinase, die ein Phosphat vom ATP auf das ADP überträgt, liegen im Muskel in hohen Konzentrationen vor und stellen charakteristische Gleichgewichtsreaktionen ein. Störungen des bestehenden Gleichgewichtes werden unter anderem durch Vorgänge wie die Muskelkontraktion bedingt. Letztere geht mit einer Spaltung von ATP durch die Myokinase zu ADP einher, wodurch die freie Energie von ATP gesenkt wird und eine Resynthese von ATP im Sekundenbereich über die Reaktion von Kreatin-Kinase mit Kreatinphosphat erfolgen kann. Auf diese Weise wird eine hohe Konzentration energiereicher Verbindungen im Muskel aufrechterhalten, ohne dass die ATP-Konzentration selbst erhöht werden muss [37, 38].

Kreatin wird im Körper nicht-enzymatisch zu Kreatinin umgewandelt, das über die Niere mit dem Urin ausgeschieden wird. In Abwesenheit von exogenem Kreatin

beträgt der tägliche Umsatz von Kreatin zu Kreatinin circa 1,6 % pro Tag [43]. Dies bedeutet bei einem Körpergewicht von 70 kg und einem totalen Kreatinpool von 130 g einen täglichen Umsatz von ungefähr 2 g. Kreatin wird in der Niere rückresorbiert und ist deshalb normalerweise nicht im Urin zu finden. Nur wenige Stunden nach der Aufnahme von kreatinreicher Nahrung oder von kreatinhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) ist es im Urin nachweisbar [44].

### 2.2.2 Kreatin in Lebensmitteln und als Nahrungsergänzungsmittel

Kreatin findet sich hauptsächlich in Fleisch, Fisch und anderen tierischen Produkten, in Pflanzen befinden sich nur Spuren. Die durchschnittliche Aufnahme an Kreatin über die Nahrung wurde bei einer gemischten Diät zu 1-2 g pro Tag bestimmt. Dies bedeutet, dass häufig nur ein Teil des im Organismus benötigten Kreatins aus der Nahrung stammt. Der Rest wird durch endogene Synthese gebildet. Bei einer kreatinfreien Ernährung, wie z.B. bei Vegetariern, wird das benötigte Kreatin komplett durch endogene Synthese gebildet [45-48].

Im lebenden Muskel liegen 50-80 % des Kreatins als Kreatinphosphat vor. *Post mortem*, also z.B. nach der Tötung von Schlachttieren, wenn ATP nicht mehr in größeren Mengen über oxidative Prozesse nachgeliefert wird, fällt die Konzentration an Kreatinphosphat innerhalb weniger Stunden sehr stark ab [49].

Im Laufe des 19. Jahrhunderts wurden Fleischextrakte zur ärztlichen und allgemeinen Verwendung hergestellt. Der von *Justus Liebig* entwickelte Fleischextrakt wurde dabei zu dem erfolgreichsten Produkt [50]. Fleischextrakt wurde zuerst in kleinen Maßen von Ärzten als diätisches Lebensmittel und Kräftigungsmittel verordnet. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts begann die industrielle Produktion mit Standorten in Argentinien und Uruguay. Bis heute wird der Fleischextrakt unter dem Namen '*Liebigs Fleischextrakt*' hergestellt und in Feinkostläden verkauft. Die kräftigende Wirkung des Fleischextraktes wurde unter anderem auch auf den hohen Kreatin-Anteil zurückgeführt, und *Liebigs Fleischextrakt* wird als einer der Grundsteine der heutigen Nahrungsergänzungsmittel und insbesondere der Kreatin-Monohydrat-Supplementierung angesehen [50].

**Tab. 2:** Ungefährer Kreatin-Anteil in verschiedenen Nahrungsmitteln (\*: Muskelfleisch)

Lebensmittel	Kreatin-Anteil [g/kg]
Krabben*	Spuren
Kabeljau*	3
Hering*	6,5-10
Scholle*	2
Lachs*	4,5
Tunfisch*	4
Rind*	4,5
Schwein*	5
Milch	0,1
Strauchbeeren	0,02

Industriell hergestelltes Kreatin-Monohydrat ist seit Beginn der 90er Jahre ein weltweit verbreitetes Nahrungsergänzungsmittel sowohl im Leistungssport als auch im Hobby- und Fitnessbereich [51]. Die Jahresumsätze für Kreatin-Monohydrat allein in den USA betragen 1996 50 Millionen US-Dollar und stiegen bis 2001 auf 400 Millionen US-Dollar [52]. Der weltweite Konsum von Kreatin-Monohydrat wurde gegen Ende der 90er Jahre auf 2,7 Millionen Kilogramm geschätzt [53].

In den letzten beiden Jahrzehnten gab es vielzählige Untersuchungen, bei denen widersprüchliche Ergebnisse von Kreatin-Monohydrat-Supplementierungen in Hinblick auf Muskelzuwachs als auch einem Zuwachs in Schnellkraft festgestellt wurden [54, 55]. Zusätzlich wurden auch Untersuchungen durchgeführt, um eventuelle gesundheitliche Schädigungen durch die Einnahme von Kreatin-Monohydrat festzustellen. Hier wurden bis auf wenige Ausnahmen, bei denen Probanden vom Auftreten von Muskelkrämpfen berichteten [56], keine gesundheitlichen Schäden festgestellt [57, 58]. Kreatin-Monohydrat wird heutzutage als 'ungefährliches' Nahrungsergänzungsmitteln nicht nur von Leistungssportlern, sondern auch von einer großen Masse der Bevölkerung konsumiert.

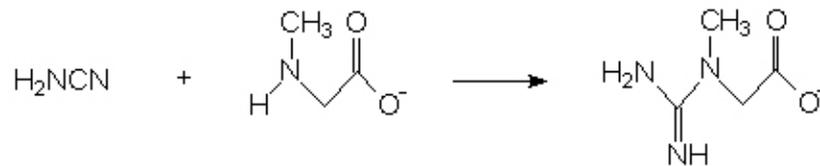
Eine typische Kreatinkur beinhaltet eine Kreatin-Loading-Phase von einer Woche, wobei ein 70 kg schwere Mann täglich drei- bis viermal 5 g Kreatin-Monohydrat zu sich nehmen soll, gefolgt von einer dreimonatigen Einnahme von täglich ein- bis zweimal 2 g Kreatin-Monohydrat [59]. Nach dieser Zeit soll eine einmonatige Pause eingelegt werden, um eventuelle Nebenwirkungen zu vermeiden und die körpereigene Kreatin-Produktion wieder zu aktivieren.

### 2.2.3 Industrielle Synthese von Kreatin-Monohydrat

Bei der konventionellen Produktion wird Kreatin aus Fleischabfällen isoliert. Diese Methode wird allerdings als technisch aufwendig und hygienisch bedenklich bewertet [60, 61]. Industriell hergestelltes Kreatin-Monohydrat ist dagegen ein vollständig synthetisches Produkt. Der weltweit am meisten verwendete patentierte Herstellungsprozess verläuft über die Reaktion von Cyanamid mit Natriumsarkosinat zu Kreatin-Monohydrat (Abbildung 6) [60]. Übliche Nebenprodukte der Synthese sind das Dimerisierungsprodukt Dicyandiamid, das Zyklisierungsprodukt Kreatinin und Dihydrotriazinderivate. Der Anteil dieser Verunreinigungen in den kommerziell angebotenen Kreatin-Monohydrat-Produkten schwankt stark und wird als ein Marker für die Qualität von Kreatin-Monohydraten herangezogen [62, 63]. Neben dieser Synthese wird Kreatin-Monohydrat auch noch auf einem anderen Weg industriell hergestellt, über die Reaktion von Sarkosinat und S-Methylisotioharnstoff [61].

Die Edukte für die Herstellung von Kreatin-Monohydrat sind ebenfalls voll synthetisch. So wird Cyanamid aus Calciumamid dargestellt, welches selber aus Calciumcarbid und Stickstoff dargestellt wird. Die Grundlage für Calciumcarbid bildet elementarer Kohlenstoff. Das an der Darstellung von Kreatin-Monohydrat beteiligte Natriumsarkosinat ist ein Kondensationsprodukt aus Natriumcyanid, Formaldehyd und Methylamin. Der Kohlenstoff des Natriumcyanids wird im Gegensatz zum Stickstoff in das Kreatin-Gerüst eingebaut und stammt über die Zwischenstufe Cyanwasserstoff aus Methan, dessen Grundlage Erdgas oder Kokereigas darstellen. Der Kohlenstoff des Methylamins stammt über das Zwischenprodukt Methanol aus Kohlendioxid, das aus fossilen Brennstoffen gewonnen wird. Die industrielle Quelle für den im Kreatin-Monohydrat eingebauten Stickstoff ist die Fraktionierung von Luft.

Die auf dem Markt erhältlichen synthetischen Kreatin-Monohydrate werden in verschiedenen Produktionsstätten auf der ganzen Welt hergestellt. Zu den Hauptproduktionsländern gehören USA, Deutschland und Österreich sowie China. Die Qualität der erzeugten Kreatin-Monohydrate schwankt stark. Es sind unterschiedliche Mengen an Verunreinigung und Syntheserückständen zu beobachten [63].



**Abb. 6:** Letzter Schritt der industriellen Synthese von Kreatin. Cyanamid reagiert bei alkalischem pH mit Sarkosinat zum Kreatin [60].

Für den Konsumenten ist es nicht ersichtlich, woher das jeweilige Kreatin-Monohydrat stammt, da die Zwischenhändler oft nicht auf den ursprünglichen Hersteller verweisen.

Haupthersteller von Kreatin-Monohydrat sind die Deutsche Firma *Degussa*, ehemals *SKW Trostberg*, die in Deutschland mit hohem Qualitätsstandard das Produkt *creapure™* produziert, *Ferro Pfanstiehl Laboratories*, die zu der *Ferro Corporation* gehören und deren pharmazeutischen Produktionsstätten in den USA liegen. Weitere Produzenten sind die *DSM Fine Chemicals Austria*, die Teil des niederländischen Chemiekonzerns *DSM N.V.* ist und ihren Produktionsstandort in Österreich hat, sowie die Chemikalienproduzenten *Lancaster*, *Acros*, *Sigma* und diverse Firmen in China.

## 2.2.4 Kreatin und Doping

Doping ist nach Definition der World Anti-Doping Agency (*WADA*) der ein- oder mehrmalige Verstoß gegen die Anti-Doping-Regeln, wie sie in Artikel 2.1 bis 2.8 des *WADA Anti-Doping Codes* ausgewiesen sind. Darunter fallen die Anwesenheit einer verbotenen Substanz, eines Metaboliten oder Markers in der einem Athleten entnommenen Probe sowie der Besitz als auch die versuchte Anwendung einer verbotenen Substanz bzw. einer verbotenen Methode [64]. Da Kreatin-Monohydrat nicht auf der Liste der verbotenen Substanzen steht, fällt es nach Definition der *WADA* auch nicht unter Doping.

Es gibt allerdings auch eine Definition für Doping von 1963 durch den Europarat. Danach ist Doping: „...die Verabreichung oder der Gebrauch körperfremder Substanzen in jeder Form und physiologischer Substanzen in abnormaler Form oder auf abnormalem Weg an gesunde Personen mit dem einzigen Ziel der künstlichen

*und unfairen Steigerung der Leistung für den Wettkampf“* [65]. Nach dieser Definition könnte die Einnahme von Kreatin-Monohydrat auf Grund der hohen Dosierung als dopingrelevant angesehen werden, womit sich ein Verbot begründen ließe.

Wegen des weit verbreiteten Gebrauchs von Kreatin-Monohydrat wird seit Mitte der 90er Jahre diskutiert, ob Kreatin auf der Liste der verbotenen Substanzen und Methoden des *IOC* (International Olympic Committee), beziehungsweise der *WADA* stehen soll [44, 66, 67]. Im Jahr 2002 empfahl die *WADA* [68], dass Kreatin nicht auf die Doping-Liste gesetzt wird, weil: *„es nur wenige wissenschaftlich gesicherte Untersuchungen gäbe, dass eine Einnahme von Kreatin-Monohydrat leistungssteigernd sei, dass nur wenige Sportler einen Vorteil davon hätten es einzunehmen und weil es Teil der natürlichen Nahrung sei.“* Allerdings stimmt das Argument, dass es wenige Untersuchungen gäbe, die eine leistungssteigernde Wirkung einer Supplementierung mit Kreatin-Monohydrat zeigen, so nicht, da in den letzten Jahrzehnten umfangreiche Untersuchungen zum Einfluss von Kreatin-Monohydrat auf den menschlichen Organismus - auch mit positiven Befunden - durchgeführt wurden [37, 39, 41].

Bei der Diskussion um eine eventuelle Dopingrelevanz von Kreatin-Monohydrat wird oft ein Argument verwendet, dass es 'gar nicht möglich sei' bei routinemäßigen Urintests zwischen exogenem und endogenem bzw. tierischem Kreatin zu unterscheiden [69]. Die bisherigen Empfehlungen, ab wann durch Analyse der Konzentration von Kreatin im Urin auf eine Einnahme von exogenem Kreatin-Monohydrat geschlossen werden kann, berücksichtigen einen *cut-off-level* von 1 mg/ml Kreatin im Urin. Bei Einnahme hoher Mengen von Kreatin-Monohydrat kann im Gegensatz zum Verzehr von großen Mengen an kreatinhaltigem Fleisch oder Fisch dieser Wert für einige Stunden kurz nach Einnahme überschritten werden [44].

## 2.3 Bicarbonat

Mit der historischen Bezeichnung Bicarbonat wird heute immer noch umgangssprachlich und in der Medizin bzw. Physiologie das Hydrogencarbonat-Ion ( $\text{HCO}_3^-$ ) bezeichnet<sup>1</sup>. Das Hydrogencarbonat-Ion bildet mit Alkali-, Erdalkali- und

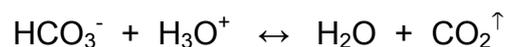
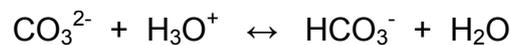
---

<sup>1</sup> Im Weiteren wird in dieser Arbeit auf Grund der immer noch verbreiteten historischen Bezeichnung Bicarbonat für das Hydrogencarbonat-Ion die Bezeichnung Bicarbonat verwendet.

einigen anderen zweiwertigen Metallen Salze, die als Bicarbonate bezeichnet werden. Der Name Bicarbonat stammt von der Tatsache, dass beim Calciumbicarbonat  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$  im Gegensatz zum  $\text{CaCO}_3$  beim Erhitzen zwei Äquivalente  $\text{CO}_2$  freigesetzt werden. Natriumbicarbonat ist ein weit verbreiteter Lebensmittelzusatzstoff (z.B. Back- und Brausepulver), als *Kaisernatron*<sup>®</sup> oder *Bullrichsalz*<sup>®</sup> wird Natriumbicarbonat als Antiacidum gegen säurebedingte Magenbeschwerden eingesetzt. Natriumbicarbonat wird technisch aus Kohlendioxid und Natriumcarbonat bzw. im ersten Schritt des Solvay-Verfahrens hergestellt. Die Quellen für technisches Natriumbicarbonat sind daher mineralisch.

### 2.3.1 Physiologie des Bicarbonats

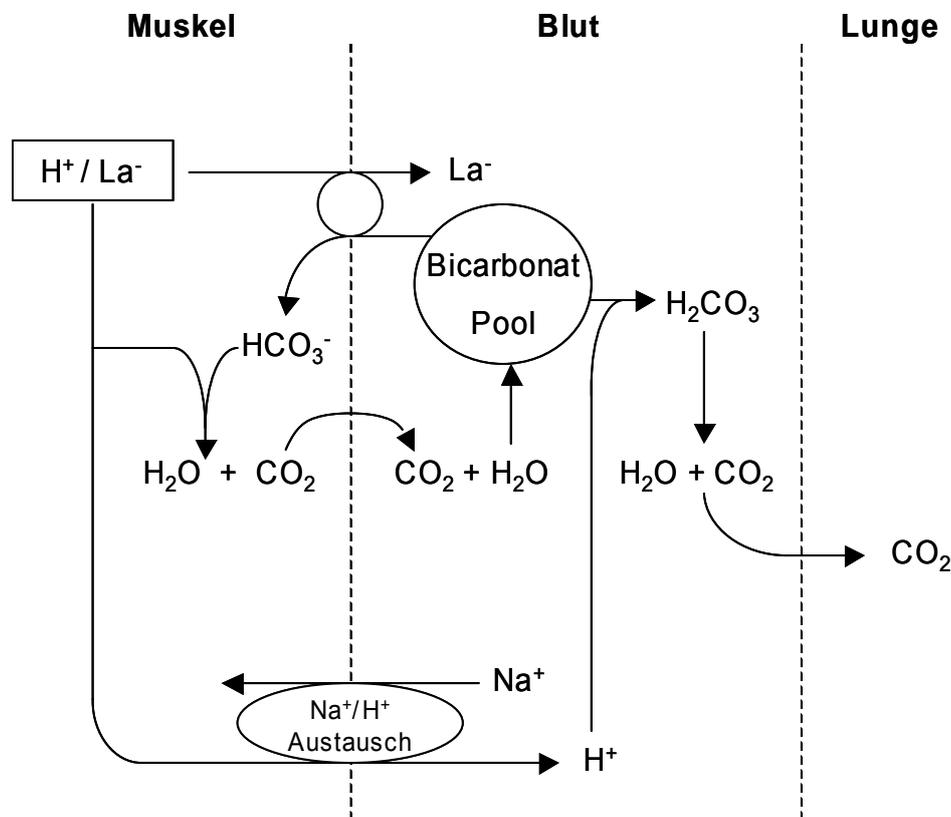
Im tierischen und menschlichen Organismus ist Bicarbonat ein wichtiger Bestandteil des komplexen Puffersystems im Muskel und Blut [17]. Durch metabolische Vorgänge entstandene Protonen und Laktat, die aus dem Muskel in das Blut transportiert werden können durch dieses Puffersystem und dabei auch vom Bicarbonat abgepuffert werden. Entstehendes  $\text{CO}_2$  wird über die Lunge abgeatmet.



Die Bicarbonat-Konzentration des Blutes ist stark pH-Wert-abhängig und wird in der medizinischen Diagnostik routinemäßig zur Erkennung von Störungen des Säure-Base-Haushaltes erfasst. Die Bildung des Bicarbonates erfolgt unter Wirkung des Enzyms Carboanhydrase, wobei aus Wasser und  $\text{CO}_2$  Bicarbonat entsteht. Bicarbonat ist zudem an der Bildung von Harnstoff beteiligt und wird so aus dem Körper entfernt. In einem dem Harnstoff-Zyklus vorgeschalteten Schritt entsteht aus Bicarbonat und Ammoniak Carbamat und in einem weiteren Schritt Carbomyl-Phosphat, welches in den Harnstoff-Zyklus eintritt (Abbildung 1).

Bicarbonat selbst wird im menschlichen Organismus erst ab einer Plasmakonzentration größer 26-28 mmol/L ausgeschieden, vorher wird es praktisch

komplett glomerulär rückfiltriert [70]. Die Bicarbonatausscheidung wird neben anderen Faktoren auch durch den  $\text{CO}_2$ -Partialdruck des arteriellen Blutes beeinflusst.



**Abb. 7:** Vereinfachte schematische Darstellung der Pufferfunktion von Bicarbonat im menschlichen Körper [17, 71]. Bicarbonat wirkt sowohl im Muskel als auch im Blut als Puffer. Im Muskel puffert Bicarbonat Protonen. Im Austausch gegen Lactat ( $\text{La}^-$ ) wird Bicarbonat aus dem Blut in den Muskel transportiert. Im Blut kann Bicarbonat sowohl Lactat abpuffern, als auch Protonen durch Bildung von  $\text{CO}_2$  abfangen. Überschüssiges  $\text{CO}_2$  wird in der Lunge abgeatmet.

### 2.3.2 Bicarbonat und Doping

Seit den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wird verstärkt über den Nutzen einer exogenen Bicarbonatgabe vor körperlicher Belastung zur Verbesserung der Pufferkapazität des Organismus diskutiert. Sowohl im Human- als auch im Pferdesport wurden diverse Untersuchungen durchgeführt, die eventuelle Leistungssteigerungen durch eine Bicarbonatgabe untersuchten [18-21].

Schon in den 80er Jahren wurde über die Dopingrelevanz einer Einnahme von Bicarbonat vor einem Wettkampf für den Humanbereich diskutiert [72]. Doch gilt die Einnahme von Bicarbonat nicht als Doping, zudem ist eine Aufnahme von größeren Mengen mit Beschwerden im gastro-intestinalen Bereich verbunden, die die Anwendung limitieren.

Im Pferdesport fällt die Gabe von Bicarbonat vor einem Rennen bei einigen Verbänden unter Doping. Im Pferderennsport wird Pferden vor dem Rennen entweder ein so genannter '*milkshake*' - eine Natriumbicarbonat-Lösung mit weiteren Inhaltsstoffen über eine transnasale Magensonde verabreicht, oder über eine Spritze den Pferden ein bicarbonathaltige Paste oral verabreicht. Üblicherweise werden 0,5 g Natriumbicarbonat pro kg Körpergewicht verwendet [73].

Um eine 'exzessive' Bicarbonatgabe vor einem Rennen zu belegen, wurde ein Grenzwert der Konzentration an Gesamt-CO<sub>2</sub> im Plasma (TCO<sub>2</sub>) von 36 mmol/L festgelegt, Konzentrationen oberhalb dieses Grenzwertes werden als Dopingverstoß bewertet [22]. Die Analyse erfolgt weltweit meistens mit Hilfe des Blutgasgerätes '*Beckmann EL-ISE Elektrolyt-Analyser*' oder vergleichbaren Geräten [22]. Über die Methode wird aber seit Einführung hinsichtlich der Messpräzision und den mangelhaft kontrollierten Untersuchungsbedingungen der Pferde kontrovers diskutiert. Die analytische Methode weist Schwächen auf, da bisher kein zertifiziertes Referenzmaterial oder eine weitere auf einem anderen chemischen Prinzip basierende Methode existiert [74]. Um dieses Problem zu lösen, wurde in den vergangenen Jahren versucht, durch Analyse der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Bicarbonats bzw. gelöstem CO<sub>2</sub> im Blut der Pferde eine exogene Gabe von Bicarbonat zu beweisen [74-76]. Da Natriumbicarbonat aus mineralischem CO<sub>2</sub> hergestellt wird, unterscheiden sich die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von technischem und endogenem Bicarbonat deutlich. Allerdings wurde nach der Gabe von Natriumbicarbonat an Pferde im Blut nur ein kurzfristiger und minimaler Anstieg der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte festgestellt [74-76].

## 2.4 Isotopenverhältnismassenspektrometrie (IRMS)

Die Isotopenverhältnismassenspektrometrie entstand gegen Anfang des 20. Jahrhunderts mit den massenspektrometrischen Arbeiten und der Entdeckung der Neon-Isotope  $^{20}\text{Ne}$  und  $^{22}\text{Ne}$  durch den Nobelpreisträger *Sir J. J. Thomson*. Bis Mitte der 30er Jahre des 20. Jahrhunderts wurden die Massenspektrometer weiterentwickelt, weitere Isotope entdeckt und die theoretischen Grundlagen der Isotope beschrieben.

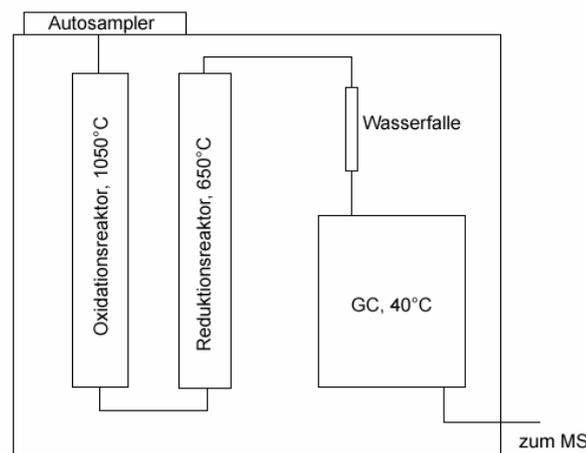
Nach 1940 spricht man von einer 'zweiten Generation' von Isotopenverhältnismassenspektrometern [77] und in den folgenden Jahren wurden technische Veränderungen an den Geräten vorgenommen sowie Peripheriegeräte mit dem Massenspektrometer gekoppelt. 1957 wurde durch *Holmes* und *Morrell* zum ersten Mal eine chromatographische Säule mit einem Isotopenverhältnismassenspektrometer gekoppelt. In der Folgezeit wurden sowohl isotopisch markierte Verbindungen als auch die natürlichen Isotopenverhältnisse in verschiedensten Bereichen der Wissenschaften untersucht. Mitte der siebziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurde erstmalig von der Kombination einer online Verbrennungsanalyse gaschromatographisch getrennter Verbindungen zur Erzeugung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{N}_2$  zur Isotopenanalyse in einem *single collector* Massenspektrometer berichtet [78, 79]. Doch dauerte es bis zum Anfang der 90er Jahre bis großflächigere Anwendungen der IRMS durch kommerziell angebotene Geräte möglich wurden. In Folge der verbesserten Analysetechnik wurde eine Vielzahl von Applikationen im bio- und geochemischen Umfeld, bei der Herkunfts- und Authentizitätsanalyse sowie bei der Klimauntersuchung entwickelt.

### 2.4.1 EA-IRMS

Die als Continuous-Flow-IRMS (CF-IRMS) bezeichnete Technik benutzt einen durchgehenden Trägergasstrom, um die Probe in die Ionenquelle zu transportieren. Hierzu wird auf unterschiedliche Weise die Probe in den Gasstrom eingebracht. Entweder ist das Massenspektrometer an einen Gaschromatographen gekoppelt, der die von einem Verbrennungsprozess oder einer Injektion stammenden Gase  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_2$  (und  $\text{H}_2\text{O}$ ) chromatographisch auftrennt (*BSIA*, Bulk Sample Isotope

Analysis), oder ein Substanzgemisch wird zuerst chromatographisch getrennt und dann über einen Oxidations- oder Reduktionsreaktor geschickt und anschließend in die Ionenquelle überführt (CSIA, Compound Specific Isotope Analysis; GC-C-IRMS Gaschromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry). Im Folgenden wird die erste Methode, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, näher vorgestellt.

Bei der BSIA, wo zuerst die Probe verbrannt und anschließend chromatographisch aufgetrennt wird, erhält man die (Misch-) Isotopensignatur der Verbrennungsgase der gesamten Probe und damit eventuell vieler verschiedener Substanzen. Das Hauptkriterium für BSIA-geeignete Proben ist, dass die Probe bei der Oxidationstemperatur von 1050 °C komplett verbrennt. Bei dieser Temperatur stehen die Isotope der verschiedenen Elemente im thermischen Gleichgewicht [80].

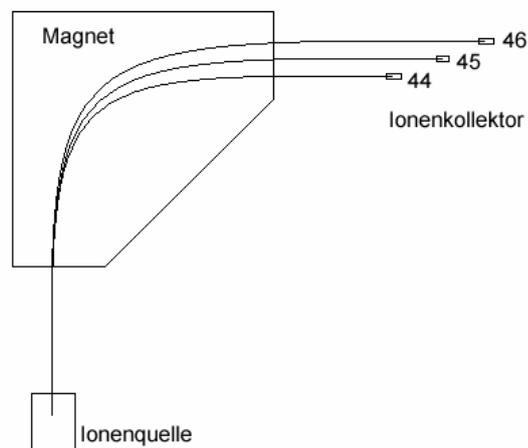


**Abb. 8:** Schematischer Aufbau eines Elementaranalysators.

Die in Zinnkapseln eingewogene Probe wird in einem Elementaranalysator, der einen mit  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  und  $\text{WoO}$  gefüllten Oxidationsreaktor enthält, bei 1050 °C verbrannt. Der Gasstrom passiert einen dahinter geschalteten Reduktionsreaktor, der elementares  $\text{Cu}$  enthält. Dort reagiert überschüssiges  $\text{O}_2$  ab und  $\text{NO}_x$  wird zu  $\text{N}_2$  reduziert. Das entstehende Reaktionswasser wird mit Hilfe einer aus  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  bestehenden Wasserfalle entfernt und die Reaktionsgase  $\text{N}_2$  und  $\text{CO}_2$  anschließend über eine gepackte GC-Säule chromatographisch getrennt.

Der durchschnittliche Trägergasfluss in einem Elementaranalysator liegt zwischen 80 und 120 ml pro Minute, der Gasfluss in das Massenspektrometer über eine typische *open-split*-Verbindung liegt aber nur bei 0,5 ml pro Minute. Da die im

Elementaranalysator verbrannte Menge an Substanz zu groß ist, um komplett im Massenspektrometer ionisiert zu werden, muss der Analyt ohne Isotopenfraktionierung verdünnt werden. Zudem enthalten biologische Proben häufig einen höheren Anteil an Kohlenstoff im Verhältnis zum Stickstoff, so dass im Verlauf einer Analyse häufig selektiv das  $\text{CO}_2$  zusätzlich verdünnt werden muss. Aus diesen Gründen ist zwischen Elementaranalysator und Massenspektrometer eine Verdünnungs- und *open-split*-Einheit eingebaut. Ihre Aufgabe ist es, den Analyten zu verdünnen, und den Fluss des den Elementaranalysator verlassenden Gases auf 0,5 ml pro Minute zu verringern. Zudem können in dieser Einheit Referenzgase mit bekanntem Isotopenverhältnis zugeschaltet werden, gegen die die Isotopenverhältnisse der Proben berechnet werden [81]. Die heute weit verbreiteten Isotopenverhältnismassenspektrometer besitzen eine Ionenquelle, in der die Gasmoleküle in einem Elektronen-Emissionsstrom ionisiert werden. Die Ionen werden anschließend durch ein angelegtes elektrisches Feld aus der Quelle in ein Flugrohr beschleunigt.



**Abb. 9:** Schematischer Aufbau eines Isotopenmassenspektrometers in  $\text{CO}_2$ -Konfiguration.

Die Auftrennung der verschiedenen Massen geschieht mit Hilfe eines Magneten, in dessen Feld die Ionen auf Grund ihrer unterschiedlichen Massen unterschiedlich abgelenkt werden. Schließlich treffen die Ionen am Ende des Flugrohres auf einen Ionenkollektor, der die Anzahl der verschiedenen Ionen registriert.

Die Isotopenverhältnisse werden in Promille (‰) ausgedrückt. Dabei ist das Isotopenverhältnis definiert als:

$$\delta^N X = (R_{\text{Probe}}/R_{\text{Standard}} - 1) \cdot 10^3$$

Dabei stellt N das schwerere Isotop des Elements X dar und R ist das Verhältnis der Häufigkeiten des schweren zum leichten Isotop (z.B.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ). Es werden jeweils die Häufigkeitsverteilungen einer Probe und eines Standards miteinander verglichen.

Bei der Bestimmung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse müssen die gemessenen Massenverhältnisse noch für Ionen gleicher Massen korrigiert werden. So beträgt der Anteil des Beitrages von  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$  für die Masse 45 ungefähr 7 % der  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$  Isotopenhäufigkeit. Um die Kohlenstoff-Isotopenwerte zu korrigieren wird das Massenverhältnis 46/44 und damit der Beitrag von  $^{18}\text{O}$  bestimmt und die Isotopenwerte durch die Software des Massenspektrometers mit Hilfe von Algorithmen automatisch korrigiert [82].

## 2.4.2 Standards und Vergleichsmaterialien für die IRMS

Um die IRMS-Messungen verschiedener Laboratorien miteinander vergleichen zu können, gibt die *International Atomic Energy Agency* (IAEA) Kalibrierungs- und Vergleichsmaterialien heraus. Diese Materialien bestehen aus natürlichen Verbindungen sowie aus synthetisch hergestellten Substanzen mit den gewünschten Eigenschaften.

Primäre Referenzstandards sind natürliche oder virtuelle Materialien, in denen die relativen Verhältnisse der stabilen Isotope in natürlichen Verbindungen in Promille ausgedrückt werden. Der verwendete primäre Referenzstandard für Kohlenstoff ist PDB (Pee Dee Belemnite) und hat  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = 0 \text{ ‰}$  per Definition [83]. PDB ist ein Calciumcarbonat des Cretaceous Belemnite von den Peedee Formationen in South Carolina. Die Isotopenverteilungen in PDB sind ähnlich denen des in den Ozeanen gelösten Bicarbonats, das wiederum die Isotopenzusammensetzung des atmosphärischen  $\text{CO}_2$  regelt. Atmosphärisches  $\text{CO}_2$  und ozeanisches Bicarbonat stellen das Ursprungsmaterial und die Senke für die meisten Prozesse des biogeochemischen Kohlenstoffkreislaufes dar. Da der primäre Referenzstandard PDB aber seit langem verbraucht ist, wurde NBS-19, ein Calcit, indirekt gegen PDB kalibriert. Nach internationaler Übereinkunft wurde die Isotopenzusammensetzung des NBS-19 gegen einen virtuellen VPDB (Vienna-PDB), der gleich PDB gesetzt wurde, auf  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = 1,95 \text{ ‰}$  festgelegt [84].

Für Stickstoff ist atmosphärischer Stickstoff der primäre Referenzstandard und wird ebenfalls per Definition  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} = 0 \text{ ‰}$  gesetzt. Atmosphärischer Stickstoff hat eine sehr homogene Verteilung über den Erdball und eignet sich sehr gut als primärer Referenzstandard [85]. Die Atmosphäre ist das größte Reservoir für Stickstoff und gleichzeitig die Hauptquelle und -senke für natürliche und durch den Menschen gesteuerte Prozesse, an denen Stickstoff beteiligt ist.

Für den Routinebetrieb stellt die IAEA Vergleichsmaterialien zur Verfügung, die gegen die primären oder die Kalibrierungsstandards gemessen wurden. Für die Bestimmung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse stehen unter anderem IAEA-CH-7 (Polyethylen) und IAEA-CH-6 (Zucker) zur Verfügung. Für die Bestimmung der Stickstoffisotopenverhältnisse stehen die Vergleichsmaterialien IAEA-N1 und IAEA-N2 (beide Ammoniumsulfat) zur Verfügung [86].

**Tab. 3:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete IAEA-Vergleichsmaterialien für die Bestimmung von Kohlenstoff- und Stickstoffisotopenverhältnissen [86].

Name	Substanz	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]
IAEA-CH-6	Zucker	-10,4	-
IAEA-CH-7	Polyethylen	-31,8	-
IAEA-N-1	Ammoniumsulfat	-	0,4
IAEA-N-2	Ammoniumsulfat	-	20,3

Alle Weiteren im Rahmen dieser Arbeit aufgeführten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte sind relativ zu VPDB und die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte relativ zu Luft (AIR) ausgedrückt.

### 2.4.3 Anwendung der IRMS in der Dopinganalytik

Seit Mitte der 90er Jahre (erstmalig 1996 bei den olympischen Spielen in Atlanta) wird die IRMS in der Dopinganalytik angewendet. Häufigste und inzwischen routinemäßige Anwendung ist die Analyse urinärer Steroide bzw. ihrer Vorläufer und Metaboliten. Testosteron und Analoga stehen seit 1976 auf der Dopingliste des IOC bzw. seit 2004 der WADA und werden seitdem mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) im Urin detektiert [87, 88]. Allgemein gilt ein Testosteron/Epitestosteron-Quotient (T/E-Quotient) von mehr als vier zu eins als ein

auffälliger Befund [89]. Da es sich bei Testosteron und Epitestosteron um endogene Steroide handelt, die der Körper auch selbst produziert, kann die IRMS Hinweise auf eine exogene Applikation von halbsynthetischen Steroiden liefern [6]. Da die Steroidhormone aus pflanzlichen Substanzen isoliert werden, unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Kohlenstoffisotopenverhältnisse deutlich von körpereigenen Steroidhormonen. Bei der Routineanalytik werden daher unabhängige endogene Referenzen und die eventuell mit dem Urin ausgeschiedene applizierte Substanz oder einer oder mehrere ihrer Metaboliten hinsichtlich der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte verglichen. Bei Urinproben, bei denen sowohl der T/E-Quotient auffällig hoch ist und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte eine exogene Quelle belegen, wird von einem Verstoß gegen die Dopingregeln gesprochen [89].

#### **2.4.4 Anwendung der IRMS in der Authentizitäts- und Herkunftskontrolle**

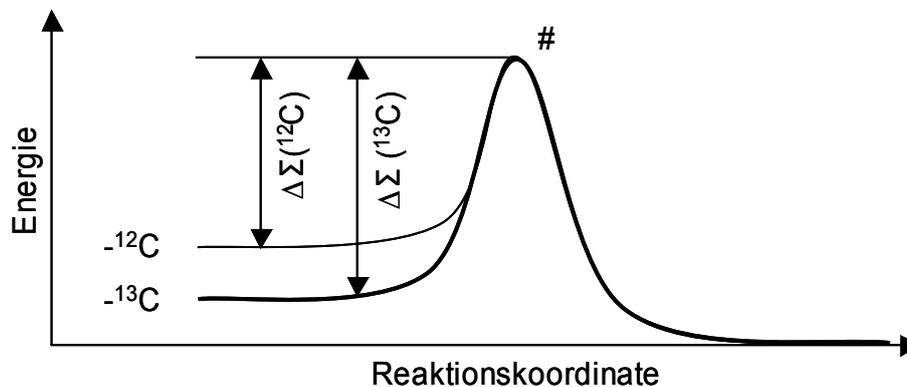
Natürliche Produkte und Lebensmittel weisen auf Grund von verschiedenen Umwelteinflüssen bei Aufzucht und Aufwuchs, aber auch durch verschiedene Synthesewege, Unterschiede in den Zusammensetzungen der stabilen Isotope auf [90]. Die Möglichkeiten von diesen Unterschieden auf die Authentizität und Herkunft der Produkte zu schließen, sind vielfach. So bestehen Möglichkeiten zur Bestimmung gesamter Isotopenverhältnisse des ganzen Produktes als auch zur Bestimmung von einzelnen Isotopenmustern innerhalb von Substanzgruppen [91].

Typische Anwendungen in der Authentizitäts- oder Herkunftskontrolle sind z.B. die Identifizierung von Zugaben von Zuckerüben- oder Rohrzucker in Fruchtsäften [90, 92], die geografische Herkunft von Rindfleisch [93], Milch und Käse [94] oder auch Gemüse [95] oder der Anteil von Mais in Bieren [96]. Neben natürlichen Produkten können auch voll- oder halbsynthetische Erzeugnisse hinsichtlich ihrer Herkunft unterschieden werden. So kann z.B. die Herkunft von Medikamenten wie Acetylsalicylsäure aus verschiedenen Ländern [97] oder die Herkunft von Kokain oder Heroin bestimmt werden [4, 98]. Die Analysemethoden zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse für die Authentizitäts- und Herkunftskontrolle beinhalten das komplette Spektrum der IRMS-Instrumentierung, so unter anderem auch GC-C-IRMS, EA-IRMS und LC-IRMS [91, 97]

## 2.5 Isotopenfraktionierung

Der Grund für die verschiedenen Zusammensetzungen der stabilen Isotope in der Natur liegt an dem unterschiedlichen Reaktionsverhalten der verschiedenen schweren Isotope. Aufgrund der erhöhten Masse im Atomkern der schwereren Isotope reagieren diese bei Reaktionen langsamer als die leichten Atome. Der Grund für dieses Verhalten liegt in den unterschiedlichen benötigten Aktivierungsenergien.

Die höhere Masse der Atomkerne des Moleküls mit dem schweren Isotop bedingt, dass die Nullpunktenergie des Moleküls geringer ist und bei einer Reaktion mehr Energie zur Erreichung des Übergangszustandes, an der diese Bindung beteiligt ist, benötigt wird.



**Abb. 10:** Schematische Darstellung der Nullpunktenergien und benötigten Aktivierungsenergien  $\Delta\Sigma$  bei einer chemischen Reaktion für verschiedene Isotope. Auf Grund der höheren Masse liegt die Nullpunktenergie des schwereren Isotops niedriger.

Diese Unterschiede im Reaktionsverhalten führen dazu, dass sich für verschiedene Isotope unterschiedlichen Stoffflüsse einstellen oder bei chemischen Gleichgewichten die Isotope in unterschiedlichen Anteilen disproportionieren. In biologischen Systemen mit einer Vielzahl von Zyklen und Reaktionsabfolgen finden sich daher oft in unterschiedlichen Kompartimenten unterschiedliche Zusammensetzungen der Isotope.

Die in der Bio-Geosphäre beobachteten Differenzen in der relativen Häufigkeit von Elementen, die in zwei verschiedenen Molekülarten oder verschiedenen 'Pools' derselben Molekülart auftauchen, nennt man Isotopenfraktionierung. Dabei hängt die Isotopenfraktionierung von dem Ausmaß der Reaktion ab. Liegt die Reaktionsausbeute bei 100 % so bedeutet dies, dass alle Atome der

Ausgangssubstanzen in Endprodukte übergegangen sind und von daher kein Isotopeneffekt messbar ist. Solange Reaktionen aber limitiert sind und nicht vollständig ablaufen, kann es zu messbaren Isotopeneffekten kommen [99].

### 2.5.1 Natürliche Variation der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in der Biosphäre

Pflanzen sind im Vergleich zum Kohlendioxid der Atmosphäre auf Grund sowohl von enzymatischen als auch physikalischen Prozessen, die den leichten Kohlenstoff gegenüber dem schweren Kohlenstoff bevorzugen, angereichert an  $^{13}\text{C}$  [100]. Auf Grund von verschiedenen Photosynthesewegen, in deren Verlauf das atmosphärische Kohlendioxid in Moleküle eingebaut wird, gibt es Unterschiede in den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des Pflanzenmaterials, die sich auch in höheren Stufen der Nahrungskette wieder finden.

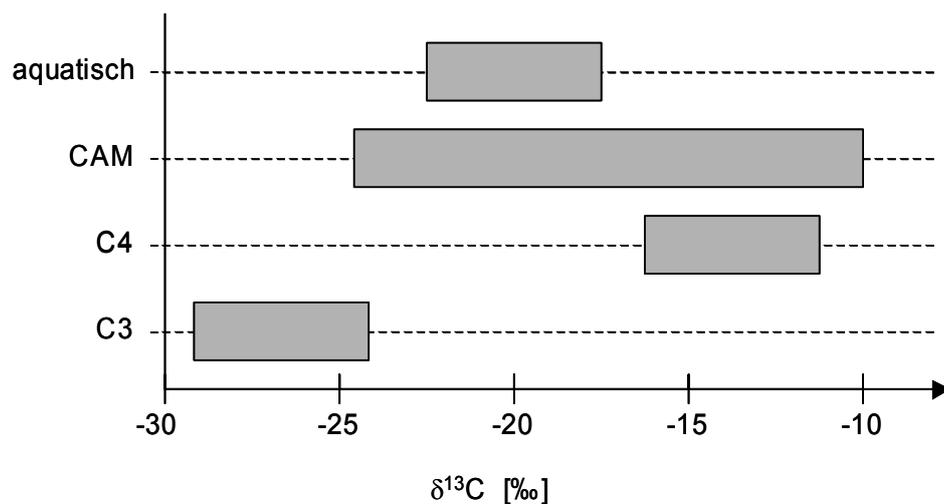
In den gemäßigten Breiten herrscht der C3- (*Calvin*-Zyklus) gegenüber dem C4- (*Hatch-Slack*-Zyklus) oder CAM- (Crassulacean Acid Metabolism) Photosyntheseweg vor. Beim C3-Photosyntheseweg hängen die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte vom Gleichgewicht zwischen Diffusion des  $\text{CO}_2$  ins Pflanzeninnere und dem enzymatischen Bedarfs an  $\text{CO}_2$  ab. Im Verlauf des Einbaus von  $\text{CO}_2$  in das Pflanzenmaterial kommt es so zu einer Anreicherung an leichtem Kohlenstoff in der Pflanze und mittlere  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für C3-Pflanzen liegen um  $-27\text{‰}$  [100]. Zu den C3-Pflanzen, die auch für die weitere Nahrungskette von Bedeutung sind, zählen unter anderem die Getreidearten sowie Reis, Kartoffeln und Zuckerrüben.

Die Zusammensetzung der Kohlenstoffisotope von C4-Pflanzen ist gänzlich anders als die von C3-Pflanzen, da das bei der  $\text{CO}_2$ -Fixierung beteiligte Enzym ein anderes ist und die Reaktion eine andere Isotopenfraktionierung aufweist. Daraus ergeben sich mittlere  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für C4-Pflanzen von um  $-14\text{‰}$  [100]. Wichtig für die Nahrungskette sind die in tropischen und auch subtropischen, warmen und sonnigen Gebieten wachsenden C4-Pflanzen wie Mais, Hirse und Zuckerrohr.

CAM-Pflanzen weisen eine besonders an Trockengebiete angepasste und zeitlich getrennte  $\text{CO}_2$ -Fixierung und Photosynthese auf. Es gibt Unterschiede zwischen reinen CAM-Pflanzen, deren Photosyntheseweg den C4-Pflanzen ähnelt und CAM-Pflanzen, die bei günstigen Umgebungsbedingungen den C3-Photosyntheseweg einschlagen können. So variieren auch die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte deutlich. Für reine CAM-

Pflanzen liegen sie um  $-11\text{‰}$  und reichen für C3-synthesefähige CAM-Spezies bis zu den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten für reine C3-Pflanzen. Eine für die (menschliche) Ernährung wichtige CAM-Pflanze ist die Ananas.

Aquatische Nahrungsquellen stellen eine weitere Population dar, die sich von terrestrischen Nahrungsquellen deutlich unterscheiden. So liegen die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für aquatische Tiere um  $-20\text{‰}$  und damit zwischen denen der C3- und C4-Pflanzen [101].



**Abb. 11:** Schematische Darstellung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Bereiche für C3-, C4-, und CAM-Pflanzen sowie für aquatische Organismen [100, 101].

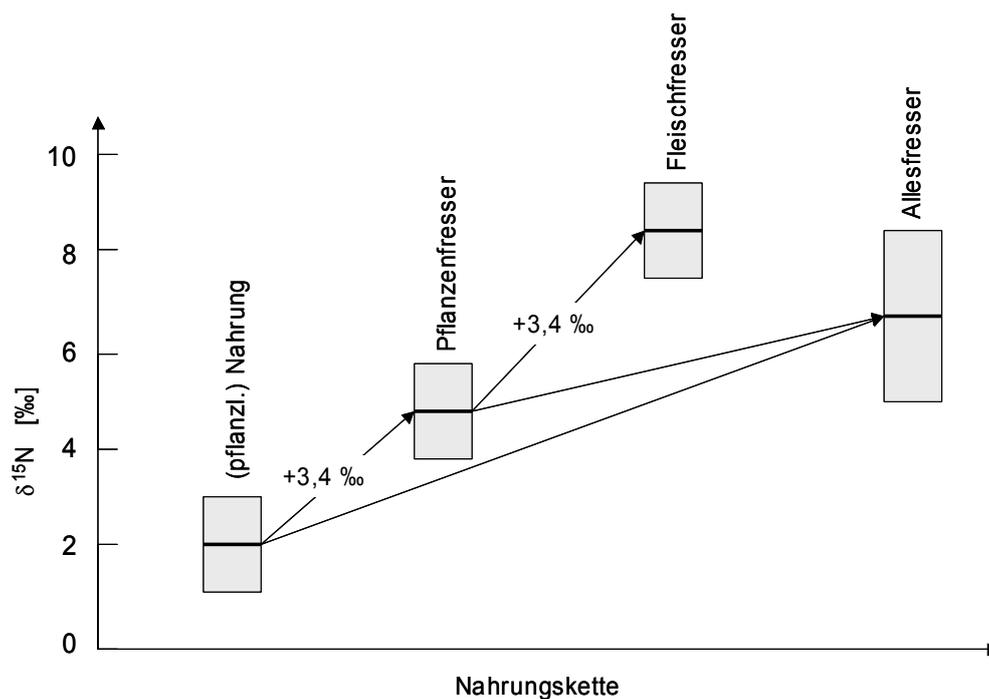
Die Zusammensetzung der Kohlenstoffisotope von Pflanzen lässt sich auch in der Nahrungskette bei den Konsumenten wieder finden. Da das Pflanzenmaterial in den Körper des Konsumenten eingebaut wird, spiegelt sich so die primäre Nahrungsquelle wider. So wie sich das Vorkommen von C3-, C4- und CAM-Pflanzen auf Grund ihrer unterschiedlichen Anpassung geografisch unterscheiden lässt, lassen sich auch durch Analyse der Kohlenstoffisotopie von Gewebe Aussagen über die Zusammensetzung der Nahrung bei Mensch und Tier machen [102-104].

## 2.5.2 Natürliche Variation der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte in der Biosphäre

In der Natur kommt es zu einer trophischen (trophe, griechisch = Ernährung) Verschiebung der Stickstoffisotopie entlang der Nahrungskette. Je höher das

Individuum in der Nahrungskette steht, desto isotopisch schwerer (angereichert an  $^{15}\text{N}$ ) sind auch die Isotopenwerte für den Stickstoff im Körper.

Pflanzen, die am Beginn der Nahrungskette stehen, lassen sich unterteilen in symbiotische  $\text{N}_2$ -Fixierer (Fixierung von atmosphärischem  $\text{N}_2$  durch Mikroorganismen) und Pflanzen, deren Stickstofffixierung auf Bodenstickstoff basiert. Diese beiden Arten unterscheiden sich in ihren  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten um ca. 4 ‰ [105], wobei symbiotische  $\text{N}_2$ -Fixierer mit  $\delta^{15}\text{N}$  von um 0 ‰ die Stickstoffisotopie von atmosphärischem  $\text{N}_2$  widerspiegeln. Bodenstickstoff-fixierende Pflanzen repräsentieren den von ihnen aus dem Boden aufgenommenen Stickstoff und weisen gewöhnlicherweise  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte um 4 ‰ auf. Für Pflanzen, die in der modernen Landwirtschaft angebaut werden, können diese Werte aber stark schwanken und hängen von der Art der Düngung ab. So werden  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Gemüse zwischen 0 und 10 ‰ gefunden [95].



**Abb. 12:** Schematische Darstellung der trophischen Verschiebung entlang der Nahrungskette. Mit jeder Stufe der Nahrungskette steigen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Organismus um  $\sim 3,4$  ‰.

Bei Aufnahme und Metabolisierung von organisch gebundenem Nahrungsstickstoff kommt es im menschlichen oder tierischen Organismus zu einer Isotopenfraktionierung, die im Mittel zu 3,4 ‰ bestimmt wurde [106]. So finden sich im Tierreich deutliche Unterschiede in den Stickstoffisotopenverhältnissen des Gewebes von Pflanzen-, Fleisch- und Allesfressern. Beim Menschen kann ebenfalls

zwischen Veganern, Ovo-Lacto-Vegetariern und Konsumenten gemischter Kost (Omnivoren) unterschieden werden.

Als Grund für die Isotopenfraktionierung im Organismus wird eine Diskriminierung gegenüber dem schweren Stickstoff bei der Transaminierung bzw. der Desaminierung von Aminosäuren angenommen. Der leichte Stickstoff wird in Form von Harnstoff ausgeschieden, während der schwere Stickstoff im Körper verbleibt und unter anderem in Struktur-Proteine wie das Keratin im Haar eingebaut wird [99, 107, 108].

Körperliche Zustände, wie Katabolismus oder Anabolismus, die sich in vermehrtem Abbau oder Aufbau von körpereigenen Proteinen äußern, spiegeln sich in den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten des Organismus wider. So führen Hungerzustände (Katabolismus) zu einem Anstieg des  $\delta^{15}\text{N}$ -Wertes im Haar, wogegen Anabolismus zu einer Abnahme des  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte führt [13, 14]. Wird körpereigener Stickstoff, der um eine trophische Stufe höher als der Nahrungsstickstoff steht, vermehrt in den Metabolismus eingeschleust, unterliegt er einer erneuten Isotopenfraktionierung und das Ausmaß der trophischen Verschiebung zwischen Nahrung und Organismus vergrößert sich noch mehr.

### 3 Problemstellung

Die drei Hauptbestandteile von menschlichem Urin, Harnstoff, Kreatinin/Kreatin und Bicarbonat sind für die Sportwissenschaft und Dopinganalytik interessante Substanzen. Die Messung der natürlichen Verhältnisse der stabilen Isotope  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  dieser Substanzen könnte weitere Informationen über physiologische Vorgänge und die Herkunft der Substanzen, z.B. ob eine exo- oder endogene Quelle vorliegt, liefern. Da diese Substanzen bisher noch nicht aus dem menschlichen Urin für die IRMS isoliert worden sind, bestand die Aufgabe dieser Arbeit darin, neue Methoden für die Isolierung für die EA-IRMS zu entwickeln (Kreatin/Kreatinin und Bicarbonat) oder die Überprüfung bestehender Methoden aus dem Tierversuch für den menschlichen Urin (Harnstoff).

Da alle drei Substanzen nicht der GC-C-IRMS zugänglich sind, mussten neue Methoden für eine Isolierung für die EA-IRMS und deren speziellen Anforderung gefunden werden. Die EA-IRMS ist eine Anwendung für die Analyse der Isotopenverhältnisse von so genannten '*bulk samples*', d.h. sie liefert einen Summenwert der Gesamtheit der betreffenden stabilen Isotope in einer Probe, unabhängig von ihrer Verteilung in verschiedenen Substanzen.

Um eine einzelne Substanz mit Hilfe der EA-IRMS zu messen, muss diese, falls erforderlich, im Vorfeld der Analyse aus einer Matrix isoliert und aufgereinigt werden. Zudem benötigt man für eine Analyse per EA-IRMS eine relativ große Substanzmenge von ca. 100 µg Kohlenstoff oder Stickstoff pro Probe.

Die Hauptbestandteile des Urins: Harnstoff, Kreatinin/Kreatin und Bicarbonat bieten sich auf Grund der hohen täglich ausgeschiedenen Menge für eine Isolierung für die EA-IRMS an. Bei der Entwicklung einer Methode für die IRMS muss darauf geachtet werden, dass während der Aufarbeitung weder große Verunreinigungen von Substanzen mit deutlich unterschiedlichen Isotopenverhältnissen als die Zielsubstanz verschleppt werden, noch dass Isotopenfraktionierungen auftreten, die die Isotopensignatur der isolierten Substanz verändern. Zudem muss versucht werden, eine einfache, schnelle und billige Methode zu entwickeln, um eine eventuelle routinemäßige Verwendung der Methode in der sportwissenschaftlichen Forschung oder der Dopinganalytik zu ermöglichen.

Neben der Methodenentwicklung sollen im Rahmen dieser Arbeit erste experimentell ermittelte Isotopenverhältnisse für die betreffenden Substanzen für den

menschlichen Organismus geliefert werden sowie Ansätze zu einer Interpretation und einer weiteren Forschungshypothese geliefert werden.

Im Fall des Harnstoffes ist es von Interesse, inwiefern physiologische Prozesse, insbesondere bei körperlicher Belastung durch die Analyse der Stickstoffisotopie des Harnstoffes im Urin erklärt werden könnten. Für Kreatinin bzw. Kreatin stellt sich die Frage, ob man mit Hilfe der Analyse der stabilen Isotope zwischen einer 'natürlichen' Einnahme von Kreatin mit der Nahrung oder einer Supplementierung mit synthetischem Kreatin-Monohydrat unterscheiden kann. Für Bicarbonat stellt sich eine ähnlich Frage, inwiefern eine exogene Bicarbonatgabe durch veränderte Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffes im Urin festzustellen ist. Dies sowohl im Human- als auch im Pferdeurin.

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Isolierung von Harnstoff aus dem Urin für die IRMS

Die Isolierung von Harnstoff aus dem Urin für die Bestimmung des  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisses beruht auf der gravimetrischen Bestimmung von Harnstoff mit Hilfe der quantitativen Fällung aus wässrigen Lösungen durch Xanthydroly [109,110]. Für die Anforderungen der EA-IRMS wurde die Methode modifiziert [111].

250  $\mu\text{l}$  Urin werden mit 375  $\mu\text{l}$  Eisessig und 375  $\mu\text{l}$  10 %iger Xanthydroly-Lösung (Xanthen-9-ol) in Methanol (w/w) versetzt und 24 Stunden bei 6 °C stehengelassen. Der Niederschlag wird abzentrifugiert (5 min bei 1800 UpM), dreimal mit 2 ml Methanol/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) gewaschen, und anschließend im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Der Niederschlag kann direkt per EA-IRMS gemessen werden.

### 4.2 Kreatin und Kreatinin

#### 4.2.1 Untersuchung von Nahrungsergänzungsmitteln

Viele Nahrungsergänzungsmittel enthalten Kreatin-Monohydrat oder werden als reine Kreatin-Monohydrate beworben. Um die Isotopenverhältnisse dieser synthetischen Kreatin-Monohydrate per EA-IRMS zu bestimmen, müssen sie von eventuellen Begleitsubstanzen abgetrennt werden. Auch Nahrungsergänzungsmittel, die als reine Kreatin-Monohydrate gekennzeichnet sind, enthalten häufig Hilfsstoffe wie Stearat oder andere Füllstoffe. Nach der Überprüfung der Reinheit der Kreatin-Monohydrate per HPLC bzw. der Abtrennung anderer Substanzen wurden die Nahrungsergänzungsmittel per EA-IRMS gemessen.

Als erster Schritt wird ungefähr 1 mg des 'reinen' Kreatin-Monohydrates mit der erforderlichen Menge bidestilliertem Wasser in Lösung gebracht, sodass eine ungefähre Konzentration von 1 mg/ml erreicht wird. Anschließend wird die Probe 30 Minuten auf 80 °C im Heizblock erwärmt und schließlich wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Die unlöslichen Teile werden abzentrifugiert oder falls sie auf der

Oberfläche der Probe schwimmen mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Anschließend wird die Probe unter Vakuum am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.

#### 4.2.2 Isolierung von Kreatinin per Kationenaustauschchromatographie

Das im Urin gelöste Kreatin und/oder Kreatinin wird mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie (CEC = Cation Exchange Chromatographie) voneinander und von den restlichen Bestandteilen des Urins getrennt. Hierzu werden 1 bis 2 ml des Urins (je nach Dichte und Konzentration des Kreatinins) mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH = 4,8 auf 100 ml verdünnt und so auf eine Ionenstärke von ca.  $I = 0,01 \text{ mol/L}$  eingestellt. Eine Glassäule mit einem Volumen von 100 ml und einem Innendurchmesser von 1 cm wird mit 2 ml eines aktivierten Kationenaustauschers, *Diaion*<sup>®</sup> PK228 der Firma *Supelco*, einem Polystyren-Harz mit Sulfonsäuregruppen als funktionelle Gruppen in  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Form, beschickt. Anschließend werden die Lösungen mit einem Fluss von ungefähr 1 ml/min über den Kationenaustauscher geschickt, der Durchlauf und das Waschwasser werden aufgefangen.

Aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten zum Ionenaustauscher sowohl von Kreatin und Kreatinin, als auch der weiteren Bestandteile der Lösungen, bindet bei der gegebenen Ionenstärke und pH-Wert nur Kreatinin selektiv an den Ionenaustauscher. Kreatin und die weiteren Bestandteile werden nicht oder nur geringfügig absorbiert und finden sich im Durchlauf bzw. im Waschwasser wieder.

Anschließend wird das an dem Ionenaustauscher gebundene Kreatinin desorbiert. Hierzu werden drei 1-ml-Fractionen einer gesättigten Bariumhydroxid-Lösung (Barytwasser) auf den Ionenaustauscher gegeben und jeweils 10 Minuten stehen gelassen. Der Gehalt an Kreatinin im Eluat kann mit Hilfe der HPLC überprüft werden. Hierzu werden von jeder Fraktion 20  $\mu\text{l}$  entnommen und mit Phosphatpuffer auf 1 ml verdünnt. Der Rest der drei Fractionen wird zusammengegeben. Da die nicht am Kationenaustauscher ausgetauschten  $\text{Ba}^{2+}$ -Ionen bei der späteren Verbrennung im Elementaranalysator stören, bzw. den Oxidationsreaktor beschädigen, wird das Eluat mit 100  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt, das ausgefallene  $\text{BaSO}_4$  wird abzentrifugiert und der Überstand am Rotationsverdampfer eingengt. Der

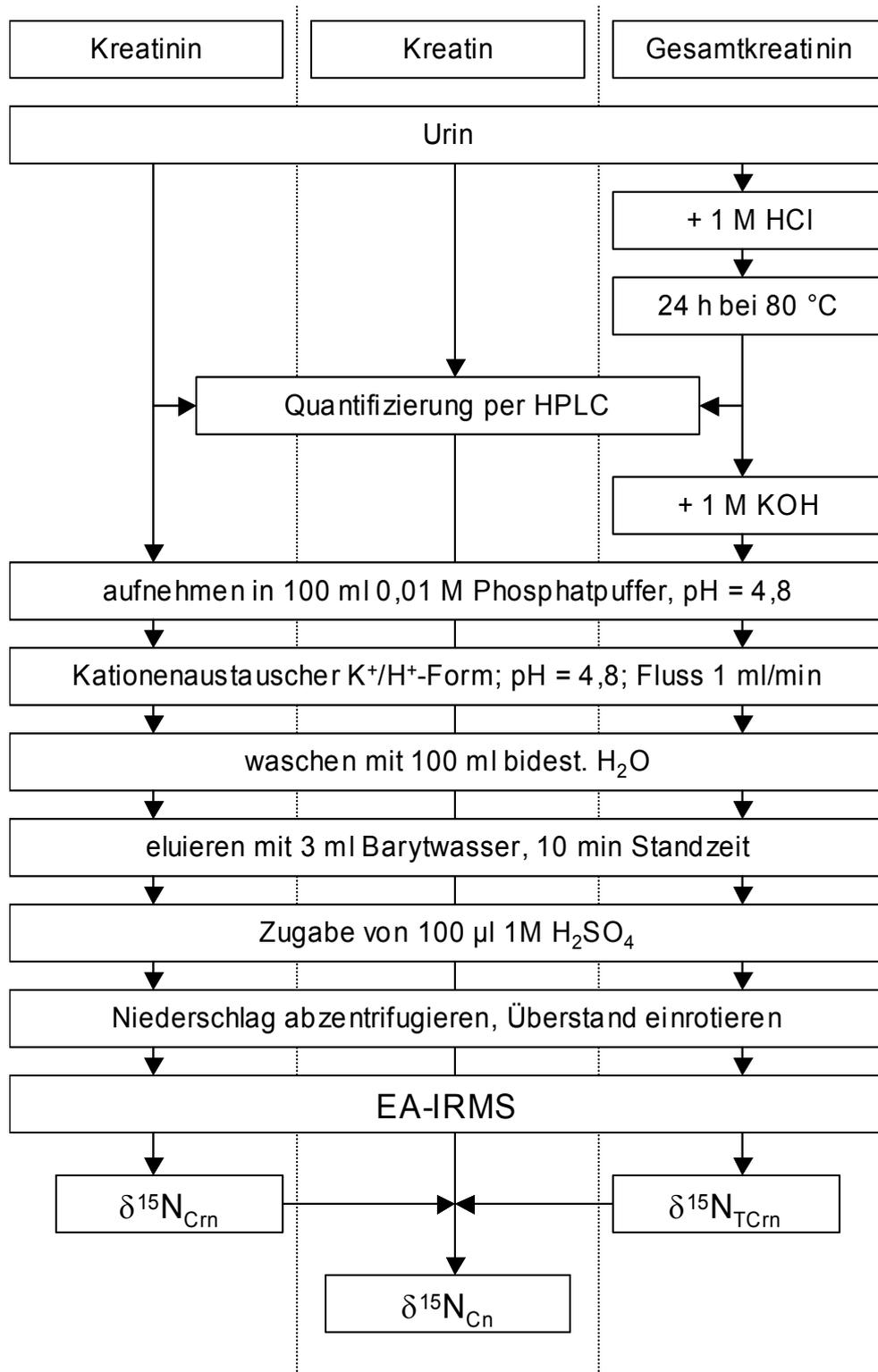
Rückstand wird anschließend über Nacht im Exsikkator über  $P_2O_5$  getrocknet. Die Proben können anschließend per EA-IRMS gemessen werden.

### **4.2.3 Isolierung von Kreatin per Kationenaustauschchromatographie**

Das eventuell in der Urinprobe befindliche Kreatin findet sich nach der CEC im Durchlauf und im Waschwasser wieder. Um von diesem Kreatin ebenfalls die Isotopenverhältnisse bestimmen zu können, gibt es zwei Wege. Entweder ein direkter Nachweis, in dem das Kreatin, das sich im Durchlauf und dem Waschwasser befindet, in Kreatinin umgewandelt und anschließend ebenfalls per CEC isoliert wird. Zum Zweiten eine indirekte Methode, in dem das Kreatin im Urin vor der CEC zu Kreatinin umgewandelt wird und anschließend das Gesamtkreatinin isoliert und per EA-IRMS gemessen wird. Anschließend kann man nach Quantifizierung der Konzentrationen an Kreatin und Kreatinin per HPLC in den Proben die Isotopenverhältnisse des Kreatins berechnen (Abbildung 13). Da die Umwandlung des Kreatins in Kreatinin in kleineren Volumina für eine größere Anzahl von Proben einfacher ist als in großen Volumina, wurde in dieser Arbeit die zweite Methode zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse des Kreatins verwendet

### **4.2.4 Isolierung von Gesamtkreatinin**

Kreatin lässt sich in salzsaurer Lösung und bei erhöhter Temperatur einfach in Kreatinin umwandeln [112]. Um das Gesamtkreatinin (Kreatin und Kreatinin) zu isolieren, wird der Urin mit dem selben Volumen an 1 M HCl versetzt und 24 Stunden bei 80 °C im Heizblock stehengelassen. Nach Abkühlung wird die Probe mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH = 4,8 auf 100 ml verdünnt und durch Zugabe von 1 ml 1 M KOH auf einen pH-Wert von 4 bis 5 eingestellt. Anschließend wird das Kreatinin mit der unter 4.2.2 geschilderten Methode isoliert.



**Abb. 13:** Flussschema für die Aufarbeitung von Urin für die Bestimmung der Stickstoffisotopenverhältnisse von Kreatin und Kreatinin für die EA-IRMS. In zwei Aufarbeitungsschritten wird einmal Kreatinin und einmal Gesamtkreatinin (Kreatin + Kreatinin) aufgearbeitet. Über die Quantifizierung per HPLC kann dann die Stickstoffisotopie des Kreatins berechnet werden.

#### 4.2.5 Regenerierung und Aktivierung des Kationenaustauschers

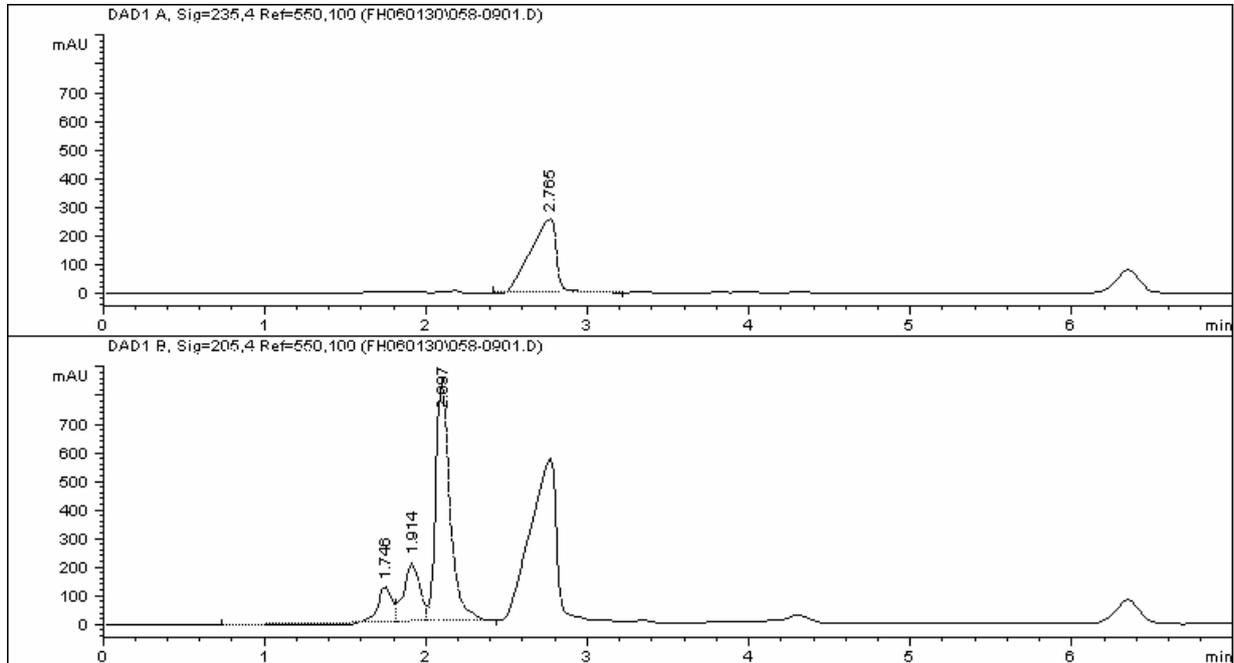
Der nach Gebrauch gesammelte oder neue Ionenaustauscher wird vor Verwendung 24 Stunden in der dreifachen Menge 1 M KOH stehen gelassen, anschließend fünfmal mit der dreifachen Menge an bidestilliertem Wasser gewaschen und in eine Glassäule gefüllt. Es wird solange mit bidestilliertem Wasser gewaschen bis der pH-Wert neutral ist, anschließend wird der Kationenaustauscher mit dem doppelten Volumen 1 M HCl versetzt und bei einem Fluss von ungefähr 1 ml/min beladen. Es wird solange mit HCl versetzt bis der Durchlauf einen Wert von  $\text{pH} = 1$  erreicht hat. Danach wird der Ionenaustauscher solange mit bidestilliertem Wasser gewaschen bis der pH-Wert des Durchlaufes neutral ist. Anschließend wird 0,1 M Phosphatpuffer über den Ionenaustauscher geschickt bis sich auch hier der pH-Wert des Durchlaufes auf den des Puffers eingestellt hat. Schließlich wird der Ionenaustauscher mit dem doppelten Volumen an 0,01 M Phosphatpuffer gewaschen und letztlich unter 0,01 M Phosphatpuffer stehend bis zur Verwendung aufbewahrt.

#### 4.2.6 Quantifizierung von Kreatin und Kreatinin

Die Quantifizierung von Kreatin und Kreatinin in Urin und anderen Matrices wurde mit Hilfe der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) vorgenommen. In biologischen Matrices wird diese Quantifizierung mit verschiedenen Säulen und Puffergemischen durchgeführt [113]. Die in dieser Arbeit verwendete Methode beruht auf die Standardmethode zur Bestimmung von Kreatin und Kreatinin im Urin im *Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln* [44].

Für die Analysen stand ein LC 1090 der Firma HP (Hewlett Packard) zur Verfügung. Die chromatographische Säule war eine NUCLEOSIL 120-5 C18 (250 x 4 mm, Macherey & Nagel, Düren, Deutschland). Der LC ist mit einem automatischen Injektionssystem und einem Diodenarray-Detektor ausgerüstet. Als Lösungsmittel wurden 0,01 M Phosphat-Puffer,  $\text{pH} = 4,8$  und Acetonitril Ultra Gradient HPLC Grade (J. T. Baker, Deventer, Niederlande) eingesetzt. Das Gerät wurde mit einem Fluss von 1,2 ml/min betrieben und jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Analyten injiziert.

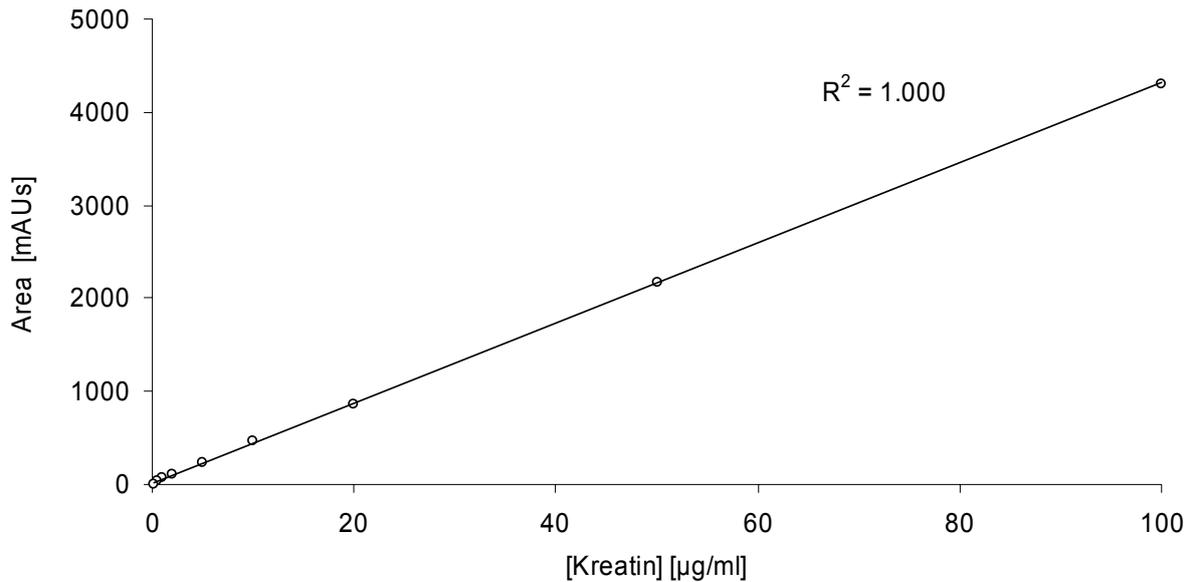
Die Retentionszeiten liegen für Kreatin bei 2,1 min und für Kreatinin bei 2,8 min. Kreatinin hat zwei Absorptionsmaxima bei 205 und bei 235 nm, Kreatin absorbiert bei 205 nm.



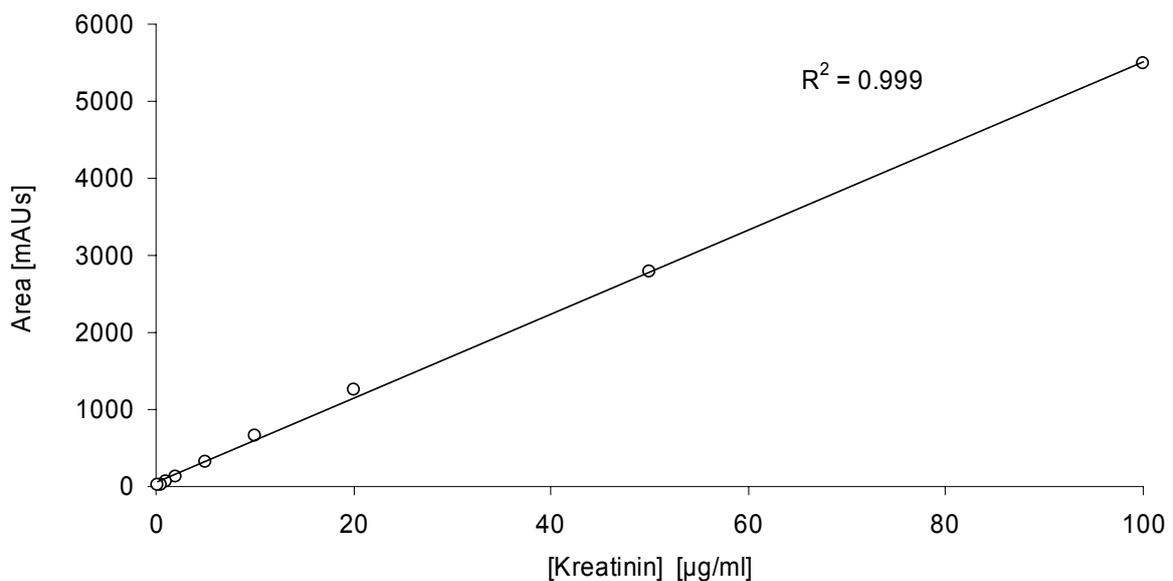
**Abb. 14:** Beispiel eines HPLC-Chromatogramms einer Urinprobe. Im oberen Fenster sieht man das Absorptionsmaximum für Kreatinin bei 235 nm. Im unteren Fenster bei 205 nm das Absorptionsmaximum von Kreatin bei ca. 2,1 min. Trotz der niedrigen Retentionszeiten und dem 'fronting' des Kreatinins reicht die Trennung zur Quantifizierung von Kreatin und Kreatinin aus.

Die ermittelte Peakfläche im Chromatogramm steht in linearer Beziehung zu der jeweiligen Konzentration (Abbildung 15 und 16). Dies gilt sowohl für Kreatin als auch Kreatinin.

Urin- und sonstige Proben werden mit 0,01 M Phosphatpuffer verdünnt, so dass die Konzentrationen ungefähr 1 µg/ml betragen. Die HPLC-Methode wurde neben der Untersuchung von Urinproben auch zur Quantifizierung der Aufarbeitung des Urins benutzt. Aus diesem Grunde wird der 0,01 M Phosphatpuffer als Laufmittel benutzt, da dieser Puffer auch in der Aufarbeitung eingesetzt wird. Weil die Urinproben zur Aufarbeitung um das 100-fache mit dem 0,01 M Phosphatpuffer verdünnt werden und so auch der Durchlauf und das Waschwasser ähnliche Konzentrationen aufweisen, wurde die Methode dementsprechend abgewandelt, um zusätzliche Arbeitsschritte, wie eine Aufkonzentrierung der Lösungen, zu vermeiden.



**Abb. 15:** HPLC-Kalibriergerade für Kreatin. Die lineare Beziehung zwischen UV-Absorption bei 205 nm und Konzentration an Kreatin ermöglicht die quantitative Bestimmung von Kreatin per HPLC.



**Abb. 16:** HPLC-Kalibriergerade für Kreatinin. Die lineare Beziehung zwischen UV-Absorption bei 235 nm und Konzentration an Kreatin ermöglicht die quantitative Bestimmungen von Kreatinin per HPLC.

Im Rahmen der Vorversuche zur Kationenaustauschchromatographie wurde die *Jaffé*-Methode als Schnelltest zur Quantifizierung von Kreatin und Kreatinin eingesetzt. Pikrinsäure bildet in alkalischer Lösung mit Kreatinin und Kreatin einen farbigen *Meisenheimer*-Komplex, der im Sichtbaren absorbiert und eine

charakteristische rotgelbe Färbung aufweist [114, 115]. Bei der *Jaffé*-Methode wird ein Aliquot der Urinprobe (10  $\mu$ l) mit derselben Menge an 10 %iger NaOH und 1,2 %iger wässriger Pikrinsäure-Lösung versetzt. Auf einer Mikrotiterplatte können gleichzeitig bis zu 96 Proben mit dem Reagenz versetzt werden. Nach einer Standzeit von einer Stunde wird die VIS-Absorption mit Hilfe eines *Victor<sup>3</sup> Multilabel Counter* (*Perkin Elmer*, Rodgau, D) bei 490 nm gemessen.

Die *Jaffé*-Methode liegt auch den Konzentrationsbestimmungen von Kreatinin bei den Urinproben der Belastungsstudie mit Hilfe der automatisierten Routinediagnostik des *COBAS Integra<sup>®</sup> 800* (*F. Hoffmann - La Roche AG*, D) zugrunde.

### 4.3 Isolierung von Bicarbonat für die IRMS

Es wird eine gesättigte  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung (Barytwasser) durch Lösen von ca. 40 g/L festem  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  in bidestilliertem Wasser bei Raumtemperatur hergestellt. Eventuell durch die Reaktion mit atmosphärischem  $\text{CO}_2$  auftretender Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen.

0,5 ml Urin wird mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 4 ml verdünnt, anschließend mit 1 ml der gesättigten  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, zweimal mit 2 ml bidestilliertem Wasser gewaschen und im Vakuum über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet.

500  $\mu$ g des getrockneten  $\text{BaCO}_3$  werden mit der vierfachen Menge an Amidoschwefelsäure in einer Zinnkapsel eingewogen und in ein ca. 15 cm langes Glasrohr mit einem Durchmesser von 7 mm und einer Wandstärke von 0,7 mm (Pasteurpipette) getan. Das Glasrohr wird unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) gasdicht zugeschmolzen und kann so gelagert werden. Um die Freisetzung des  $\text{CO}_2$  aus dem  $\text{BaCO}_3$  zu erreichen, werden die zugeschmolzenen Glasrohre für 30 Minuten auf 250 °C erhitzt. Für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse wird das Glasrohr in einen sich im Gasstrom des Elementaranalysators eingebauten flexiblen Metallschlauch ('*tube-cracker*') gebracht. Nachdem die bei Einbau eingedrungene Außenluft weggespült ist, kann die Probe per Gasanalyse gemessen werden (Kapitel 4.8.5).

#### 4.4 **Aufbereitung von Gesamturin für die IRMS**

Um die ermittelten Isotopenverhältnisse für Harnstoff, Kreatin/Kreatinin und Bicarbonat in eine Relation zu den weiteren Bestandteilen des Urins setzen zu können, wurden auch die Isotopenverhältnisse für Kohlenstoff und Stickstoff des Gesamturins analysiert. Hierzu wurde eine bestimmte Menge an Urin (je nach Dichte zwischen 10 und 150 µl) mit einer Mikroliterspritze in Zinn-Flüssigkeitskapseln überführt und über Nacht im Exsikkator unter Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Die Proben können anschließend direkt per EA-IRMS gemessen werden.

#### 4.5 **Isolierung von Serum-Proteinen für die IRMS**

Die Stickstoffisotopie der Serum-Proteine kann zur Interpretation der Isotopenverhältnisse in einem Organismus herangezogen werden [108] und wurde daher im Rahmen der Belastungsstudie analysiert. Albumin und Globulin können aus Serum durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) in Ethanol isoliert werden [116, 117]. Dazu werden 5 ml 2 %ige TCA in Ethanol (w/w) und 0,2 ml Serum zusammen gegeben, das Ganze geschüttelt und zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird der Niederschlag abzentrifugiert und getrocknet. Es handelt sich hierbei um die Globulin-Fraktion. Der Niederschlag wird mit 2 ml TCA/Ethanol gewaschen, der Überstand und das Waschwasser vereinigt und 2 Mol NaHCO<sub>3</sub> pro Mol TCA hinzu gegeben. Der augenblicklich auftretende Niederschlag kann nach wenigen Minuten abzentrifugiert werden, es handelt sich hierbei um die Albumin-Fraktion.

#### 4.6 **Präparation von Struktur-Protein für die IRMS**

Haare bestehen hauptsächlich aus dem Struktur-Protein Keratin und die Analyse der Isotopenverhältnisse des Haares kann zur Interpretation von körperlichen Zuständen herangezogen werden [13, 14]. Zur Probennahme wird das Haar so nah wie möglich über der Kopfhaut abgeschnitten und der Büschel mit einem Bindfaden fixiert. Anschließend wird das Haar zweimal 15 Minuten in 1:2 Chloroform/Methanol

(v/v) und anschließend zweimal 5 Minuten in bidestilliertem Wasser gewaschen. Nachdem die Haare auf gleiche Länge gebracht worden sind, werden sie mit Aluminiumfolie umwickelt, in gewünschte Segmente zerteilt und in Zinn-Kapseln verschlossen.

**Tab. 4:** Segmentlänge, abgedeckte Zeitspanne und benötigte Anzahl an Haaren für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Haar. Die angegebenen Werte sind Richtwerte und schwanken von Individuum zu Individuum.

Segmentlänge [cm]	Zeitspanne [d]	Anzahl Haare ( $\delta^{13}\text{C}$ )	Anzahl Haare ( $\delta^{15}\text{N}$ )
1 cm	30	2-3	7-8
0,5 cm	15	5	15
0,25 cm	7,5	10	30

## 4.7 Aufbereitung von Nahrungsmitteln für die IRMS

Zur Untersuchung der Isotopenverhältnisse von Nahrungsmitteln müssen diese homogenisiert und getrocknet werden. Ein Aliquot eines Nahrungsmittels oder einer Mahlzeit wird in einem Plastik-Reagenzglas mit wenigen Millilitern bidestilliertem Wasser zusammengebracht und mit Hilfe eines *Ultra-Turrax*<sup>®</sup> (170 W, 20000 UpM, Janke & Kunkel, KG, Staufen, D) homogenisiert. Bei Getränken und Flüssigkeiten entfällt dieser Schritt. Anschließend wird die Flüssigkeit oder homogene Emulsion im Exsikkator unter Vakuum über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet und die wasserfreie Masse in einem Achat-Mörser zerkleinert. Das Pulver kann dann direkt per EA-IRMS gemessen werden.

## 4.8 EA-IRMS

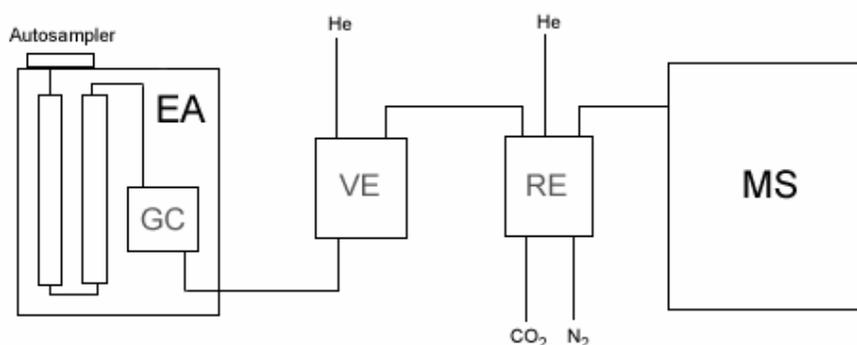
### 4.8.1 Aufbau und Methoden

Für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse wurde ein EA-IRMS-System bestehend aus einem *Eurovektor* Elementaranalysator gekoppelt mit einem Delta C Massenspektrometer der Firma *Thermo-Finnigan* verwendet.

**Tab. 5:** Systemkonfiguration EA-IRMS.

Elementaranalysator	<i>Eurovektor EA 3000</i>
Massenspektrometer	<i>Delta C, Thermo-Finnigan</i>
Trägergas	<i>Helium 5.0, Linde</i>
Fluss (EA)	<i>70 - 100 ml/min</i>
Oxidationsreaktor	<i>Wolframoxid, Silber-Kobaltoxid, Hekatech, 1050 °C</i>
Reduktionsreaktor	<i>Kupfer, Hekatech, 650 °C</i>
GC (EA)	<i>Poraplot, 40 °C</i>
Referenzgas C	<i>Kohlendioxid 4.5, Linde</i>
Referenzgas N	<i>Stickstoff 5.0, Linde</i>
Oxidationsmittel	<i>Sauerstoff, Linde</i>
Software EA	<i>Callidus, Version 2E3</i>
Software MS	<i>Isodat 2.0 IRMS Software</i>

Zwischen dem Elementaranalysator und dem Massenspektrometer ist eine Verdünnungseinheit (Abbildung 17, VE) der Firma *Hekatech* (Wegberg, D) eingebaut, die zur Verdünnung der Volumina an  $N_2$  und  $CO_2$  dient, wenn erhöhte Mengen an Substanz im Elementaranalysator verbrannt werden. Nachträglich wurde hier die manuelle Steuerung über ein Handventil durch ein pneumatisches Ventil, das über die MS-Software *Isodat NT* angesteuert wird, eingebaut.



**Abb. 17:** Schematischer Aufbau des EA-IRMS-Systems. Im Elementaranalysator (EA) wird die Probe über einen Autosampler aufgegeben und im Oxidationsofen verbrannt, dann passiert der Gasstrom einen Reduktionsofen und anschließend einen Gaschromatographen (GC). Zwischen EA und Massenspektrometer sind eine Verdünnungseinheit (VE) und ein Referenzgaseinlass (RE) eingebaut (siehe auch Kapitel 2.5.1).

Zur Beimischung der Referenzgase für die Isotopenanalyse steht ein universelles Interface zur Verfügung. Hierbei werden die Referenzgase Stickstoff und Kohlenstoff in den Heliumgasstrom nach Bedarf zugemischt. Die Steuerung erfolgt pneumatisch über die Software *Isodat NT*. Die Menge der Referenzgase kann über Druckminderer gesteuert werden. Des Weiteren ermöglicht das Interface eine Verdünnung der in dem Elementaranalysator erzeugten Reaktionsgase.

**Tab. 6:**  $\delta^{15}\text{N}$ - und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für *creapure<sup>TM</sup>* mit und ohne Verdünnung des Analyten. Die Verdünnung des Analyten im Interface sollte zu keiner Isotopenfraktionierung führen.

	<i>creapure<sup>TM</sup></i> keine Verdünnung (n = 5)	<i>creapure<sup>TM</sup></i> 10 fache Verdünnung (n = 5)
$\delta^{13}\text{C}$ [‰]	$-34,36 \pm 0,16$	$-34,23 \pm 0,06$
$\delta^{15}\text{N}$ [‰]	$4,97 \pm 0,36$	$4,81 \pm 0,18$

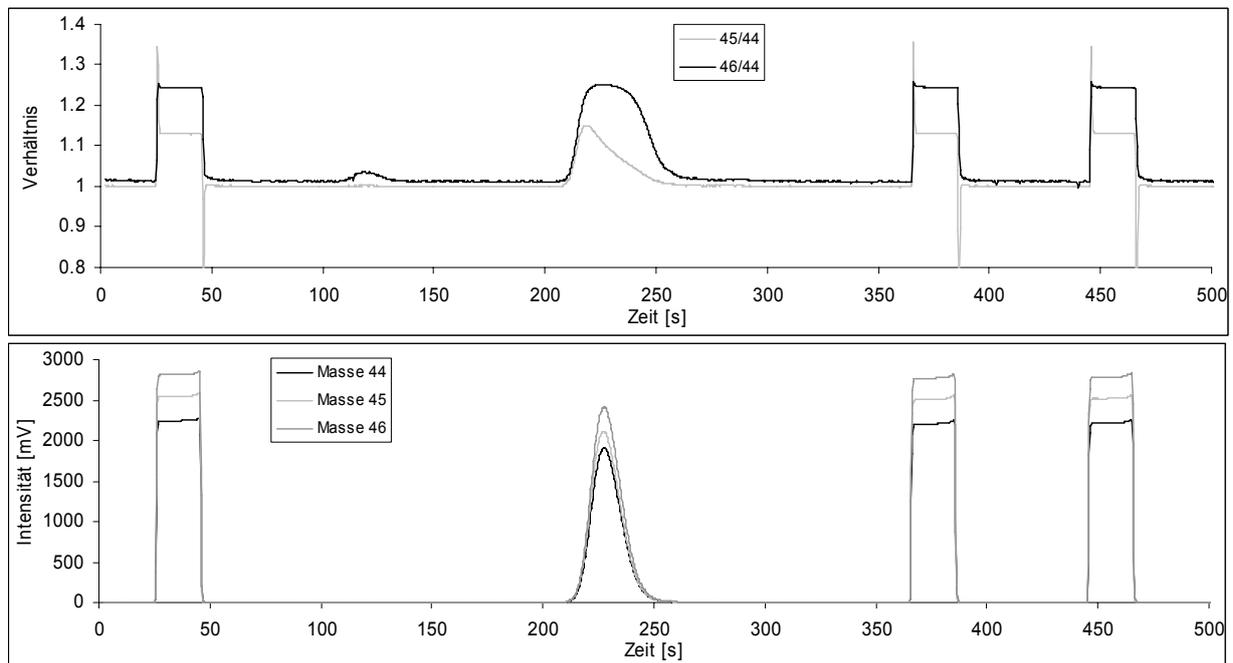
Diese Verdünnung kann ebenfalls pneumatisch über *Isodat NT* angesteuert werden. Das Prinzip dieses Interfaces entspricht dem des *ConFlo III* [81]. Wie in Tabelle 6 zu sehen ist, sind die Isotopenverhältnisse auch bei 10-facher Verdünnung des Analyten konstant.

**Tab. 7:** Übersicht über die verschiedenen verwendeten EA-IRMS-Methoden, Dauer der Messung, Anzahl der Referenzgaspeaks und Präzision (gerundete Standardabweichung  $1\sigma$  für eine Dreifachbestimmung).

Methode	Dauer [s]	Referenzgaspeaks (n)	$1\sigma$ (ca.) [‰]
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	500	3	$\pm 0,1$
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	500	3	$\pm 0,05$
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	500	jeweils 1	$\pm 0,2$ (N), $\pm 0,1$ (C)
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , geringer N-Anteil	1000	3	$\pm 0,2$

Für die Bestimmung der Kohlenstoff- und der Stickstoffisotopenverhältnisse per EA-IRMS wurden verschiedene Methoden verwendet. Da die Proben im Elementaranalysator in einer spontanen Reaktion zu  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  umgewandelt und später chromatographisch voneinander getrennt werden, können die Reaktionsgase

N<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> entweder zusammen in einer Analyse oder getrennt in zwei Analysen gemessen werden.

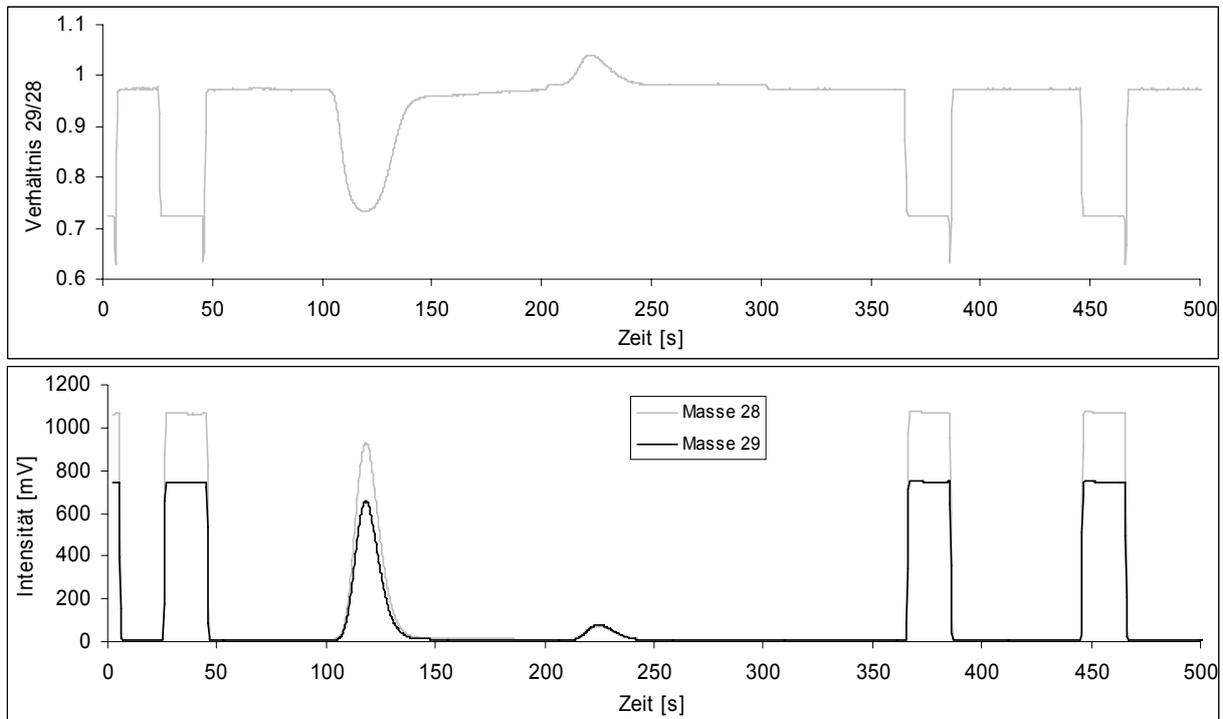


**Abb. 18:** Beispiel für eine Kohlenstoffisotopenanalyse per EA-IRMS. Mit einer Retentionszeit von ca. 230 Sekunden erreicht das CO<sub>2</sub> das MS. Im unteren Feld sind die drei Spuren der Massen 44, 45 und 46 dargestellt, im oberen Feld die Verhältnisse 45/44 bzw. 46/44. Drei Referenzgaspulse mit definiertem Isotopenverhältnis ermöglichen die Berechnung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes des CO<sub>2</sub> nach Integration.

Die Bestimmung der Kohlenstoff- und der Stickstoffisotopenverhältnisse in einer Analyse hat den Vorteil, dass für die Bestimmung beider Isotopenverhältnisse nur einmal ein Aliquot der Substanz verbrannt werden muss. Dies geht allerdings mit einem Verlust an Genauigkeit einher, da weniger Zeit für die Ausrichtung des Magneten und für Referenzgaspulse zur Verfügung steht. Bei Proben, von denen genug Substanz vorhanden war, wurden im Rahmen dieser Arbeit die spezifischen Methoden für das jeweilige Element benutzt. Für Proben, bei denen der Kohlenstoffanteil deutlich über dem des Stickstoffanteils liegt, wurde eine spezielle Methode programmiert, bei der genug Zeit für die Zuschaltung der Verdünnungseinheit zur Verdünnung des CO<sub>2</sub>-Anteils, der in das Massenspektrometer gelangt, zur Verfügung steht.

Die Retentionszeiten liegen bei den angegebenen Geräteparametern für N<sub>2</sub> bei ca. 125 s und für CO<sub>2</sub> bei 230 s, eine Veränderung der Retentionszeiten auf Grund veränderter Flussverhältnisse im Elementaranalysator weisen auf Probleme im

Oxidationsreaktor oder Autosampler hin. Im Stickstoff-Chromatogramm erkennt man zur Retentionszeit des  $\text{CO}_2$  einen kleinen Peak. Hierbei handelt es sich um im System entstandenes Kohlenmonoxid, das aber die Bestimmung der Stickstoff-Isotopenverhältnisse nicht beeinflusst.



**Abb. 19:** Beispiel für eine Stickstoffisotopenanalyse per EA-IRMS. Mit einer Retentionszeit von ca. 125 Sekunden erreicht das  $\text{N}_2$  das MS. Im unteren Feld sind die zwei Spuren der Massen 28 und 29 zu sehen, im oberen Feld das Verhältnis 29/28. Drei Referenzgaspulse mit definiertem Isotopenverhältnis ermöglichen die Berechnung des  $\delta^{15}\text{N}$ -Wertes des  $\text{N}_2$  nach Integration. Der Peak nach 225 Sekunden stammt von Kohlenmonoxid.

## 4.8.2 Kalibrierung und Linearität

Die für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse verwendeten Referenzgase  $\text{CO}_2$  und  $\text{N}_2$  werden über eine zentrale Laborversorgung zugeführt. Als Standardgas für Kohlenstoffisotopenmessungen dient  $\text{CO}_2$  mit einer Reinheit von 99,995 Vol.-% der Firma *Linde*. Als Referenzgas für die Stickstoffisotopenmessungen dient Stickstoff 5.0. Um die Standardgase als Referenzgase verwenden zu können, müssen sie kalibriert werden. Die Kalibrierung wird mithilfe der EA-IRMS über *IAEA*-Vergleichsmaterialien durchgeführt.

Zur Kalibrierung der Standardgase werden die Routinemethoden für CO<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> verwendet. Allerdings wurden die Methoden dahingehend abgewandelt, dass als Referenzsubstanz der vermeintliche Analyt, das IAEA-Vergleichsmaterial, angegeben und das Referenzgas als unbekannte Substanz betrachtet wird. So erhält man pro Messung drei Werte für das Referenzgas, dessen Mittelwert bestimmt wird. Hierbei wurden sowohl für CO<sub>2</sub> als auch für N<sub>2</sub> jeweils zwei sich deutlich im Isotopenverhältnis unterscheidende Vergleichsmaterialien gemessen. Die Messungen wurden insgesamt für jedes Vergleichsmaterial dreimal durchgeführt und daraus der gewichtete Mittelwert für die Referenzgase berechnet.

**Tab 8:**  $\delta^{13}\text{C}$  Werte für das CO<sub>2</sub>-Referenzgas mit Kalibrierungszeitpunkt, als Kalibrierungsstandard dienten die IAEA-Standards IAEA-CH6 und IAEA-CH7. Angegeben sind die Mittelwerte aus den drei Referenzgaspulsen pro Messung bei dreifacher Wiederholung und die sich daraus ergebende Standardabweichung ( $1\sigma$ ).

Kalibrierungs-Datum	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]	$1\sigma$ [‰]
11.04.2003	-3,96	± 0,22
13.07.2005	-4,36	± 0,18
26.01.2006	-3,92	± 0,16
27.09.2006	-3,63	± 0,27

Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für das CO<sub>2</sub>-Referenzgas (Tabelle 8) blieben über einen Zeitraum von vier Jahren stabil, wogegen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für das N<sub>2</sub>-Referenzgas (Tabelle 9) einen Trend zum leichten Stickstoff zeigen (1,4 ‰ in drei Jahren).

**Tab. 9:**  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für das N<sub>2</sub>-Referenzgas mit Kalibrierungszeitpunkt, als Kalibrierungsstandard dienten die IAEA-Standards IAEA-N1 und IAEA-N2. Angegeben sind die Mittelwerte aus den drei Referenzgaspulsen pro Messung bei dreifacher Wiederholung und die sich daraus ergebende Standardabweichung ( $1\sigma$ ).

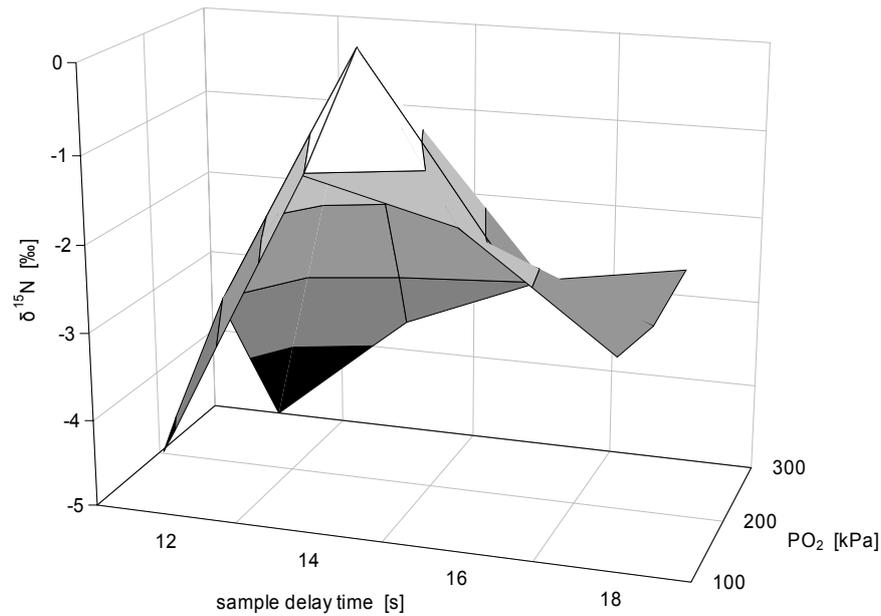
Kalibrierungs-Datum	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]	$1\sigma$ [‰]
11.04.2003	-3,96	± 0,23
13.07.2005	-4,36	± 0,20
22.11.2005	-5,08	± 0,40
26.01.2006	-5,32	± 0,54

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Werte für die Referenzgase wurden in unregelmäßigen Abständen Tests durchgeführt. Hierbei geht es insbesondere um das Auffinden von Isotopenfraktionierungen im Referenzgaseinlass und eventuelle störende Strömungseigenschaften. Bei dem *standard-on-off*-Test werden in 10-facher Wiederholung 20-Sekunden-Referenzgaspulse mit 20 Sekunden Pause gesetzt. Das Isotopenverhältnis des ersten Referenzgaspulses wird für Kohlenstoff auf  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = 0 \text{ ‰}$  und für Stickstoff auf  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} = 0 \text{ ‰}$  gesetzt und die weiteren Referenzgaspulse als unbekannt betrachtet. Neben dem *standard-on-off*-Test, bei dem die Intensität des Referenzgases gleich gehalten wird, werden sogenannte Linearitätstests durchgeführt, bei denen die Intensität der Referenzgaspulse variiert wird. Die Abweichung der bestimmten Isotopenverhältnissen für das Referenzgas soll dabei nicht über 0,06 ‰ pro Volt liegen [118].

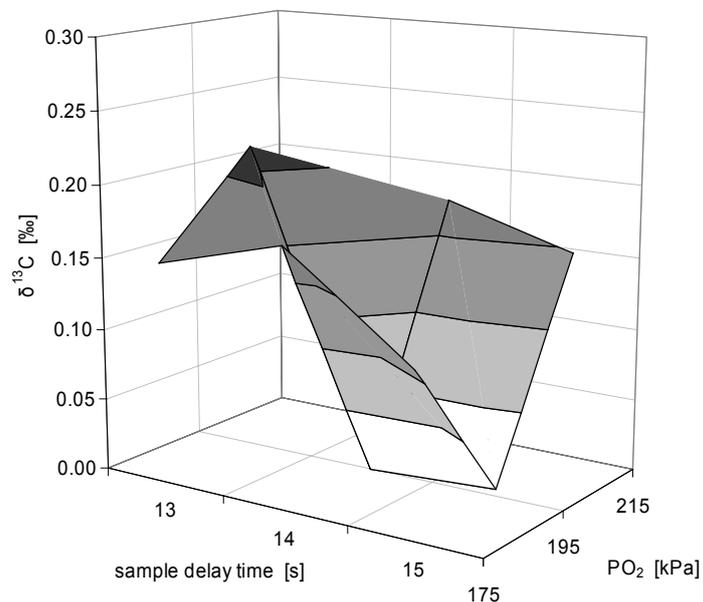
### 4.8.3 Abhängigkeit der Isotopenwerte von EA-Geräteparametern

Die Richtigkeit der Isotopenverhältnisse des EA-IRMS-Systems ist stark abhängig von einem funktionierenden Oxidations- und Reduktionsvorgang im Elementaranalysator. Neben der begrenzten Kapazität der Reaktoren kann auch eine unvollständige Verbrennung der Probe zu einer Isotopenfraktionierung und damit zu falschen Ergebnissen bei der IRMS führen. Um den Verbrennungsvorgang im Elementaranalysator zu optimieren, wurde ein Standard bei verschiedenen Geräteparametern gemessen.

Besonders wichtig für eine optimale Verbrennung im Oxidationsreaktor des Elementaranalysators sind der zeitgleiche Einwurf der Probe in den Reaktor und die Zuschaltung des zu einer spontanen Reaktion nötigen Sauerstoffes. So kann am Elementaranalysator sowohl der Zeitpunkt der Probe (*sample delay time*, SDT) als auch der Druck, mit dem der Sauerstoff in das System eingespeist wird, geregelt werden. In Abbildung 20 sieht man, dass eine optimale Verbrennung der Probe, also die geringste Abweichung von dem eigentlichen Isotopenverhältniss (willkürlich auf  $\delta^{15}\text{N} = 0 \text{ ‰}$  gesetzt), bei einer SDT von 14 Sekunden und einem Sauerstoffdruck  $\text{PO}_2$  von 200 kPa zu finden ist. Bei ungünstigen Bedingungen führt eine unvollständige Verbrennung zu einer Isotopenfraktionierung für Stickstoff von über 4 ‰.



**Abb. 20:** Abhängigkeit der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für einen Standard von Geräteparametern des Elementaranalysators. Nach Variation der sample delay time (Zeitpunkt des Einwurfes der Probe in den Oxidationsreaktor) oder des Sauerstoffdruckes  $\text{PO}_2$  verändern sich die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte um bis zu 4 ‰. Zum Zeitpunkt der optimalen Verbrennung wurde der  $\delta^{15}\text{N}$  Wert des Standards willkürlich auf 0 ‰ gesetzt.

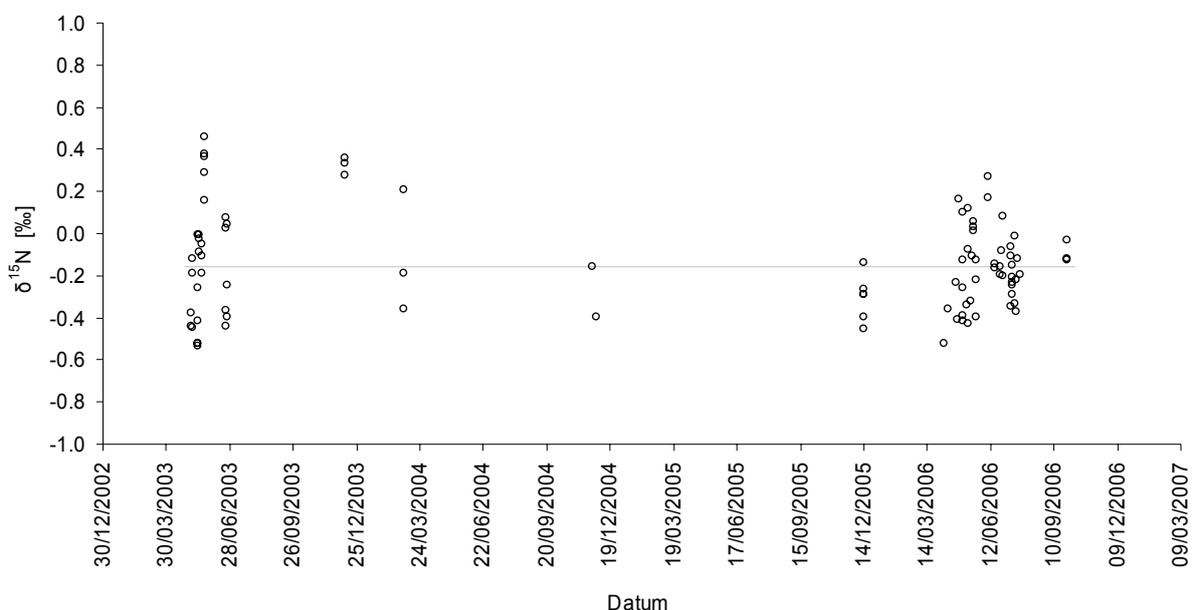


**Abb. 21:** Abhängigkeit der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für einen Standard von Geräteparametern des Elementaranalysators. Nach Variation der sample delay time (Zeitpunkt des Einwurfes der Probe in den Oxidationsreaktor) oder des Sauerstoffdruckes  $\text{PO}_2$  verändern sich die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte um bis zu 0,2 ‰. Zum Zeitpunkt der optimalen Verbrennung wurde der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Standards willkürlich auf 0 ‰ gesetzt.

Für Kohlenstoff tritt bei ungünstigen Bedingungen keine so große Isotopenfraktionierung auf. Die maximale Abweichung liegt bei den eingestellten Geräteparametern bei unter 0,2 ‰. Für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse, insbesondere für Stickstoff, ist also eine optimale Einstellung des Elementaranalysators zu beachten.

#### 4.8.4 Laborstandards

Als Laborstandard für die EA-IRMS wurde ein homogenisierter 100 g Kreatin-Monohydrat Standard (*creapure<sup>TM</sup>*, Degussa GmbH, Lot 100402) verwendet. Der Laborstandard wurde vor jeder Messesequenz eingesetzt, um eventuelle Unregelmäßigkeiten des Systems, die zu falschen Ergebnissen führen könnten, erkennen zu können (siehe 4.8.3). Neben der Kontrolle von Peakform und Untergrund liefern insbesondere die  $\delta^{15}\text{N}$ - und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Standards Hinweise auf Probleme mit den Reaktoren und Nichtlinearitäten im Massenspektrometer. Die Kontrolle der Richtigkeit der Isotopenwerte wurde daher vor jeder Messesequenz durchgeführt.

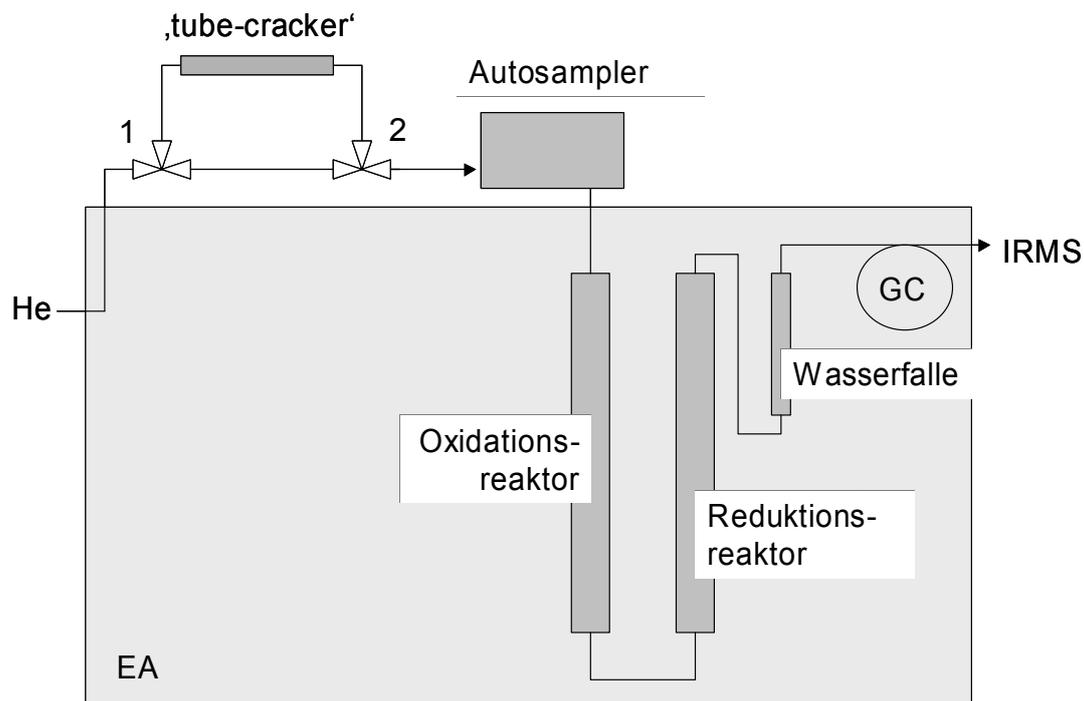


**Abb. 22:**  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Laborstandards *creapure<sup>TM</sup>* 2003 bis 2006. Der Median der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte beträgt  $-0,16 \pm 0,23$ . Die Schwankungen der Werte sind bedingt durch unterschiedliche Konditionen des EA-IRMS-Systems, Abweichungen außerhalb dieses Bereiches wurden als Hinweis zum Austausch von Reaktoren, etc. herangezogen.



### 4.8.5 Gasanalyse

Im Verlauf der Arbeiten wurde das EA-IRMS-System durch eine Vorrichtung zur Gasanalyse erweitert. Vorlage hierfür waren in der Geochemie und Ökologie seit den 70er Jahren für die Isotopenanalyse verwendete 'tube-cracker' [119]. Die einfache, manuelle Vorrichtung ermöglicht die Analyse von CO<sub>2</sub>, das seinerseits aus der Reaktion von Carbonaten mit Amidoschwefelsäure freigesetzt wird [120].



**Abb. 24:** Schematischer Aufbau des EA-IRMS-Systems, modifiziert für Gasanalysen. Im 'tube-cracker' wird eine Glaskapillare eingebracht, die zu gegebenem Zeitpunkt manuell durchgebrochen wird. Das Gas strömt im He-Trägergasstrom durch das System, unerwünschte Substanzen werden im Oxidations- oder Reduktionsreaktor und der Wasserfalle abgefangen. An Position 1 und 2 kann der Trägergasfluss manuell über 3-Wege-Ventile gesteuert werden.

Der 'tube-cracker' besteht aus zwei Ventilen sowie einem flexiblen Metallschlauch, die durch Swagelok<sup>®</sup>-Schnellkupplungen vor den Autosampler des Elementaranalysators eingebaut wurden. Im 'tube-cracker' wird eine Glaskapillare, die das zu analysierende Gas enthält, zu einer definierten Zeit durchgebrochen. Das Gas sammelt sich in einer Dosierschleife bis es zur Messung durch Öffnen der Ventile in den Helium-Trägergasstrom des Elementaranalysators strömt.

Eventuelle Verunreinigungen oder unerwünschte Reaktionsprodukte werden im Oxidations- und Reduktionsreaktor abgefangen. Eine Messung dauert ca. 700 Sekunden. Da in diesem Aufbau keine Spülvorrichtung eingebaut ist und sich nach Einbau der Glaskapillare in den 'tube-cracker' Raumluft in dem System befindet, muss ca. fünf Minuten zwischen zwei Messungen gespült werden.

#### 4.9 Überprüfung der Präzision und Richtigkeit der Methoden

Die entwickelten Aufarbeitungen und Messmethoden wurden hinsichtlich Präzision und Richtigkeit in Bezug auf die Isotopenverhältnisse untersucht. Um die Richtigkeit der Methoden zu überprüfen wurden Laborstandards bzw. Reinstoffe in bidestilliertem Wasser aufgelöst und die wässrigen Lösungen mit Hilfe der entwickelten Methoden aufgearbeitet. Anschließend können die durch Analyse des Reinstoffes oder Standards per EA-IRMS bestimmten Isotopenverhältnisse mit den nach der Aufarbeitung erhaltenen Werten verglichen werden.

Um Beiträge eventueller Verunreinigungen oder einer Isotopenfraktionierung bei der Isolierung speziell aus Urin festzustellen, wurden verschiedene Aliquote eines Urins mit unterschiedlichen Mengen eines Standards versetzt und die Mischungen jeweils aufgearbeitet. Trägt man die reziproken Konzentrationen der isolierten Substanz gegen die experimentellen Isotopenverhältnisse auf, so lässt sich durch lineare Regression das Isotopenverhältnis des zugesetzten Standards als y-Achsenabschnitt bestimmen und mit dem direkt per EA-IRMS bestimmten Isotopenverhältnis des Standards vergleichen. Dieses Verfahren zur Ermittlung eines unbekanntes Isotopenverhältnisses einer Substanz durch Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Mischungen, in denen die betreffende Substanz in bekanntem Anteil enthalten ist, geht auf *Keeling* [121, 122] zurück und wird in der Chemie zur Bestimmung des Eintrages von vegetations-respiriertem Kohlendioxid in die Atmosphäre benutzt [123].

Um die Präzision der Methode abzuschätzen wurden Urine oder wässrige Lösungen von Standards mehrfach aufgearbeitet, die Varianz der ermittelten Isotopenverhältnisse berechnet und in Relation zur Gerätepräzision gesetzt.

Eine Methode für die Isolierung einer Zielsubstanz für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse wurde dann als hinreichend richtig und präzise beurteilt, wenn

die Abweichungen zwischen den experimentellen Isotopenverhältnissen vor und nach Aufarbeitung innerhalb der Messpräzision lag oder die Abweichung bzw. der Fehler im Verhältnis zum erwarteten Signal hinreichend klein war.

## **4.10 Analyse von Urinproben**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die entwickelten Methoden zur Isolierung von Harnstoff, Kreatinin/Kreatin und Bicarbonat im Rahmen von Fallstudien untersucht, um Werte für natürliche Isotopenverhältnisse zu erhalten und Anwendungen in der sportwissenschaftlichen Forschung und Dopinganalytik zu implementieren.

### **4.10.1 Versuchsdurchführung $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Harnstoff bei Belastung**

Drei Radsportler, die an einem 24-Stunden-Radrennen teilgenommen haben, erklärten sich bereit, über einen Zeitraum von zwei Wochen, in denen das Rennen stattfand, Urinproben zu sammeln. Die Probanden wurden über die Hintergründe der Studie informiert und unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung. Es wurden keine persönlichen Daten außer den in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Daten erhoben und die Proben und Ergebnisse wurden anonymisiert.

Im Rahmen der Studie sollten die Stickstoffisotopenverhältnisse des urinären Harnstoffes bestimmt werden, um eventuelle belastungsinduzierte Veränderungen festzustellen. Die drei Probanden stellten eine relativ homogene Gruppe hinsichtlich ihrer biometrischen Daten dar und verfügten alle über eine langjährige Erfahrung im Ausdauersport und ähnlichen Trainings- und Wettkampfleistungen. Im Vorfeld des Rennens wurden neben den Urinproben noch Blut- und Speicheltests, sowie eine Leistungsdiagnostik durchgeführt. Die Probanden führten exemplarische Belastungs- und Ernährungsprotokolle, die anschließend zur Interpretation der Ergebnisse herangezogen werden konnten.

**Tab. 10:** Übersicht über die Probanden des 24-Stunden-Rennens, biometrische Daten und Ergebnisse der Leistungsdiagnostik vor dem Rennen.

	Proband 1	Proband 2	Proband 3
Alter [y]	34	38	38
Ausdauersport seit [y]	20	24	28
Größe [cm]	197	177	172
Gewicht [kg]	80	77	69
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	20,6	24,6	23,3
2 mmol-Schwelle <sup>†</sup> [W]	170	285	230
4 mmol-Schwelle <sup>†</sup> [W]	274	326	273
VO <sub>2</sub> max <sup>†</sup> [ml/min]	52,5	55,2	47,1
Trainingskilometer* [km]	6000	7500	5500

<sup>†</sup> Stufentest nach Mader (modifiziert)

\* von den Probanden geschätzte Trainingskilometer

Von einem Probanden wurden noch Bart- und Haupthaare gesammelt und hinsichtlich der Zusammensetzung der Stickstoffisotope analysiert. Die Probanden sammelten in der Woche vor dem Radrennen, während des Rennens und die Woche danach Urinproben.

**Tab. 11:** Zeiträume und Anzahl von Urinproben, die vor, während und nach dem 24-Stunden-Radrennen gesammelt wurden. Als Zeitpunkt 0 wurde der Start des Rennens gesetzt.

	Zeitraum [d]	Anzahl Urinproben		
		Proband 1	Proband 2	Proband 3
vor-Wettkampf	-5 bis 0	7	6	7
Wettkampf	0 bis 1	17	11	15
nach-Wettkampf	1 bis 6	16	13	20

Aliquots der Urine wurden nach Abnahme bei 4-6 °C aufbewahrt und für Harnstoff maximal 36 Stunden nach Abnahme aufgearbeitet. Neben der Isolierung des Harnstoffes wurden noch das Verhältnis der Stickstoffisotope des Gesamturins, sowie die Konzentrationen an Harnstoff, Kreatinin, Ammoniak und Proteinen mit Hilfe eines COBAS Integra<sup>®</sup> 800 (F. Hoffmann - La Roche AG, Deutschland) bestimmt.

Die Analyse der Isotopenverhältnisse wurde für jede Probe, sowohl Harnstoff und Gesamtstickstoff, so fern es möglich war in Dreifachbestimmung durchgeführt, die Konzentrationen der stickstoffhaltigen Substanzen im Urin wurden einfach bestimmt.

#### **4.10.2 Versuchsdurchführung Fallstudie Supplementierung mit Kreatin-Monohydrat**

Im Rahmen einer Studie des *Institutes für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln*, bei der Probanden synthetisches Kreatin-Monohydrat über einen Zeitraum von sechs Wochen zu sich nahmen, konnten Urinproben eines/einer Proband/in hinsichtlich der Stickstoffisotopenverhältnisse des Kreatinins und Kreatins untersucht werden.

Die Studie wurde Placebo-kontrolliert im doppelt-blind und cross-over Design durchgeführt, bei der die Probanden innerhalb zweier Zeiträume von jeweils sechs Wochen täglich morgens 5 g Kreatin-Monohydrat oder alternativ Maltodextrin als Placebo zu sich nahmen. Die Studie war nach der Deklaration von Helsinki durch die Ethikkommission der *Deutschen Sporthochschule Köln* genehmigt worden. Zwischen den Einnahme-Zeiträumen gab es eine sechswöchige Auswaschphase. In der ersten Woche, inklusive einiger Tage vor der ersten Einnahmephase sammelten der/die Proband/in fünf Urine, danach bis zum Ende der Studie eine Urinprobe pro Woche. Die Proben wurden für mehrere Tage bei 4-6 °C gelagert und anschließend bei -20 °C eingefroren und erst kurz vor der Aufarbeitung aufgetaut. Nach einer Konzentrationsbestimmung des Kreatinins und des Kreatins per HPLC wurde aus den Urinproben Kreatinin und Gesamtkreatinin isoliert.

#### **4.10.3 Bicarbonat**

Zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse von urinärem Bicarbonat wurde sowohl Human- als auch Pferdeurin untersucht.

### 4.10.3.1 Humanurin

Von einem Probanden, der Natriumhydrogencarbonat (*Kaisernatron*<sup>®</sup>) als Antiacidum gegen Sodbrennen eingenommen hat, wurden über einen Zeitraum von zwölf Stunden gesammelte Urinproben hinsichtlich der Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Bicarbonats untersucht. Die Urinproben wurden nach Abnahme bei 4-6 °C gelagert und innerhalb von einer Woche aufgearbeitet. Neben der Bestimmung des Isotopenverhältnisses des Bicarbonats wurden noch das Isotopenverhältnis des Gesamtkohlenstoffes des Urins sowie der pH-Wert bestimmt. Der Proband wurde über die Hintergründe der Studie informiert und unterzeichnete eine schriftliche Einverständniserklärung, es wurden keine persönlichen Daten außer den in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Daten erhoben und die Proben und Ergebnisse wurden anonymisiert.

### 4.10.3.2 Pferdeurin

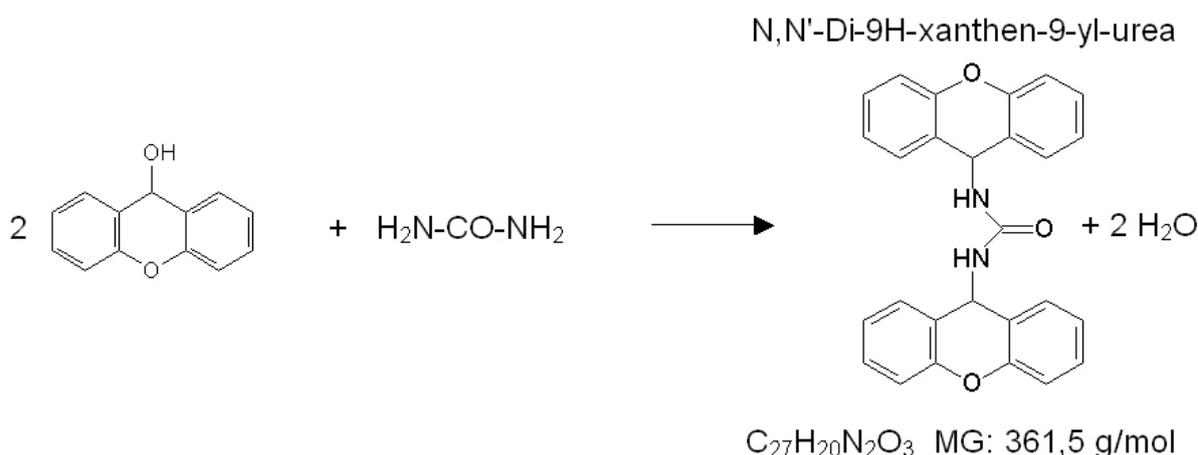
Insgesamt 61 Pferdeurine wurden hinsichtlich der Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Bicarbonats untersucht. Dabei entfielen acht der Pferdeurine auf so genannte 'blank'-Urine von Pferden, denen nachweislich keine exogenen Substanzen appliziert worden sind und deren Ernährung C3-basiert war mit dem Verzicht auf (Zusatz-/Kraft-)Futtermittel. 37 der Pferdeurine waren Routineproben aus der Routine-Dopinganalytik des *Institutes für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln*, in Auftrag gegeben von verschiedenen Pferdesportverbänden. Hierbei handelte es sich bis auf zwei Proben um Wettkampfkontrollen, die nach einem Rennen genommen worden waren. 16 der Pferdeurinproben stammten aus Hongkong und waren ebenfalls Wettkampfproben.

Die Urinproben wurden im März bis Mai 2006 analysiert, wobei der Zeitpunkt der Abnahme des Urins bis November 2005 zurückreichte (siehe Anhang 11). Die Urinproben waren zur Aufarbeitung seit Abnahme bei 4-6 °C gelagert worden.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Bestimmung des $\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff aus Urin

Die Isolierung des Harnstoffes aus dem Urin für die Bestimmung des  $\delta^{15}\text{N}$  erfolgte mit Hilfe der quantitativen Fällung durch Xanthydrol. Die Fällung von Harnstoff aus wässrigen Lösungen durch Xanthydrol ist ein Verfahren zur gravimetrischen Harnstoffbestimmung [109, 110] und wurde bereits für die Isolierung von Harnstoff aus Rattenurin für die IRMS zur Untersuchung des Stickstoff-Metabolismus eingesetzt [111]. Da die Fällung aus dem Urin quantitativ ist, sollten keine Isotopenfraktionierungen auftreten.



**Abb. 25:** Die Xanthydrol-Fällung: Je zwei Mol Xanthydrol (Xanthen-9-ol) reagieren mit einem Mol Harnstoff und bilden das in Wasser schwerlösliche N,N'-Di-9H-xanthen-9-yl-urea.

Bei der Xanthydrol-Fällung entstehen aus einem Mol Harnstoff und zwei Mol Xanthydrol ein Mol Dixanthylurea (N,N'-Di-9H-xanthen-9-yl-urea). Da bei der Reaktion keine weiteren Stickstoffatome außer denen des Harnstoffes in das Molekül eingebaut werden, entspricht das  $\delta^{15}\text{N}$  von Dixanthylurea dem des Harnstoffes aus der entsprechenden Lösung. Eine Bestimmung des  $\delta^{13}\text{C}$  des urinären Harnstoffes mit Hilfe der Xanthydrol-Fällung ist auf Grund des geringen Anteils von Kohlenstoff aus dem Harnstoff im Reaktionsprodukt von 1:27 nicht möglich und wurde auch auf Grund der gegebenen Fragestellung nicht weiter untersucht.

### 5.1.1 Richtigkeit der Methode

Um die Methode für die Isolierung von Harnstoff aus humanem Urin hinsichtlich der Isotopenverhältnisse zu überprüfen, wurden mehrere Aliquote eines Urins mit verschiedenen Mengen an synthetischem Harnstoff versetzt und die Proben jeweils aufgearbeitet (siehe Kapitel 4.9). Je 250 µl Urin (Harnstoffkonzentration: 11,2 mg/ml) wurden mit verschiedenen Volumina einer Harnstofflösung mit einer Konzentration von 16 mg/ml versetzt. Die Harnstoff-Konzentrationen der Mischungen wurden mit Hilfe eines Routineanalysators für die medizinische Diagnostik (*COBAS Integra<sup>®</sup> 800*, *F. Hoffmann - La Roche AG*, Mannheim, D) als Doppelbestimmungen durchgeführt.

**Tab. 12:** Versuchsreihe zur Überprüfung der Xanthyrol-Methode für humanen Urin. Verhältnis Urin zu Standard, experimentell bestimmte Konzentrationen der Mischungen [HS] und zugehörige  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte. Die Harnstoffkonzentration des Urins lag bei 11,2 mg/ml, alle Mischungen wurden auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt.

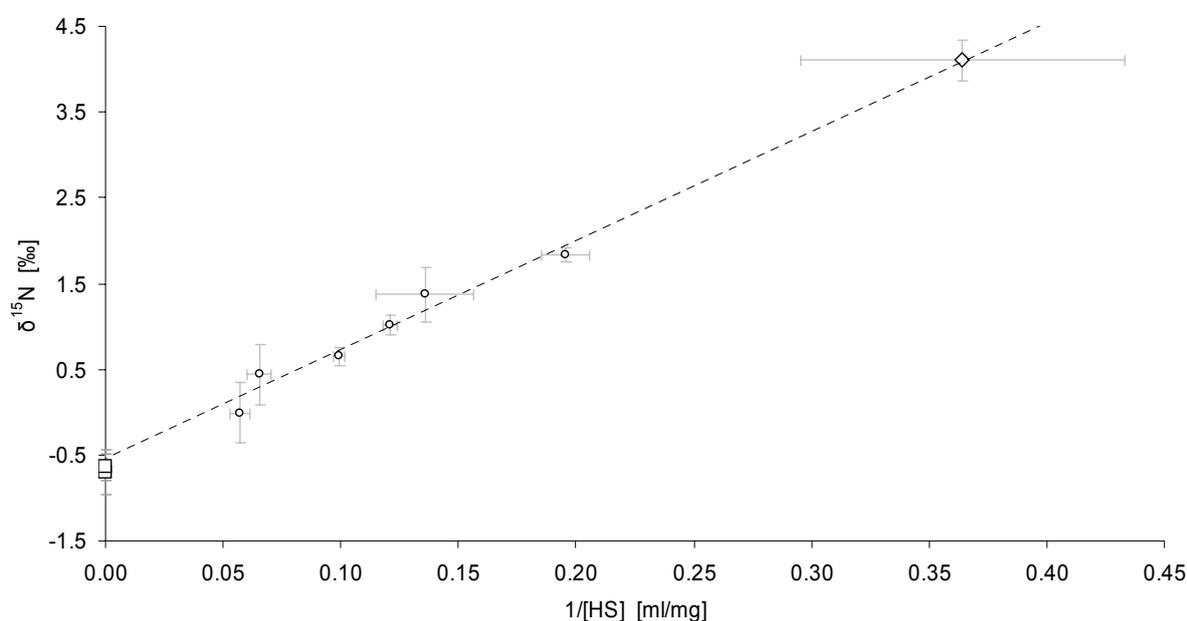
	Verhältnis Urin : Standard	[HS] [mg/ml]	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]
Urin		2,80 ± 0,53	4,10 ± 0,24
Urin/Standard #1	1 : 0,5	5,12 ± 0,27	1,83 ± 0,08
Urin/Standard #2	1 : 1,0	7,45 ± 1,14	1,37 ± 0,32
Urin/Standard #3	1 : 1,5	8,28 ± 0,20	1,02 ± 0,11
Urin/Standard #4	1 : 2,0	10,06 ± 0,24	0,65 ± 0,11
Urin/Standard #5	1 : 2,5	15,36 ± 1,25	0,44 ± 0,35
Urin/Standard #6	1 : 3,0	17,54 ± 1,32	0,00 ± 0,35
Standard		16,00*	-0,70 ± 0,26
Harnstoff (fest)			-0,64 ± 0,16

\*: die Konzentration des Harnstoff-Standards wurde nicht experimentell bestimmt, sondern durch Einwaage festgelegt

Der Harnstoff wurde nach der Xanthyrol-Methode ausgefällt und das entstandene Dixanthyurea per EA-IRMS gemessen. Tabelle 12 zeigt die verschiedenen Volumina an Urin und Harnstoff-Lösung. Alle Mischungen wurden auf ein Volumen von 1 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. So erhält man bei diesem Test zusätzlich einen Überblick, ob eventuelle konzentrationsabhängige Isotopenfraktionierungen auftreten. Die Konzentrationen an Harnstoff liegen in den

physiologisch vorkommenden Konzentrationsbereich von Harnstoff in Urin von durchschnittlich 14 mg/ml [15].

Die per EA-IRMS bestimmten  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des N,N'-Di-9H-xanthen-9-yl-urea wurden gegen die reziproken Harnstoff-Konzentrationen aufgetragen und für die mit synthetischem Harnstoff versetzten Aliquote eine lineare Regression durchgeführt. In Abbildung 26 erkennt man, dass alle Aliquote innerhalb ihrer Fehlergrenzen auf der Regressionslinie liegen. Die lineare Regression liefert bei einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,95$  eine Gleichung ( $y = mx + b$ ) nach  $\delta^{15}\text{N} = 12,70/[\text{HS}] - 0,54$ . Hierbei ist insbesondere der Achsenabschnitt  $b$  interessant, da er dem  $\delta^{15}\text{N}$  des zugesetzten synthetischen Harnstoffes entspricht.



**Abb. 26:** Keeling-Plot für die Bestimmung des  $\delta^{15}\text{N}$  von urinärem Harnstoff. Von einem humanen Urin (◇) wurden sechs Aliquote (○) mit unterschiedlichen Mengen an synthetischem Harnstoff (□) versetzt und alle nach der Xanthidrol-Methode aufgearbeitet. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe eines COBAS Integra® in Doppel-Bestimmung ermittelt. Die gestrichelte Linie stellt die lineare Regression der sechs Aliquote (○) dar und liefert einen Wert von  $\delta^{15}\text{N} = -0,54$  ‰ für den zugesetzten Harnstoff-Standard.

Der  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert des zugesetzten Harnstoff-Standards wurde auf zwei verschiedene Arten bestimmt. Einmal wurde der reine Feststoff direkt per EA-IRMS gemessen und einmal wurde der Harnstoff in Wasser aufgelöst und anschließend durch Xanthidrol gefällt und per EA-IRMS analysiert. Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des synthetischen Harnstoffes vor und nach Aufarbeitung liegen bei  $-0,70$  ‰  $\pm$   $0,26$  und  $-0,64$   $\pm$   $0,16$  ‰ und stimmen somit innerhalb der Fehlergrenzen überein. Der extrapolierte Wert für den

zugesetzten synthetischen Harnstoff durch den Keeling-Plot mit  $\delta^{15}\text{N} = -0,54 \text{ ‰}$  stimmt ebenfalls innerhalb der Fehlergrenzen mit den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten für den synthetischen Harnstoff überein.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Xanthydro-Methode für die Bestimmung des  $\delta^{15}\text{N}$  von urinärem humanen Harnstoff benutzt werden kann. Sie spiegelt die Isotopenverhältnisse in einem weiten Konzentrationsbereich von 2,8 - 17,54 mg/ml wieder und zeigt keinerlei mengenabhängige Isotopenfraktionierung. Obwohl die Methode zur Isolierung von Harnstoff für die IRMS bereits im Tierversuch angewendet worden ist [111], lagen bisher keine Untersuchungen hinsichtlich eventueller Isotopenfraktionierungen bei der Aufarbeitung, auch in der Anwendung für Humanurin, vor.

### 5.1.2 Präzision der Methode

Um die Präzision der Methode zu überprüfen, wurden fünf Aliquote von drei verschiedenen humanen Urinen und drei Aliquote eines Harnstoff-Standards (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, D; gelöst in bidestilliertem Wasser) nebeneinander mit der Xanthydro-Methode aufgearbeitet und per EA-IRMS analysiert.

**Tab. 13:** Geräte- und Aufarbeitungspräzision der Xanthydro-Methode zur Isolierung von Harnstoff aus humanem Urin. Drei Urine und ein Harnstoff-Standard wurden in fünf (bzw. drei) Aliquote aufgeteilt und nebeneinander aufgearbeitet. Die Standardabweichung der Messungen ( $1\sigma$ ) gibt die Präzision wieder, zur Ermittlung der Gerätepräzision wurde ein aufgearbeiteter Urin dreimal gemessen.

		Präzision der Aufarbeitung ( $1\sigma$ )	Gerätepräzision ( $1\sigma$ )
	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ [‰]
Urin #1 (n=5)	1,91	$\pm 0,24$	$\pm 0,09$
Urin #2 (n=5)	4,86	$\pm 0,16$	$\pm 0,15$
Urin #3 (n=5)	3,96	$\pm 0,22$	$\pm 0,15$
Standard (n=3)	-0,80	$\pm 0,24$	*

\* von dem Standard wurde keine Gerätepräzision ermittelt

Die Aufarbeitungspräzision wurde bestimmt, indem jedes Aliquot eines Urins einmal per EA-IRMS gemessen wurde und die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte dieser Aliquote miteinander verglichen wurden. Hierbei liegt die Standardabweichung ( $1\sigma$ ) für die fünf (bzw. drei) aufgearbeiteten Aliquote der Urine (bzw. des Standards) zwischen 0,16 und 0,24 ‰. Die Gerätepräzision (Standardabweichung ( $1\sigma$ )) für die Messung des  $\delta^{15}\text{N}$  von Dixanthylurea per EA-IRMS wurde durch fünfmalige Analyse eines aufgearbeiteten Aliquots pro Urin ermittelt und liegt zwischen 0,15 und 0,09 ‰. Somit ist die Gerätepräzision geringfügig besser als die Präzision der gesamten Aufarbeitungsmethode, die aber trotzdem immer noch in einem akzeptablen Bereich liegt. Anscheinend kommt es bei der Aufarbeitung doch zu geringfügigen Isotopenfraktionierungen bzw. Verunreinigungen, die dazu führen, dass die Aufarbeitungspräzision geringfügig schlechter ist als die Gerätepräzision.

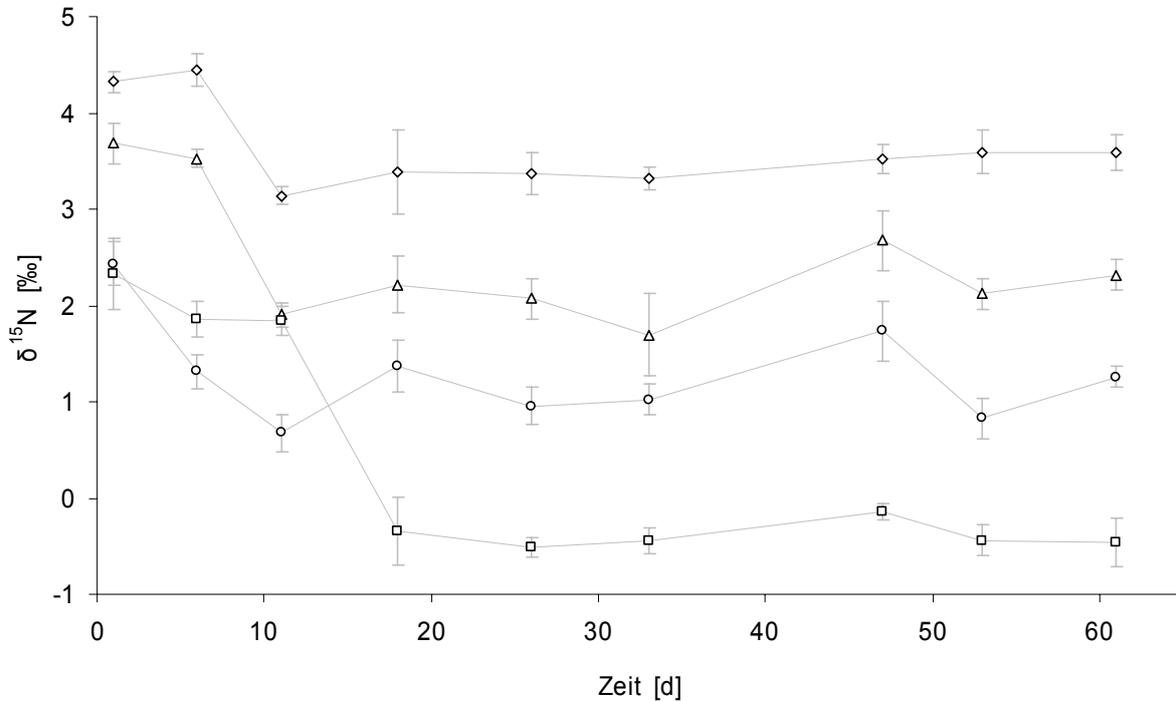
### 5.1.3 Stabilität von Harnstoff im Urin hinsichtlich des $\delta^{15}\text{N}$

Im Rahmen einer Diplomarbeit am *Institut für Biochemie* wurde die Stabilität der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Harnstoff in humanem Urin über einen Zeitraum von 61 Tagen untersucht. Urin von vier Personen wurde aliquotiert und unter verschiedenen Bedingungen gelagert [124]. Drei Aliquote wurden jeweils bei  $-20^\circ$ ,  $4^\circ$  und  $25^\circ\text{C}$  gelagert, drei weitere wurden mit  $\text{CuSO}_4$  versetzt und bei den gleichen Temperaturen gelagert. Alle Urine wurden einmal die Woche aufgearbeitet und der Harnstoff als Dixanthylurea isoliert und per EA-IRMS gemessen.

Es zeigte sich, dass sich das Stickstoffisotopenverhältnis des Harnstoffes im Urin schon nach wenigen Tagen signifikant ändert. Nach 61 Tagen sind die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für den urinären Harnstoff bei allen vier Urinen zwischen Werten um 0,73 und 2,78 ‰ gesunken [124].

Im Gegensatz dazu sind die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für den Gesamtstickstoff der Urine über den Beobachtungszeitraum annähernd konstant geblieben, es kann keine signifikante Verschiebung der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte zum schweren oder leichten Stickstoff erkannt werden [124]. Es kommt damit im Urin bei einer über Wochen dauernden Lagerung zu einer Verschiebung der Stickstoffisotope zwischen verschiedenen Kompartimenten im Urin, die allerdings im Rahmen der Studie nicht näher identifiziert werden konnten.

Es konnte kein Einfluss der Lagerungstemperatur auf die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes festgestellt werden. Sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4° und -20 °C veränderte sich das Isotopenverhältnis des Harnstoff-Stickstoffes signifikant und für die jeweiligen Urine im gleichen Ausmaß [124].



**Abb. 27:** Veränderung der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Harnstoff von vier Urinen in einem Zeitraum von 61 Tagen. Die Urine wurden zum Zeitpunkt 0 gesammelt (24-h-Urin), aliquotiert und einmal die Woche aufgearbeitet [124]. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung ( $1\sigma$ ) von sechs Aufarbeitungen (verschiedene Lagerungsbedingungen) dar.

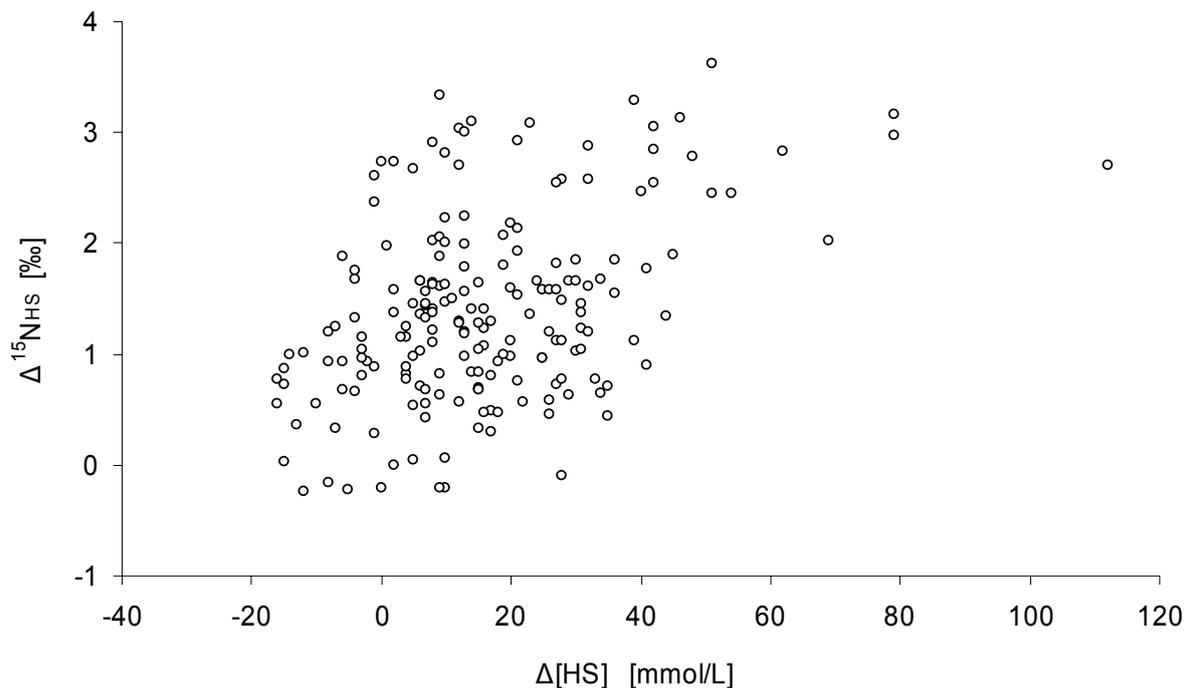
Durch Zugabe von  $\text{CuSO}_4$ -Pulver (1 mg pro ml) wurde der pH-Wert der Urinproben gesenkt, um einem bakteriellen Abbau des Harnstoffes entgegenzuwirken, doch konnte kein Einfluss auf die Stabilität hinsichtlich der Stickstoffisotopie des Harnstoffes beobachtet werden [124].

Über den Beobachtungszeitraum stiegen die Harnstoffkonzentrationen um ca. 10 % an. Da kein Harnstoffstandard über den Zeitraum mitgelagert und -gemessen wurde, kann man zwei Möglichkeiten für den Anstieg der Harnstoffkonzentrationen annehmen: 1. Es kann sich um eine Gerätedrift handeln, da die Proben nicht zusammen, sondern pro Aufarbeitungswoche gemessen wurden und 2. Der Zerfall von einer organischen Substanz im Urin, die zu Harnstoff führt.

Berechnet man die Differenz  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{HS}}$  aus den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten zum jeweiligen Aufarbeitungszeitpunkt in Bezug auf die anfänglichen  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte zu Beginn der

Untersuchung und setzt diese in Bezug zur Änderung der Harnstoffkonzentrationen  $\Delta[\text{HS}]$  (Abbildung 28) so lässt sich eine leichte Abhängigkeit erkennen (Korrelationskoeffizient  $r = 0,66$ ). Dies würde bedeuten, dass die Änderung der Stickstoffisotopenverhältnisse mit einer Änderung der Harnstoffkonzentrationen einhergeht.

Weder eine Lagerung der Urinproben bei tiefen Temperaturen, noch die Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  zum Urin konnte den Harnstoff hinsichtlich seines Stickstoffisotopenverhältnisses stabilisieren.



**Abb. 28:** Differenz der Harnstoffkonzentrationen und Differenz der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes zum Zeitpunkt  $t$  in Bezug auf die Basiswerte von Tag 1 ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{HS}}$ ). Je größer die Zunahme der Harnstoffkonzentration ist, desto größer ist auch die Abnahme der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes ( $r = 0,66$ ).

Die einzige Möglichkeit, derzeit systematische Fehler bei der Bestimmung der Stickstoffisotopenverhältnisse des Harnstoffes zu verhindern, besteht in einer sofortigen Aufarbeitung des Urins. Im Gegensatz zum freien Harnstoff im Urin ist das getrocknete, aufgearbeitete Reaktionsprodukt Dixanthylurea hinsichtlich der Stickstoffisotopenverhältnisse über einen längeren Zeitraum stabil. Vier im Rahmen der Stabilitätsstudie aufgearbeitete und anschließend bei Raumtemperatur gelagerte Proben Dixanthylurea wurden nach ca. einem Jahr erneut per EA-IRMS gemessen.

Es zeigte sich, dass sich die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Proben kaum verändert haben. Zwar liegen die im April 2007 gemessenen  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte zwischen 0,22 und 0,39 ‰ niedriger als ein Jahr zuvor, allerdings zeigt sich bei Betrachtung des Laborstandards *creapure*<sup>TM</sup>, dass sich die Bedingungen des EA-IRMS-Systems ein Jahr später leicht verändert haben, da der Laborstandard im jeweiligen Messzeitraum ebenfalls um 0,17 ‰ niedriger liegt (Kapitel 4.8.3).

**Tab. 14:**  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Dixanthylurea für vier zufällig ausgesuchte Proben der Stabilitätsstudie aus dem Jahr 2006, gemessen jeweils einmal im April 2006 und ein weiteres Mal im April 2007. Die Werte liegen nach einem Jahr etwas niedriger als im Jahr davor ( $\Delta^{15}\text{N}_{2006-2007}$ ), allerdings liegt der Laborstandard *creapure*<sup>TM</sup> im Jahr 2007 ebenfalls niedriger als 2006, was auf leicht veränderte Bedingungen im EA-IRMS-System zurückzuführen ist (Kapitel 4.8.3).

Probe	$\delta^{15}\text{N}_{\text{April 2006}}$ [‰]	$\delta^{15}\text{N}_{\text{April 2007}}$ [‰]	$\Delta^{15}\text{N}_{2006-2007}$ ‰
23-04	-0,28	-0,66	-0,38
18-03	3,04	2,82	-0,22
08-03	1,82	1,51	-0,31
04-02	1,44	1,05	-0,39
creapure	-0,38	-0,55	-0,17

Somit zeigen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Dixanthylurea, gemessen mit einem Jahr Abstand, im Vergleich zur mangelhaften Stabilität von Harnstoff in wässriger Lösung nur geringfügige Abweichungen. Um den Urin hinsichtlich der Stickstoffisotopenverhältnisse des Harnstoffes zu stabilisieren, müsste der zu Grunde liegende Vorgang, der die Veränderung der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte bedingt, identifiziert werden. Bei der im Folgenden vorgestellten Untersuchung wurden die Urine auf Grund der mangelhaften Stabilität des Harnstoffes innerhalb von 36 Stunden aufgearbeitet.

#### 5.1.4 $\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff bei körperlicher Belastung

Harnstoff ist der Haupt-Stickstoff-Bestandteil in humanem Urin (siehe Kapitel 2.2). Er ist die metabolische Senke für das Zellgift Ammoniak, das über die Reaktion mit Bicarbonat und Einspeisung in den Harnstoffzyklus unschädlich gemacht wird. Aus

diesem Grund wird urinärer Harnstoff schon seit den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts zur Interpretation von physiologischen Vorgängen bei körperlicher Arbeit herangezogen [9]. So konnte gezeigt werden, dass die Harnstoffkonzentrationen im Urin nach körperlicher Belastung ansteigen [25-29, 125, 126]. Auch die Isotopenverhältnisse von urinärem Harnstoff wurde bereits im Tierversuch bei Ratten untersucht, hierbei wurden die Änderungen im  $\delta^{15}\text{N}$  von Harnstoff zur Interpretation von metabolischen Vorgängen in verschiedenen Ernährungsstadien untersucht [108]. Da bei extremen körperlichen Belastungen und Hungerzuständen der Körper auf eigene Reserven zurückgreift und anfängt, körpereigene Masse zu metabolisieren, besteht eventuell die Möglichkeit durch die Analyse der Zusammensetzung des  $\delta^{15}\text{N}$  von urinärem Harnstoff weitere Aussagen zu metabolischen Vorgängen nach Belastung zu machen oder die Quelle des in Form von Harnstoff ausgeschiedenen Stickstoffes zu lokalisieren.

Zu diesem Zweck wurden Urine von drei Radsportlern, die an einem 24-Stunden-Radrennen teilnahmen, vor, während und nach der Belastung untersucht. Parallel zu den Urinproben wurden in einer Kooperation mit dem *Institut für Trainingswissenschaft und Sportinformatik* der *Deutschen Sporthochschule Köln* die Blutgase des Kapillarbluts während des Wettkampfes sowie venöses Blut vor und nach dem Rennen analysiert. Zudem wurden im Rahmen eines weiteren Forschungsprojektes des *Instituts für Biochemie* der *Deutschen Sporthochschule Köln* Ernährungsprotokolle und Speichelproben gesammelt.

Die drei Probanden waren erfahrene Ausdauersportler und stellten sowohl in biometrischer Hinsicht (Kapitel 4.10.1) als auch hinsichtlich ihrer physiologischen Konstitution eine relativ homogene Gruppe dar. Vier Tage vor dem Rennen wurde eine Leistungsdiagnostik auf einem Fahrradergometer durchgeführt. In Stufen von 40 Watt für eine Dauer von jeweils fünf Minuten wurden die aerobe (Laktatkonzentration gleich 2 mmol) und die anaerobe Schwelle (4 mmol) sowie die maximale Sauerstoffaufnahme bestimmt. Auch wenn es individuelle Unterschiede gab, so waren die drei Probanden in ihrer Leistungsfähigkeit vergleichbar. Ebenfalls vergleichbar waren die Trainingsumfänge im Jahr 2006 bis zum Rennen (Kapitel 4.10.1).

Die vergleichbare Leistungsfähigkeit aus der Leistungsdiagnostik vor dem Rennen findet sich auch in den Resultaten des Wettkampfes wieder. So fuhren alle drei Probanden jeweils 508 km mit 11000 Höhenmetern in einer Gesamtfahrzeit von

23:31 Stunden. Die Rennverläufe waren allerdings unterschiedlich. Proband 3 begann am schnellsten mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 32,6 km/h, zeigte aber auch die größte Abnahme der durchschnittlichen Geschwindigkeit pro Runde über das Rennen mit (linear interpolierten) -0,86 km/h pro Stunde. Proband 2 wies eine geringere Anfangsgeschwindigkeit und Geschwindigkeitsabnahme auf, Proband 1 fuhr das Rennen am konstantesten. Die Energiezufuhr wie auch der -verbrauch waren bei allen drei Probanden vergleichbar. Gegenüber den Tagen vor dem Rennen wurde die Nahrungsaufnahme um fast das 10-fache während des Rennens auf über 10000 kcal gesteigert. Die Aufnahme von mehr als 10000 kcal in 24 Stunden während starker körperlicher Belastung entspricht berichteten Resultaten in der Literatur. Bei Langzeitbelastungen werden Energiemengen zwischen 7000 und 10000 kcal in 24 Stunden aufgenommen [125-128].

**Tab. 15:** Übersicht über die Probanden des 24-Stunden-Radrennens, Rennergebnisse, Energieumsätze und -zuführung.

	Proband 1	Proband 2	Proband 3
gefahrte Distanz [km]	508	508	508
Zeit* [hh:mm]	23:31	23:31	23:31
Anfangsgeschwindigkeit** [km/h]	25,3	26,6	32,6
Beschleunigung <sup>+</sup> [km/h <sup>2</sup> ]	-0,25	-0,53	-0,86
zugeführte Energie <sup>++</sup> [kcal]	10198	10736	10885
Energieverbrauch <sup>+++</sup> [kcal]	23679	22590	20857
Energieverbrauch pro Stunde und kg Körpergewicht [kcal/h·kg]	12,3	12,2	12,6
Flüssigkeitszufuhr [L]	15,1	20,6	14,5

\* Bruttozeit, inklusive Pausen

\*\* Geschwindigkeit für die erste Runde (24,43 km)

<sup>+</sup> negative Beschleunigung oder 'Verlangsamung' auf die Rundenzeiten bezogen, berechnet durch lineare Regression der Rundenzeiten

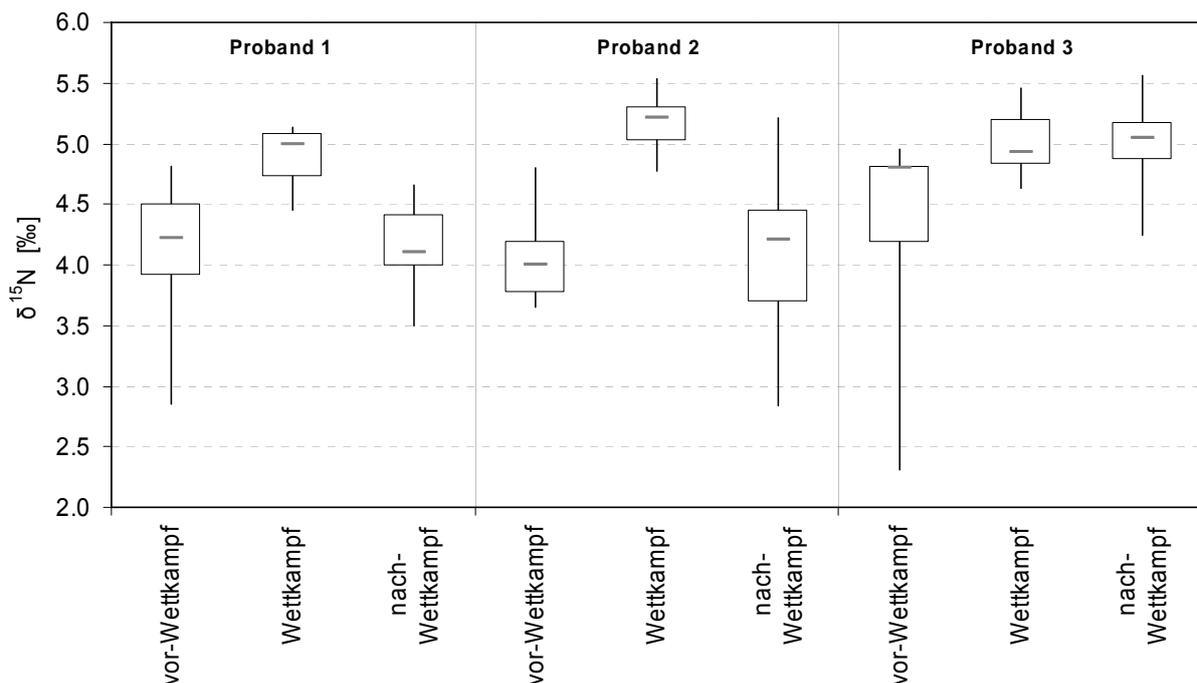
<sup>++</sup> berechnet aus Ernährungsprotokollen mit EBISpro für Windows, V 7.0 (2005)

<sup>+++</sup> berechnet nach [129]

Von den Probanden wurden in der Woche vor dem Wettkampf Urinproben genommen, um Basiswerte für die spätere Interpretation der Wettkampfdaten zu erhalten. Während des Rennens wurde in Abständen von einer bzw. zwei Stunden

Urinproben gesammelt, der Sammelzeitraum erstreckte sich bis fünf Tage nach dem Rennen. Die Urinproben wurden so schnell wie möglich aufgearbeitet, bei den während des Rennens gesammelten Urinproben wurde der Harnstoff noch vor Ort aufgearbeitet. Die maximale Zeit zwischen Sammelzeitpunkt und Isolierung des Harnstoffes betrug 36 Stunden.

Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für den isolierten urinären Harnstoff liegen für alle drei Probanden zwischen 2,31 ‰ und 5,57 ‰. Die Verteilung der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte unterscheidet sich aber zwischen den Probanden. Während die Minimal- und Maximalwerte bei Proband 3 gegenüber Proband 2 und 1 weiter auseinander liegen, erstrecken sich die mittleren 50 % der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte bei Proband 3 über einen deutlich engeren Bereich. Auch liegt das Niveau dieser 50 % deutlich über dem der anderen beiden Probanden. Dies wird auch durch die mittleren  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte über alle Urinproben deutlich, der für Proband 3 ein Wert von  $\delta^{15}\text{N} = 4,95$  ‰ gegenüber 4,32 ‰ (Proband 1) und 4,40 ‰ (Proband 2) aufweist.



**Abb. 29:** Verteilung der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für urinären Harnstoff vor, während und nach dem 24-Stunden-Radrennen. Die Box repräsentiert die mittleren 50 % der Werte, die Horizontale den Median und die Senkrechten die Minimal- und Maximalwerte. Man erkennt einen signifikanten Anstieg der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des urinären Harnstoffes während des Rennens, bei Proband 1 und Proband 2 sinken die Werte nach dem Rennen wieder auf Ausgangsniveau zurück, nur bei Proband 3 bleiben sie erhöht

Klassifiziert man die Urinproben nach dem Zeitpunkt der Probenahme (vor, während und nach dem Wettkampf), so lassen sich zwischen den Probanden weitere

Unterschiede erkennen. Bei allen drei Probanden weisen die Proben, die während des Rennens genommen worden sind, signifikant höhere  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für den Harnstoff-Stickstoff auf, als die vor dem Rennen genommenen Proben. Bei Proband 1 und Proband 2 sinken die Werte nach dem Rennen wieder auf das Ausgangsniveau zurück, während die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für den Harnstoff bei Proband 3 auf dem höheren Niveau des Wettkampfes verbleiben.

Die erreichten Maximalwerte liegen für Proband 1 im Wettkampf bei  $\delta^{15}\text{N} = 5,16 \pm 0,48 \text{ ‰}$ , bei Proband 2 ebenfalls im Wettkampf bei  $\delta^{15}\text{N} = 5,53 \pm 0,04 \text{ ‰}$  und bei Proband 3 nach dem Wettkampf bei  $5,46 \pm 0,34 \text{ ‰}$ . Die Maximalwerte aller drei Probanden stimmen innerhalb der Messpräzision der Dreifachbestimmung (Standardabweichung  $1\sigma$ ) überein. Die Minimalwerte dagegen unterscheiden sich bei den Probanden. So findet sich der niedrigste  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von Proband 1 und Proband 3 vor dem Wettkampf, dagegen erreicht Proband 2 den niedrigsten  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert nach dem Wettkampf.

Die zeitlichen Veränderungen der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für den Harnstoff sind bei den drei Probanden unterschiedlich ausgeprägt. Grundsätzlich steigen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte während der körperlichen Belastung im Wettkampf an, ein Phänomen, das auch schon bei Vorversuchen festgestellt worden war.

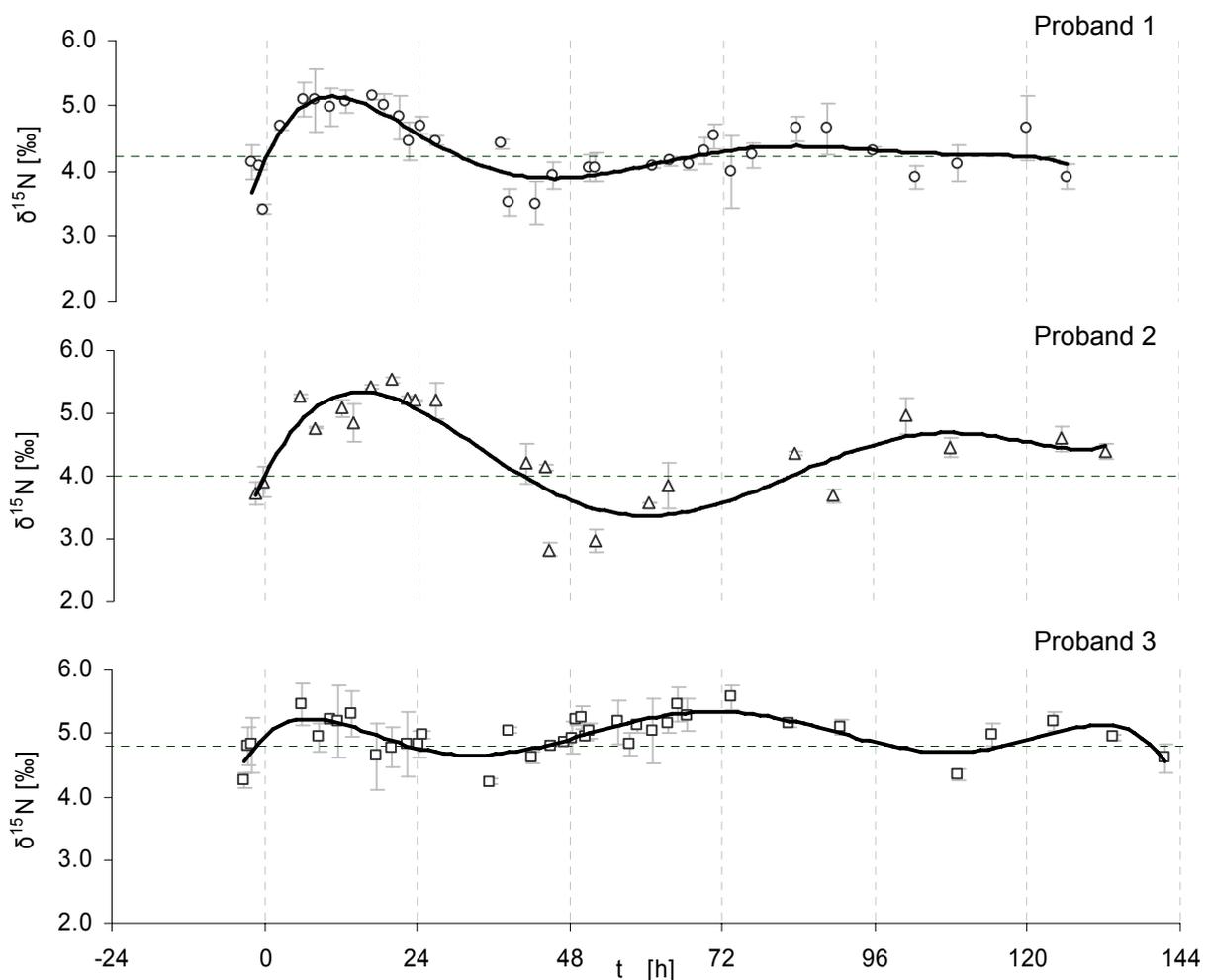
**Tab. 16:** Mittlere  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von urinärem Harnstoff, vor, während und nach dem Wettkampf. 'n' bezeichnet die Anzahl der jeweiligen Proben in der Kategorie.

	Proband 1	Proband 2	Proband 3
vor-Wettkampf [‰]	4,22 ± 0,66 (n=8)	4,00 ± 0,42 (n=6)	4,80 ± 0,93 (n=7)
Wettkampf [‰]	4,99 ± 0,23 (n=10)	5,22 ± 0,26 (n=8)	4,93 ± 0,28 (n=9)
nach-Wettkampf [‰]	4,11 ± 0,33 (n=21)	4,20 ± 0,70 (n=13)	5,04 ± 0,30 (n=26)

Die in der Woche vor dem Wettkampf gesammelten Proben sollten als Basiswerte im erholten Zustand vor der körperlichen Belastung dienen. Der  $\delta^{15}\text{N}$ -Median für Harnstoff der vor-Wettkampf Proben liegt bei allen drei Probanden zwischen 4,00 und 4,80 ‰, bei teilweise aber großen Unterschieden zwischen den einzelnen Urinen (Standardabweichung  $1\sigma$  zwischen 0,42 und 0,93 ‰). Während des Wettkampfes steigen die mittleren Werte zwischen 0,13 ‰ (Proband 3), 0,77 ‰ (Proband 1) und 1,22 ‰ (Proband 2) an. Die Streuung ( $1s$ ) der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte im Wettkampf ist im Vergleich zu den vor- und nach-Wettkampf Proben auffällig niedrig

mit 0,23 bis 0,28 ‰ und nur unwesentlich größer als die durchschnittliche Messunsicherheit mit 0,20 ‰ (mittlere Standardabweichung von Doppel- oder Dreifachmessungen jeder Probe) während dieses Zeitraumes.

Die signifikant erhöhten  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes während des Wettkampfes bei allen drei Probanden fallen bei zwei Probanden nach dem Wettkampf wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Betrachtet man die zeitlichen Verläufe für die einzelnen Probanden genauer (Abbildung 30), so erkennt man dass die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte während des Wettkampfes zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihr Maximum erreichen aber bei allen drei Probanden noch vor Beendigung des Wettkampfes wieder sinken.



**Abb. 30:** Verlauf der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff aus Urin über einen Zeitraum bis 144 Stunden nach Start des 24-Stunden-Radrennens. Das Rennen startete bei  $t=0$  h und endete bei  $t=24$  h. Die gestrichelte horizontale Linie stellt den Median der vor dem Wettkampf genommenen Proben dar (vgl. Tabelle 16), die Fehlerbalken der Messpunkte die jeweilige Messunsicherheit (Standardabweichung für Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen). Die schwarze Linie stellt ein Polynom 6. Grades dar, das an die jeweiligen Messpunkte angefüttet wurde und die Interpolation der Zeitpunkte lokaler Minima und Maxima ermöglicht.

Dieser Trend setzt sich nach Beendigung des Wettkampfes weiter fort, und zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreichen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte aller drei Probanden ein Minimum unterhalb des Medians der Basiswerte. Bei den drei Probanden unterscheiden sich aber sowohl die Zeitpunkte, an denen die lokalen Maxima und Minima erreicht werden, als auch die Spanne der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte zwischen Maximum und Minimum. Obwohl sich die Basiswerte, die Zeitpunkte und die Spanne bei den einzelnen Probanden deutlich unterscheiden, ist die Höhe des Maximums bei allen drei Probanden während des Wettkampfes annähernd gleich.

An die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes können Polynome 6. Grades angefitet werden, die den zeitlichen Verlauf der Stickstoffisotopenverhältnisse verdeutlichen. Die dargestellten Kurven schwingen um den Median der Basiswerte der vor-Wettkampf Proben, während des Wettkampfes werden erhöhte Werte und nach dem Wettkampf, in der Erholung, sowohl erhöhte als auch erniedrigte Werte gefunden. Die Auslenkung der Kurven ist bei den drei Probanden unterschiedlich groß ausgeprägt, auch die Abnahme pro Zeiteinheit nach dem Maximum während des Wettkampfes ist nicht gleich groß, sondern nimmt von Proband 2 über Proband 1 nach Proband 3 hin ab. Generell zeigt Proband 3 die geringsten Amplituden, die schnellste Aufeinanderfolge von Minima und Maxima und auch die höchsten  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte sowohl während als auch nach dem Wettkampf.

**Tab. 17:** Zeitpunkte der maximalen und minimalen  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des urinären Harnstoffes und Zeitspanne zwischen den ersten Maxima und Minima sowie die dazu gehörenden  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte.  $\delta^{15}\text{N}/t$  beschreibt den durchschnittlichen Abfall der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte pro Stunde zwischen ersten Maximum und Minimum.

	Proband 1	Proband 2	Proband 3
$t_{\text{Maximum}}$ [h]	10,3	15,0	7,0
$t_{\text{Minimum}}$ [h]	45,3	60,3	33,0
$\Delta t$ [h]	35,0	44,7	26,0
$\delta^{15}\text{N}_{\text{Maximum}}$ [‰]	5,15	5,34	5,23
$\delta^{15}\text{N}_{\text{Minimum}}$ [‰]	3,88	3,37	4,65
$\Delta\delta^{15}\text{N}$ [‰]	1,27	1,97	0,58
$\delta^{15}\text{N}/t$ [‰/h]	-0,039	-0,044	-0,022

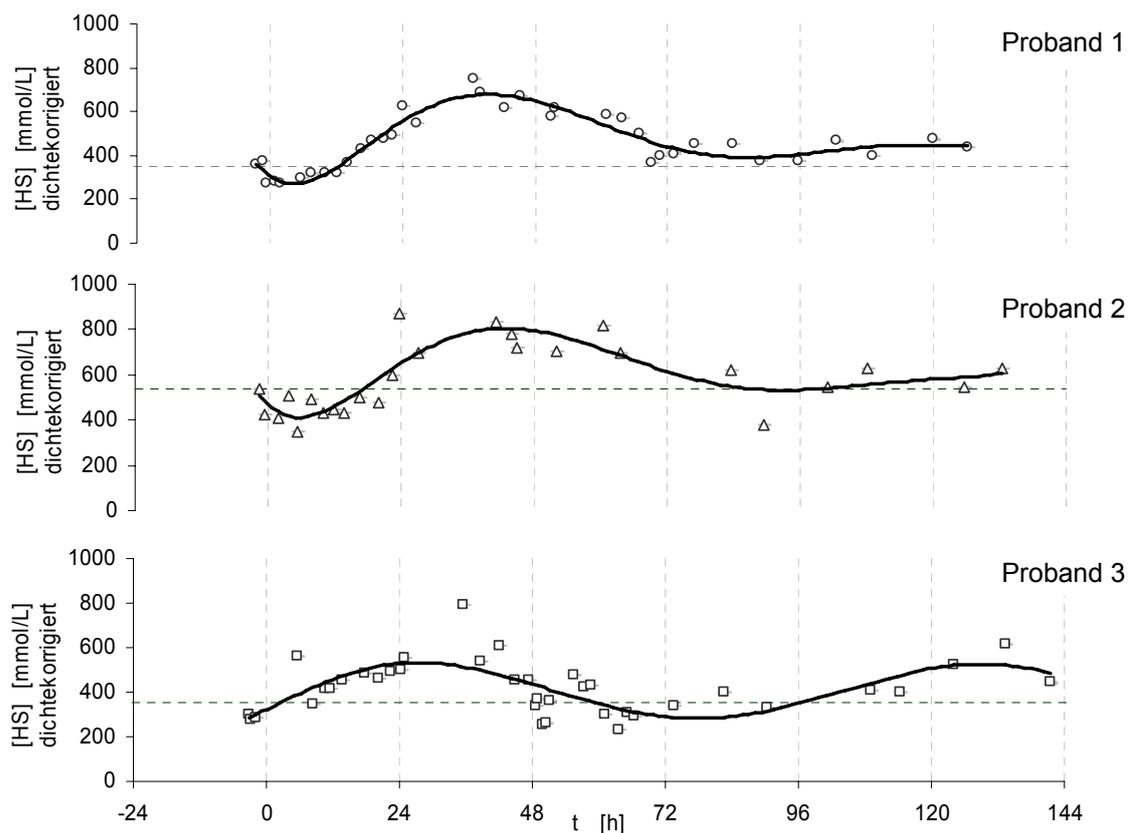
Alle drei Probanden zeigen für den Harnstoff maximale  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von 5,16 bis 5,53 ‰. Auch bei Vorversuchen konnten keine höheren  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff im Urin bei oder kurz nach körperlicher Belastung gefunden werden. Es scheint ein 'physiologische' Grenze hinsichtlich der Stickstoffisotopenverhältnisse des Harnstoffes zu bestehen, die auch im Rahmen einer körperlichen Belastung nicht überschritten werden kann. In der Literatur findet sich für die Aminosäuren Glutamin und Glutaminsäure, zusammen isoliert aus Kopfhaar, für eine Population von insgesamt 116 Probanden (Omnivoren, Vegetarier und Veganer) ein durchschnittlicher  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von  $14,3 \pm 1,9$  ‰ [130]. Glutamin macht über die Hälfte der freien Aminosäuren im Skelettmuskel und 20 % der Aminosäuren im Blut aus, und hat eine wichtige Funktion als Stickstofftransporter zwischen den Organen [10]. Glutaminsäure ist ein direkter Vorläufer des Harnstoffzyklus, wobei eine Aminogruppe von der Glutaminsäure auf Asparaginsäure übertragen wird. Für diese Reaktion wird in der Literatur ein Fraktionierungsfaktor von 8,3 ‰ angegeben [131]. Berücksichtigt man diesen Fraktionierungsfaktor bei der Bildung des Harnstoffes, so ergibt sich ein maximaler  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert für den Stickstoff des Harnstoffes von 6,0 ‰. Außer für Prolin (15,6 ‰) liegen alle  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der weiteren Aminosäuren unterhalb des  $\delta^{15}\text{N}$ -Wertes von Glutaminsäure [130]. Von daher läge der maximal zu erwartende  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert des Harnstoffes (bei alleinigem Abbau von Glutamin/Glutaminsäure) bei ca. 6 ‰. Da aber mit Sicherheit auch andere Aminosäuren mit niedrigeren  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten abgebaut werden müssen die  $\delta^{15}\text{N}$  Werte von Harnstoff im Urin ebenfalls unterhalb von 6 ‰ liegen.

Von den Probanden liegen keine Daten zu den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten der verschiedenen Aminosäuren vor, von daher lassen sich die Veränderungen der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes über die Zeit nicht näher hinsichtlich der eventuell abgebauten Aminosäuren untersuchen. Allerdings können die bei allen drei Probanden erreichten Maxima der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes während oder kurz nach dem Rennen durch den Abbau des Glutamins/der Glutaminsäure ansatzweise erklärt werden, da bei körperlicher Belastung der Abbau von Glutamin verstärkt abläuft und die Konzentration von Glutamin im Blut stark abnimmt [10]. Bei längerer körperlicher Belastung und beim Abbau von Muskelprotein werden ebenfalls verstärkt die verzweigten und isotopisch ebenfalls relativ schweren Aminosäuren Leucin (10,7 ‰), Isoleucin (8,5 ‰) und Valin (14,0 ‰) abgebaut [10, 130], die wie

Glutamin/Glutaminsäure zu relativ hohen  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten des ausgeschiedenen Harnstoffes führen würden.

### 5.1.4.1 $\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zu den Harnstoffkonzentrationen

Neben den Isotopenverhältnissen des Stickstoffes wurden von den Urinen ebenfalls die Konzentrationen an Harnstoff bestimmt. Die Konzentrationen an Harnstoff vor dem Wettkampf wurden wieder als Basiswerte betrachtet. Während und nach dem Wettkampf zeigen die Urine der Probanden eine erhöhte Harnstoffausscheidung, die schon während des Rennens beginnt und ihren Höhepunkt deutlich nach Beendigung des Rennens erreicht.

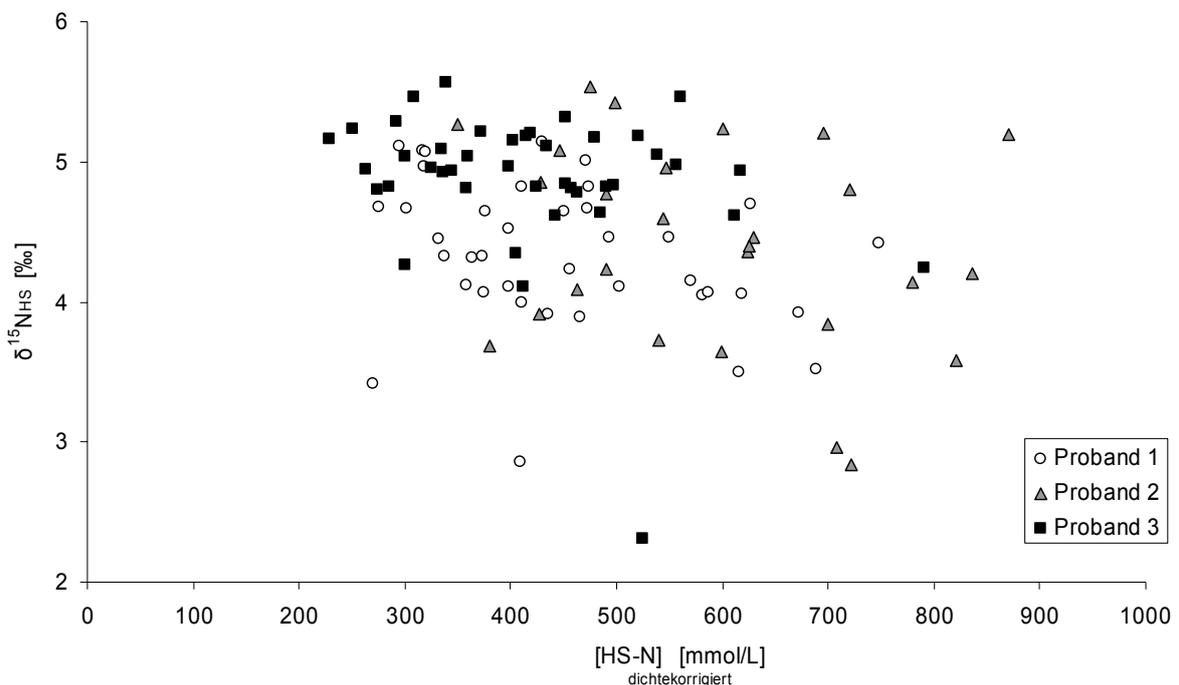


**Abb. 31:** Verlauf der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff aus Urin über einen Zeitraum bis 144 Stunden nach Start des 24-Stunden-Radrennens. Das Rennen startete bei  $t=0$  h und endete bei  $t=24$  h. Die gestrichelte horizontale Linie stellt den Median der vor dem Wettkampf genommenen Proben dar. Die schwarze Linie stellt ein Polynom 6. Grades dar, das an die jeweiligen Messpunkte angefügt wurde und die Interpolation der Zeitpunkte lokaler Minima und Maxima ermöglicht.

In Abbildung 31 sind die dichtekorrigierten Harnstoffkonzentrationen dargestellt. Diese entsprechen damit dem relativen Anteil des Harnstoffes an der Gesamtsubstanz im Urin und etwaige Einflüsse des Wasserhaushaltes (geringere Urinmenge nach dem Wettkampf) werden dadurch korrigiert. Diese erhöhten Harnstoffausscheidungen können auf die in der Literatur beschriebene vermehrte Aminosäureoxidation bzw. -abbau zurückgeführt werden, in deren Verlauf Ammoniak entsteht, der zu Harnstoff umgewandelt und aus dem Körper entfernt wird [132, 133].

Die Harnstoffausscheidung der Probanden nimmt um die Hälfte bis fast auf das Doppelte zu. Das Maximum der Ausscheidung liegt für alle drei Probanden nach dem Rennen, für Proband 3 bei 28 h, für Proband 1 und 2 bei 40 bzw. 42 h.

Vergleicht man die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes und die Harnstoffkonzentrationen, so lässt sich keine direkte Korrelation feststellen. Die Veränderungen der Stickstoff-Isotopenverhältnisse im Verlauf des Untersuchungszeitraumes lassen sich daher nicht nur mit einer vermehrten Ausscheidung von Harnstoff auf Grund erhöhter Aminosäure-Oxidation erklären.



**Abb. 32:** Vergleich der dichtekorrigierten Harnstoff-Stickstoff-Konzentration und zugehörige  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für die Proben aller drei Probanden über den gesamten Untersuchungszeitraum. Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes zeigen keine Korrelation mit den Konzentrationen.

So nehmen die Harnstoff-Konzentrationen bei Proband 1 und 2 zu Beginn des Rennens sogar leicht ab, wogegen bei Proband 3 keine niedrigeren

Harnstoffkonzentrationen in Vergleich zu den Basiswerten während des Rennens gefunden werden können.

Da sich die Veränderungen der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes nicht in direkten Zusammenhang zu den Harnstoffkonzentrationen bringen lassen, scheinen unterschiedliche Vorgänge im Metabolismus zu den jeweiligen Veränderungen beizutragen. Die Annahme, dass sich durch die Analyse der Stickstoffisotopenverhältnisse des urinären Harnstoffes weitere Aussagen zum Stickstoff-Metabolismus machen lassen können, wird dadurch bekräftigt.

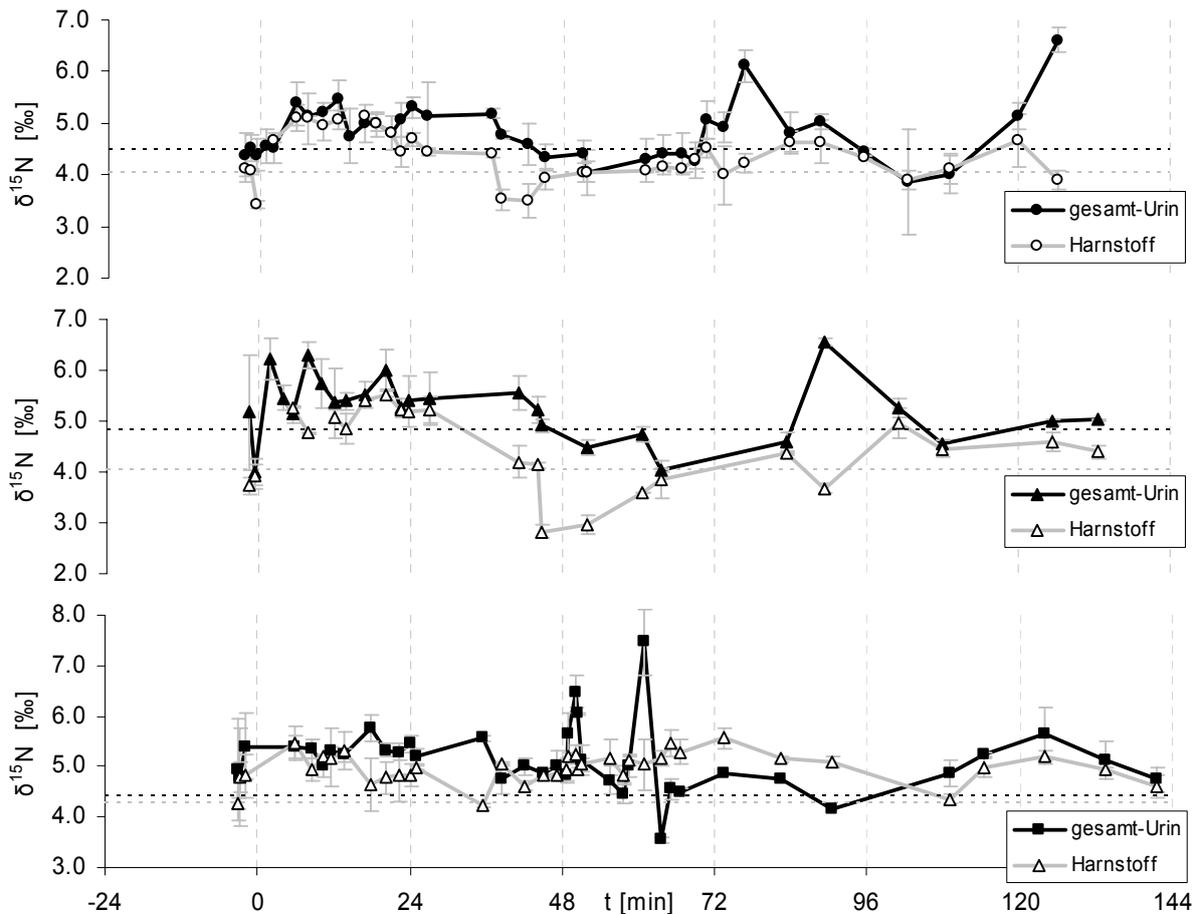
#### **5.1.4.2 $\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zum urinären Gesamtstickstoff**

Von allen Urinproben wurden auch die Stickstoffisotopenverhältnisse des urinären Gesamtstickstoffes bestimmt. Da Harnstoff den größten Teil des Stickstoffes im Urin ausmacht [15], lässt sich für die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Gesamt-Stickstoffes ein ähnliches Verhalten über den Untersuchungszeitraum erwarten. Allerdings finden sich für die Urine der drei Probanden leicht unterschiedliche Verläufe der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff und Gesamtstickstoff. Bei 44-74 % der Urinproben, betrachtet für die jeweiligen Probanden, stimmen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff und Gesamtstickstoff innerhalb der Messpräzision überein (Tabelle 18). Bei dem Rest der Urinproben ist der Harnstoffstickstoff isotopisch signifikant leichter (stärker angereichert an  $^{15}\text{N}$ ) als der Gesamtstickstoff. Eine Ausnahme davon findet sich allerdings bei Proband 3 bei 16 % der Urinproben in der Erholungsphase, wo der Harnstoffstickstoff isotopisch signifikant schwerer ist als der Gesamtstickstoff.

Da Harnstoff der organische Hauptbestandteil des Urins ist und 50-95 % des Gesamtstickstoffes ausmacht, wird die Stickstoffisotopie des Gesamt-Urins natürlich durch die Stickstoffisotopie des Harnstoffes dominiert. Sofern aber andere Substanzen, die sich deutlich in den Stickstoffisotopenverhältnissen vom Harnstoff unterscheiden, vermehrt mit dem Urin ausgeschieden werden, kann es zu einem signifikanten Unterschied in den Stickstoffisotopenverhältnissen zwischen Harnstoff und Gesamt-Urin kommen.

In Abbildung 33 erkennt man, dass die Urine, in denen es zu signifikanten Unterschieden in den Stickstoffisotopenverhältnissen kommt, sich meistens über

einen mehrstündigen Zeitraum erstrecken und nicht als Einzelwerte über den Untersuchungszeitraum verteilt sind. Somit scheint es sich bei diesen Phasen und bei dem Unterschied in den Stickstoffisotopenverhältnissen um physiologische Prozesse zu handeln, die entweder zu einer Änderung der ausgeschiedenen Menge der isotopisch schwereren Substanz oder zu einer Änderung der Stickstoffisotopie der Substanz durch Isotopenfraktionierung bei gleich bleibender ausgeschiedener Menge führen.



**Abb. 33:** Verlauf der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff-Stickstoff und Gesamtstickstoff des Urins über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien stellen die Basiswerte aus der vor-Wettkampf-Woche dar.

Neben den Harnstoffkonzentrationen wurden von allen Urinproben der Probanden auch noch die Konzentrationen von Ammonium, Kreatinin und Proteinen bestimmt. Zwar ändern sich auch die Konzentrationen für diese stickstoffhaltigen Substanzen über den Beobachtungszeitraum (Anhang 3), doch können diese nicht die Differenzen in der Stickstoffisotopie zwischen Harnstoff und Gesamturin erklären.

Die Differenz  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{GS-HS}}$  zwischen der Stickstoffisotopie des Gesamtstickstoffes (GS) und des Harnstoffes (HS) berechnet sich nach:

$$\Delta^{15}\text{N}_{\text{GS-HS}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{GS}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{HS}}$$

Es lässt sich keine direkte Korrelation zwischen  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{GS-HS}}$  und den einzelnen Konzentrationen der stickstoffhaltigen Substanzen feststellen. Neben den genannten Substanzen befinden sich noch weitere organische stickstoffhaltige Substanzen im Urin. Um deren Konzentration näherungsweise bestimmen zu können, wurde für Proband 2 der Gesamtstickstoffgehalt der Urine per Elementaranalyse bestimmt. Aus der Differenz der Konzentration des Gesamtstickstoffes und den bestimmten Konzentrationen der stickstoffhaltigen Substanzen kann der prozentuale Anteil des nicht im Harnstoff, Kreatinin, Ammonium oder Protein gebundenen Stickstoffes berechnet werden.

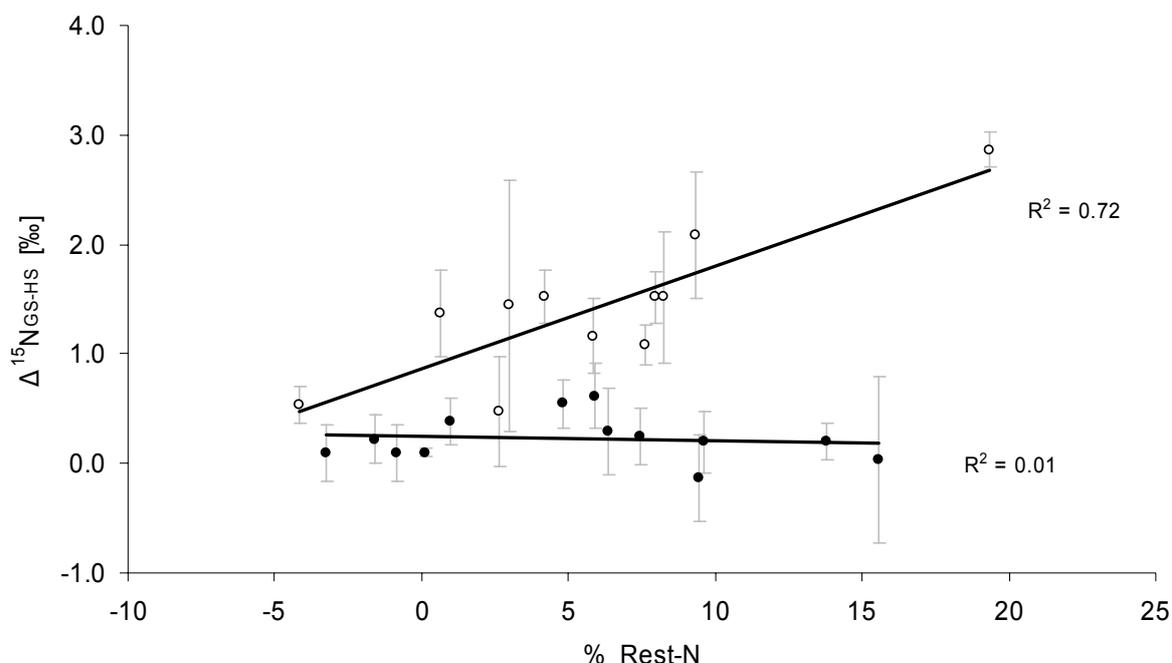
**Tab. 18:** *Prozentualer Anteil von Urinproben, deren  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Harnstoff entweder (innerhalb der Standardabweichung ( $1\sigma$ )) gleich, signifikant kleiner oder größer als die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Gesamt-Urins sind.*

	Proband 1	Proband 2	Proband 3
$\delta^{15}\text{N}_{\text{HS}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{GS}}$	74 %	44 %	61 %
$\delta^{15}\text{N}_{\text{HS}} < \delta^{15}\text{N}_{\text{GS}}$	26 %	56 %	24 %
$\delta^{15}\text{N}_{\text{HS}} > \delta^{15}\text{N}_{\text{GS}}$	-	-	16 %

Betrachtet man für Proband 2 die beiden Populationen von Urinen, bei denen sich die Stickstoffisotopie zwischen Harnstoff und Gesamtstickstoff entweder signifikant unterscheidet oder nicht (Tabelle 18) in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil des unbekanntes Stickstoff-Kompartimentes, so zeigt sich, dass bei beiden Populationen bis zu 15 bzw. 20 % des urinären Stickstoffes nicht von Harnstoff, Ammonium, Kreatinin oder Protein stammen. Tritt eine Differenz zwischen Stickstoffisotopie des Harnstoffes und des Gesamtstickstoffes auf, so korreliert diese mit dem Anteil des zusätzlichen ‚unbekanntes‘ Stickstoffes am Gesamtstickstoff ( $R^2 = 0,72$ ). Umgekehrt korreliert der Anteil des Rest-Stickstoffes nicht automatisch mit der Differenz der Stickstoffisotopie des Harnstoffes und des Gesamtstickstoffes.

Aus dieser Betrachtung lässt sich schließen, dass anscheinend über längere Zeiträume in der Erholung hinweg eine stickstoffhaltige Substanz mit einem deutlich von Harnstoff verschiedenen  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert vermehrt ausgeschieden wird (Urinproben

mit einer Abhängigkeit der  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{GS-HS}}$  von dem Anteil an Rest-Stickstoff). Zusätzlich dazu kann es zur vermehrten Ausscheidung eines Stickstoff-Kompartimentes kommen, dessen Stickstoffisotopenverhältnisse sich nicht deutlich vom Harnstoff unterscheiden (Urinproben, die keine Abhängigkeit der  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{GS-HS}}$  von dem Anteil an Rest-Stickstoff zeigen).



**Abb. 34:** Abhängigkeit der Differenz in den  $\delta^{15}\text{N}$  Werten zwischen Harnstoff und Gesamtstickstoff ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{GS-HS}}$ ) von dem Anteil an Rest-Stickstoff. Die Höhe der Differenz ist abhängig vom prozentualen Anteil des Rest-Stickstoffes, umgekehrt korreliert die Höhe des Anteils des Rest-Stickstoffes nicht automatisch mit der Differenz der Stickstoffisotopen. Die Datensätze lassen sich in zwei Populationen einteilen: Urine, die eine Abhängigkeit der  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{GS-HS}}$  vom Reststickstoff zeigen (o), und die Urine, die keine Abhängigkeit zeigen (●).

Als eventuelle, in der Erholung vermehrt ausgeschiedene, Substanzgruppe kämen Aminosäuren in Betracht. Da körpereigener Stickstoff im Vergleich zum Harnstoffstickstoff isotopisch schwerer ist [99], könnte ein relativer Anstieg der Aminosäurekonzentrationen im Vergleich zu den Harnstoffkonzentrationen die Unterschiede in den Stickstoffisotopenverhältnissen erklären. Die verstärkte Aminosäureoxidation während körperlicher Belastung, die zum Anstieg der Harnstoffkonzentrationen führt, hat das Ziel der Bereitstellung von Kohlenstoffkörpern für den Energiestoffwechsel des Organismus [10]. Da der Teil der Urinproben mit einer Differenz in der Stickstoffisotopie des Harnstoffes und des Gesamtstickstoffes und eines vermehrten Anteils des Reststickstoffes nach dem

Wettkampf in der Erholung auftritt, könnte dies ein Zeichen für einen fortwährenden Abbau körpereigenen Proteins zu Aminosäuren sein, der aber auf Grund der beendeten körperlichen Belastung nicht mehr primär die Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten für den Metabolismus zum Ziel hat, sondern die Aminosäuren statt der Oxidation (und damit der Bildung von Ammoniak und Harnstoff) als Überschuss ausscheidet.

Eine weitere stickstoffhaltige Substanzgruppe, die nach Belastung vermehrt ausgeschieden wird, stellen die Purinbasen wie Harnsäure, Xanthin, Hypoxanthin und Allantoin als Abbauprodukte des Purinstoffwechsels dar [134]. Allerdings gibt es keine Anhaltspunkte für die Stickstoffisotopenverhältnisse der Purinbasen in der Literatur. Grundsätzlich liegen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für den urinären Harnstoff aber generell unter denen des körpereigenen Stickstoffes, so dass die Möglichkeit gegeben wäre, dass es sich bei der gesuchten Substanzgruppe um Purinbasen handelt. Zukünftige Studien zur urinären Stickstoffisotopie sollten daher diese beiden Substanzgruppen berücksichtigen.

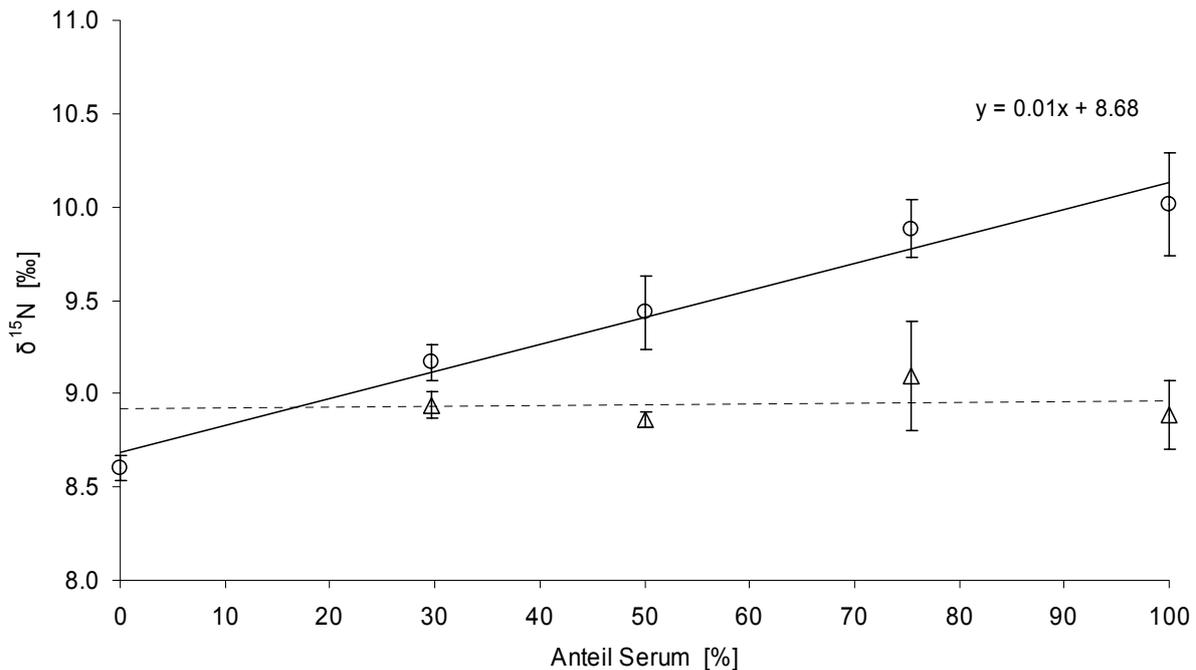
Für die bei Proband 3 beobachtete Umkehrung der Verhältnisse der Stickstoffisotopie des Harnstoffes und des Gesamtstickstoffes, die nur durch den Eintrag einer isotopisch noch leichteren Substanz begründet werden könnte, gibt es derzeit keine Erklärung. Was die experimentellen Daten dieser Urinproben hinsichtlich der Stickstoffisotopie des Gesamturins angeht, muss berücksichtigt werden, dass hier auf Grund von Problemen in der Aufbereitung (Verlust von aufgearbeiteten Proben) und mit dem EA-IRMS-System (letzte Messesequenz vor Wechsel des Oxidationsreaktors) nur Einfachmessungen zu Grunde liegen (Anhang 2) und daher ein systematischer Fehler nicht auszuschließen ist.

#### **5.1.4.3 $\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zu Serum-Proteinen**

In dem Untersuchungszeitraum wurde den Probanden zu fünf Zeitpunkten Blut abgenommen und hinsichtlich der Stickstoffisotopie der Serum-Proteine untersucht. Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Serum-Proteine werden als repräsentativ für die Stickstoffisotopenverhältnisse des metabolischen Aminosäurepools angesehen, da bei ihrer Synthese aus Aminosäuren keine Isotopenfraktionierung auftreten sollte [108, 130]. Die Serum-Proteine lassen sich durch Fällung mit Trichloressigsäure und

weiterer Aufarbeitung in zwei Fraktionen aufteilen und isolieren: In Globuline und Albumin [116, 117].

Die Methode zur Isolierung der Serum-Proteine für die IRMS wurde bereits im Tierversuch angewendet [108, 111], allerdings gab es auch hier keine Angaben hinsichtlich Richtigkeit der Methode für die Verwendung in der IRMS. Aus diesem Grund wurde Human-Serum aliquotiert und mit unterschiedlichen Mengen an Rinderalbumin (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, D) versetzt.

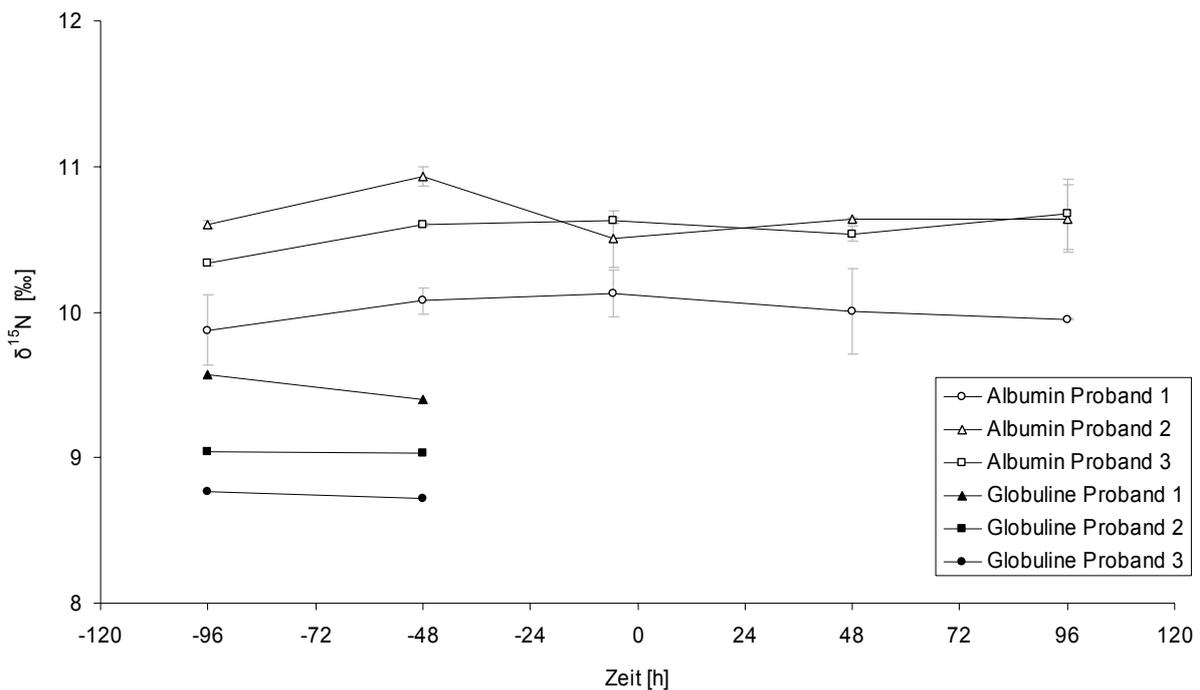


**Abb. 35:** Keeling-Plot für die Bestimmung des  $\delta^{15}\text{N}$  von Serumalbumin (o) und Serumglobulin ( $\Delta$ ). Zu humanem Serum wurden unterschiedliche Mengen an Rinderalbumin hinzugegeben, dessen  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert um 1,5 ‰ niedriger liegt als humanes Serumalbumin. Linear extrapoliert erhält man einen  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von 8,68 ‰ für das zugesetzte Rinderalbumin ( $8,60 \pm 0,06$  ‰). Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Serumglobuline werden durch die Zugabe des Rinderalbumins nicht beeinflusst (gestrichelte Linie = lineare Regression der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Globuline).

Neben der Überprüfung der Richtigkeit für Albumin konnte so auch eine eventuelle Beeinflussung der Globulin-Fraktion durch Albumin überprüft werden. In Abbildung 35 erkennt man die Veränderung der Stickstoffisotopenverhältnisse des Serum-Albumins hin zum  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert des Rinderalbumins sowie die konstanten, unbeeinflussten  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für die Globulin-Fraktion.

Von den je fünf Blutproben der drei Probanden wurde mit der überprüften Methode Albumin isoliert. Für je zwei Blutproben pro Proband konnten auch die

Globuline isoliert werden, bei den weiteren Proben stand auf Grund der geringen Probenmenge nicht genug Globulin für eine Analyse per EA-IRMS zur Verfügung. Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für das Serum-Albumin der drei Probanden liegen in einem relativ engen Bereich zwischen 9,88 und 10,97 ‰ und weisen für die einzelnen Probanden über den Zeitraum praktisch keine Unterschiede auf. Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte liegen für Proband 2 und 3 geringfügig höher als bei Proband 1, dies dürfte durch die ovo-lacto-vegetarische Ernährung der Probanden 2 und 3 begründet sein, die zu leicht erhöhten  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten gegenüber Omnivoren im Organismus führt [135].



**Abb. 36:**  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Serumalbumin und Serumglobuline der drei Probanden über den Untersuchungszeitraum. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede für die einzelnen Probanden.

Ansonsten zeigen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Serum-Albumins im Vergleich vor und nach dem Wettkampf keine belastungsinduzierten Veränderungen, was an der großen im Körper vorhandenen Menge an Albumin liegen dürfte (250-320 g bei einer Syntheserate von 14 g/Tag für einen 70 kg schweren Mann), durch die eventuelle Änderungen in der Stickstoffisotopie der Vorläufermoleküle abgepuffert werden.

Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für die Globuline liegen zwischen 1,15 und 1,55 ‰ niedriger als die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für das Albumin. Der Unterschied in den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten des Albumins und der Globuline könnte an unterschiedlichen Synthesorten bzw. Edukten liegen, da verschiedene Aminosäuren deutlich unterschiedliche  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte mit bis zu 15 ‰ Unterschied in einen Organismus mit ausgeglichenem Stoffwechsel (weder stark

katabol noch anabol) aufweisen können [130, 136]. Grundsätzlich liegen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für die Proteine durchaus in physiologisch sinnvollen Bereichen, wie Vergleiche mit Proteinen und Aminosäuren aus dem Tierversuch und vom Menschen zeigen [108, 130, 136]. Im Vergleich zu den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten des Harnstoffes liegen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Albumine im Mittel um 5,64 bis 6,23 ‰ höher. Für die einzelnen Probanden stimmen die Differenzen in den Stickstoffisotopenverhältnissen zwischen Harnstoff und Albumin innerhalb der Varianz ( $1\sigma$ ) der Gesamtmenge der Proben übereinander. Im Tierversuch bei Ratten hat sich gezeigt, dass sich die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Serum-Proteinen und Harnstoff hinsichtlich metabolischer Vorgänge ähnlich verhalten und eine Differenz in den Stickstoffisotopenverhältnissen zwischen 5 und 6,5 ‰ aufweisen [108].

Im Rahmen der Studie wurde während des Rennens von den Probanden Kapillarblut entnommen und vor Ort auf Blutgase und Elektrolyte untersucht (Kapitel 5.1.4.6). Die entnommene Menge an Kapillarblut war allerdings zu gering für die Isolierung von Albumin oder Globulinen für die IRMS.

**Tab. 19:** *Mittlere  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff und Albumin über den gesamten Untersuchungszeitraum für jeden Probanden und die Differenz der Stickstoffisotopenverhältnisse. Die Fehler geben die Varianz der Gesamtmenge der Proben wieder.*

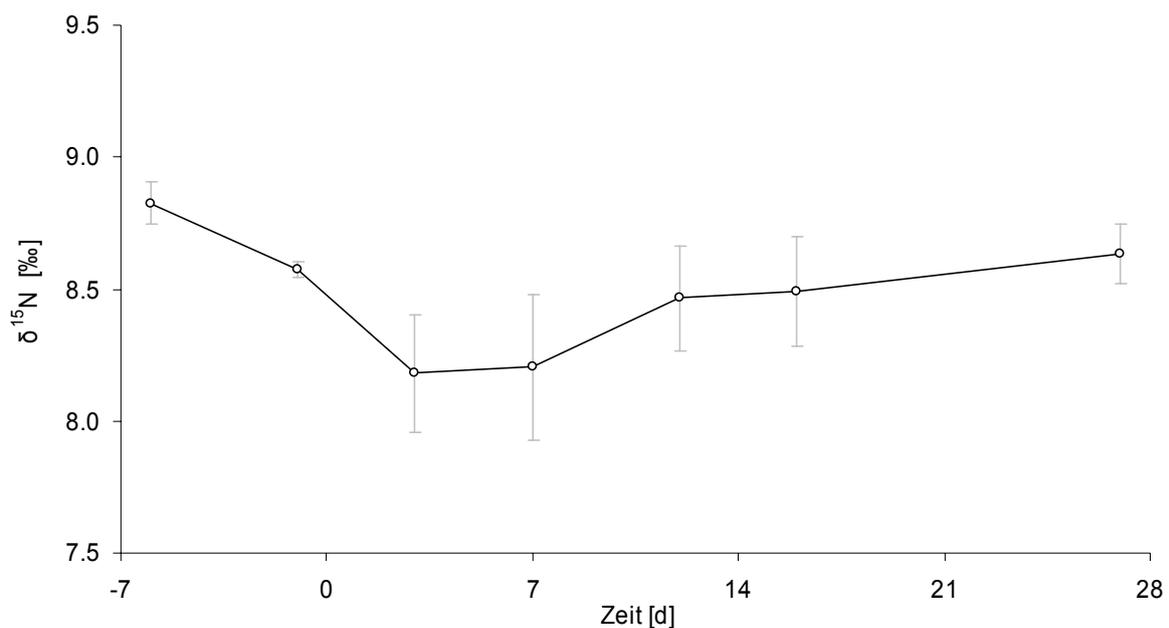
	$\delta^{15}\text{N}_{\text{HS}}$ [‰]	$\delta^{15}\text{N}_{\text{Albumin}}$ [‰]	$\Delta^{15}\text{N}_{\text{Alb.-HS}}$ [‰]
Proband 1	4,32 ± 0,51	10,01 ± 0,10	5,69 ± 0,52
Proband 2	4,40 ± 0,73	10,63 ± 0,16	6,23 ± 0,75
Proband 3	4,95 ± 0,52	10,59 ± 0,13	5,64 ± 0,54

#### 5.1.4.4 $\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zu Struktur-Proteinen

Ein weiteres Stickstoff-Kompartiment des Körpers, das in der Archäologie und Ökologie zur Interpretation von Ernährungsgewohnheiten aber auch von Stoffwechselfvorgängen herangezogen wird, stellen die Strukturproteine, wie das Keratin im Haar, dar [135, 136]. Änderungen im Stickstoff-(Protein-)Stoffwechsel zwischen ausgeglichenen, katabolen und anabolen Zuständen lassen sich durch Analyse der Stickstoffisotopie des Haares feststellen [13, 14]. In katabolen Zuständen schleust der Körper Muskelprotein, das sich auf Grund der trophischen

Verschiebung hinsichtlich der Stickstoffisotopie von den Nahrungsproteinen unterscheidet, in den Aminosäurepool ein [13, 99]. Da sich die Isotopensignatur des Aminosäurepools in den synthetisierten Proteinen wiederfindet und die im Haar eingebauten Proteine im Gegensatz zum Albumin-Pool des Körpers irreversibel gebunden sind, kann man durch Analyse der Stickstoffisotopie des Haares retrospektiv Aussagen über den Proteinstoffwechsel machen.

Proband 1 hat an sieben verschiedenen Tagen Barthaare gesammelt, die einen Zeitraum vom Tag des Rennens bis 35 Tage nach dem Rennen abdecken. Da Haar ungefähr sechs Tage benötigt, bis es aus der Haut herauswächst und abrasiert bzw. geschnitten werden kann, die Strukturproteine allerdings diese sechs Tage vorher in das Haar eingebaut wurden, muss die Zeitachse um sechs Tage nach links verschoben werden, um die Stickstoffisotopie des zur Verfügung stehenden Aminosäurepools zu dem Zeitpunkt des Einbaus ins Haar zu ermitteln [137].



**Abb. 37:**  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Barthaares für einen Probanden über den Untersuchungszeitraum. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  Tage war der Start des Rennens. Die angegebenen Fehler ( $\Delta\delta^{15}\text{N}$ ) stellen die Standardabweichung ( $1\sigma$ ) der drei Messungen dar.

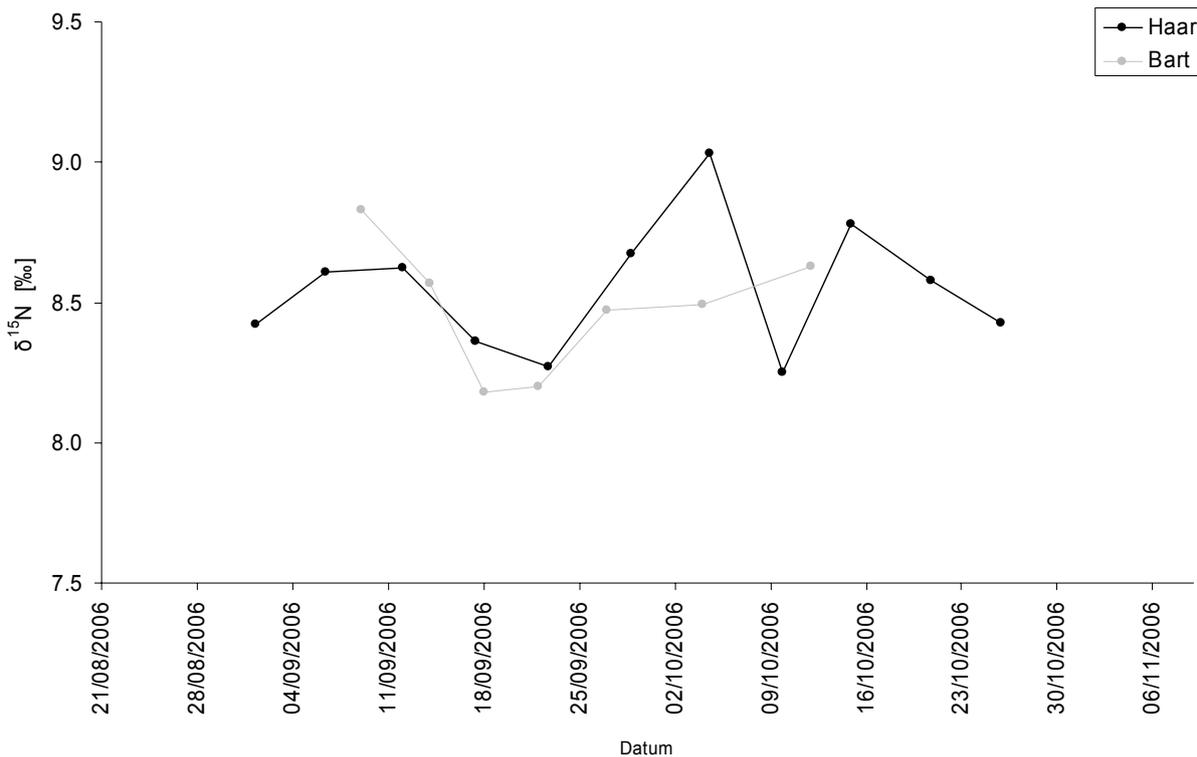
In Abbildung 37 erkennt man über den Untersuchungszeitraum zuerst einen Abfall der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Haares um 0,6 ‰, danach steigen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte fast wieder bis auf die Ausgangswerte an. Solche Änderungen in der Stickstoffisotopie des Haares können mit Änderungen im Stickstoff-Metabolismus einhergehen. So

wird eine Abnahme der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Haares mit einem anabolen Zustand erklärt, bei dem ein größerer Anteil an Nahrungsstickstoff in die Strukturproteine eingebaut wird [13, 14]. Hingegen wird ein Anstieg der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte mit einem katabolen Zustand in Zusammenhang gebracht, bei dem körpereigener Stickstoff vermehrt in die Strukturproteine eingebaut wird [13]. Unter Berücksichtigung dieser Interpretation hätte sich der Proband vor dem Rennen in einem anabolen Zustand und nach sieben Tagen nach dem Rennen in einem leichten katabolen Zustand befunden. Allerdings muss man berücksichtigen, dass die einzelnen Barthaarproben einen Zeitraum von  $5,5 \pm 2,7$  Tagen überspannen und die Zeitspannen kurzfristige Schwankungen verschleiern können.

Von dem Probanden wurde sechs Monate nach dem Rennen Kopfhaarproben genommen und die Stickstoffisotopie per EA-IRMS gemessen. Um die Zeitachse für die Interpretation der Daten genau festlegen zu können, war der Zeitpunkt des letzten völligen Abschneidens der Haare dokumentiert und es konnte so genau berechnet werden, wie schnell die Haare gewachsen waren und der Zeitraum des Wettkampfes bestimmt werden.

Legt man die beiden Verläufe der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für das Bart- und Kopfhaar übereinander, so erkennt man unterschiedliche Verläufe (Abbildung 38). Den Abfall der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte erkennt man sowohl im Bart- als auch im Kopfhaar, der Anstieg der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte ist beim Kopfhaar allerdings stärker ausgeprägt als beim Barthaar, gefolgt von einer Probe mit deutlich niedrigerem  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert.

Die Darstellung verdeutlicht die Probleme bei der Interpretation der Stickstoffisotopenverhältnissen von Haaren. Je nachdem wie groß das Segment des untersuchten Haares gewählt wird und wo die Schnittgrenzen gesetzt werden, können kurzfristige Änderungen der Stickstoffisotopenverhältnisse des Haares über den Zeitraum, den das Segment repräsentiert, verwischt werden. Trotzdem bietet die Analyse der Stickstoffisotopenverhältnisse des Haares Möglichkeiten, die zusätzlich zur Analyse der Stickstoffisotopenverhältnisse im Urin zur Interpretation von Stoffwechselfvorgängen herangezogen werden können.



**Abb. 38:** Vergleich der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Bart- und Kopfhaar für einen Probanden über den Untersuchungszeitraum. Übersichtlichkeitshalber wurden die Fehlerbalken weggelassen. Die beiden Kurven, die denselben Zeitraum abdecken, zeigen das Problem der Haaranalyse: Je nach Wahl des Schnittes und der Größe des Segmentes kann es zu deutlichen Unterschieden in den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten kommen. Zudem kommt es bei größeren Schnitten zu einer 'Verwischung' der Änderungen in der Stickstoffisotopie.

Im Vergleich zur Analyse der Stickstoffisotopie von Harnstoff ermöglicht die Analyse von Haaren eine retrospektive Interpretation, allerdings in einem zeitlich gesehen makroskopischen Bereich. Der Anstieg der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Haare und damit der vermutlich katabole Zustand fällt bei dieser Untersuchung in einen Bereich, in dem keine Urinproben mehr gesammelt wurden. Von daher können die Änderungen der Stickstoffisotopie im Haar nicht mit denen des urinären Harnstoffes verglichen werden.

Im Vergleich zu den Serum-Proteinen ist die irreversible Bindung der Aminosäuren in den Strukturproteinen des Haares besser zur Interpretation von Stoffwechselfvorgängen beim Menschen geeignet als die reversible Bindung in den Serum-Proteinen, die einem ständigen Auf- und Abbau unterliegen.

Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Haares stimmen innerhalb der Varianz mit den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten für die Globuline überein und liegen damit um 1,53 ‰ niedriger als das Serum-

Albumin. Diese Differenz in den Stickstoffisotopenverhältnissen zwischen Globulinen und Keratin gegenüber Albumin hat ihren Grund - wie bereits erwähnt - eventuell in verschiedenen Syntheseorten bzw. unterschiedlichen Stickstoffisotopenverhältnissen der eingebauten Aminosäuren.

**Tab. 20:** Mittlere  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff, Albumin, Globuline und Keratin über den gesamten Untersuchungszeitraum für Proband 1. Die Fehler geben die Varianz der Gesamtmenge der Proben wieder.

	$\delta^{15}\text{N}_{\text{HS}}$ [‰]	$\delta^{15}\text{N}_{\text{Albumin}}$ [‰]	$\delta^{15}\text{N}_{\text{Globuline}}$ [‰]	$\delta^{15}\text{N}_{\text{Keratin}}$ [‰]
Proband 1	$4,32 \pm 0,51$	$10,01 \pm 0,10$	$8,74 \pm 0,03$	$8,53 \pm 0,26$

#### 5.1.4.5 $\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zur Ernährung

Die Ausscheidung von Harnstoff ist neben dem Proteinstoffwechsel auch der Proteinzufuhr proportional. So sind die Harnstoffkonzentrationen bei proteinreicher Kost und negativer Stickstoffbilanz erhöht und unter anderem bei positiver Stickstoffbilanz erniedrigt [15]. Von daher ist es für die Interpretation der Stickstoffisotopenverhältnisse des urinären Harnstoffes wichtig, sowohl die Stickstoffbilanz abzuschätzen als auch Informationen über die Isotopenverhältnisse des zugeführten Stickstoffes zu gewinnen. Durch die Isotopenfraktionierung bei der Trans- und Desaminierung von Aminosäuren im Organismus ist der ausgeschiedene Stickstoff isotopisch leichter oder gleich dem mit der Nahrung zugeführtem Stickstoff [99, 108, 138].

Zur Bestimmung der Stickstoffbilanz der Probanden vor, während und nach dem Rennen wurde die zugeführte Menge an Eiweiß-Stickstoff pro Tag aus den Ernährungsprotokollen bestimmt (Anhang 5). Aus den Harnstoffkonzentrationen wurde die durchschnittliche Ausscheidung an Harnstoff-Stickstoff pro Tag berechnet. Bis auf die 24 Stunden des Wettkampfes wurden nicht zwingend alle Urinproben von den Probanden gesammelt und von daher lag das Gesamtvolumen an Urin und die Gesamtausscheidung an Harnstoff pro Tag nicht vor. Um die ausgeschiedene Menge an Urin abschätzen zu können, wurde mit Hilfe der Kreatininkonzentrationen auf den Urinfluss zurückgeschlossen. Die Kreatininausscheidung ist der Muskelmasse proportional und korreliert mit der Urinmenge [139]. Über einen

Datensatz von insgesamt 126 Urinproben, deren Kreatininkonzentrationen und der zu Grunde liegende Urinfluss bekannt waren [140], wurde der Urinfluss der Probanden zu dem jeweiligen Zeitpunkt der Urinabgabe berechnet (Anhang 4) und so die Ausscheidung an Stickstoff pro Stunde sowie die Stickstoffbilanz der Probanden bestimmt.

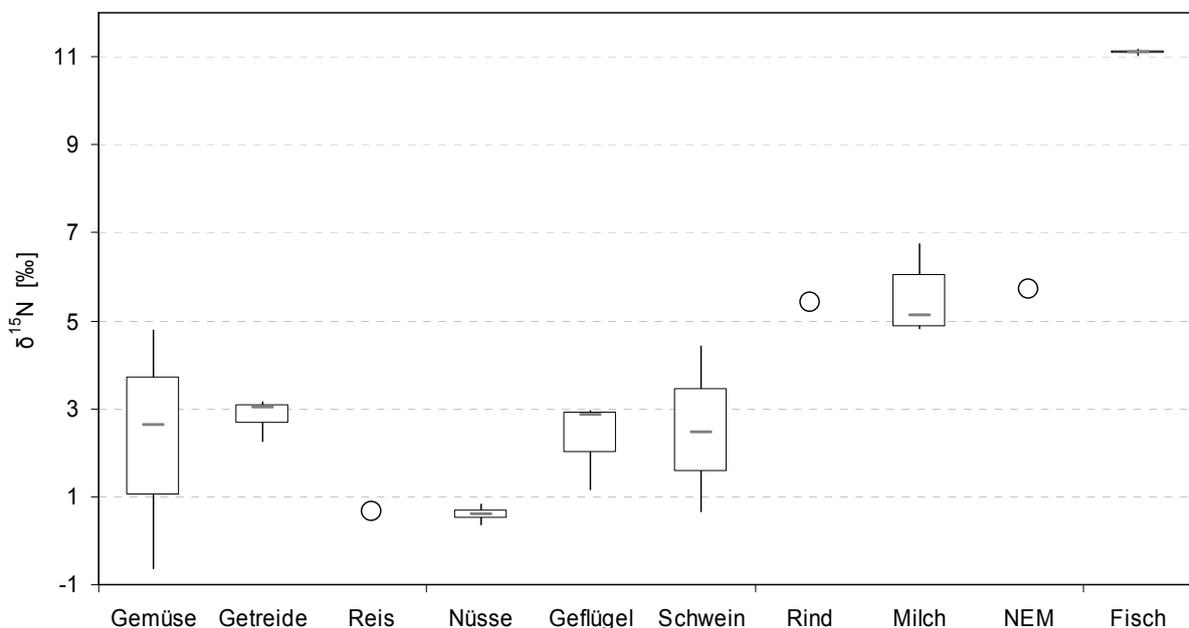
Bei allen drei Probanden war die Einnahme von Eiweiß mit der Nahrung während und nach dem Rennen im Vergleich zur Einnahme vor dem Wettkampf erhöht, genauso die absolut gesehenen Stickstoffausscheidungen. Die Stickstoffbilanz war bei allen Probanden während des Wettkampfes deutlich positiv, d.h. es wurde weniger Stickstoff ausgeschieden als aufgenommen. Unterschiedliche Entwicklungen können nach dem Rennen beobachtet werden. So erreicht Proband 3, der schon zu Beginn des Rennens eine negative Stickstoffbilanz aufwies, nach dem Rennen die am wenigsten positive Stickstoffbilanz. Dies entspricht der Definition nach einem schwach anabolen Zustand, wogegen Proband 2 eine deutlich positive Stickstoffbilanz (stark anaboler Zustand), auf Grund der geringen Ausscheidung an Stickstoff, aufweist. Proband 1 zeigt die geringsten Unterschiede in den drei Phasen des Untersuchungszeitraumes.

**Tab. 21:** Ermittlung der Stickstoffbilanz der einzelnen Probanden für die drei Phasen der Untersuchung. Zugeführtes Eiweiß wurde mit Hilfe der Ernährungsanalysesoftware EBISpro ermittelt, der ausgeschiedene Harnstoff-Stickstoff aus den Harnstoffkonzentrationen berechnet.

		zugeführter Eiweiß-Stickstoff (N) [g/d]	ausgeschiedener Harnstoff-Stickstoff (HS) [g/d]	Bilanz N/HS
Proband 1	vor-Wettkampf	17,2	15,0	0,87
	Wettkampf	45,0	27,3	0,61
	nach-Wettkampf	32,8	25,7	0,78
Proband 2	vor-Wettkampf	16,1	14,3	0,89
	Wettkampf	31,7	23,9	0,75
	nach-Wettkampf	36,2	16,1	0,44
Proband 3	vor-Wettkampf	17,4	20,7	1,19
	Wettkampf	42,0	30,0	0,71
	nach-Wettkampf	25,9	23,9	0,92

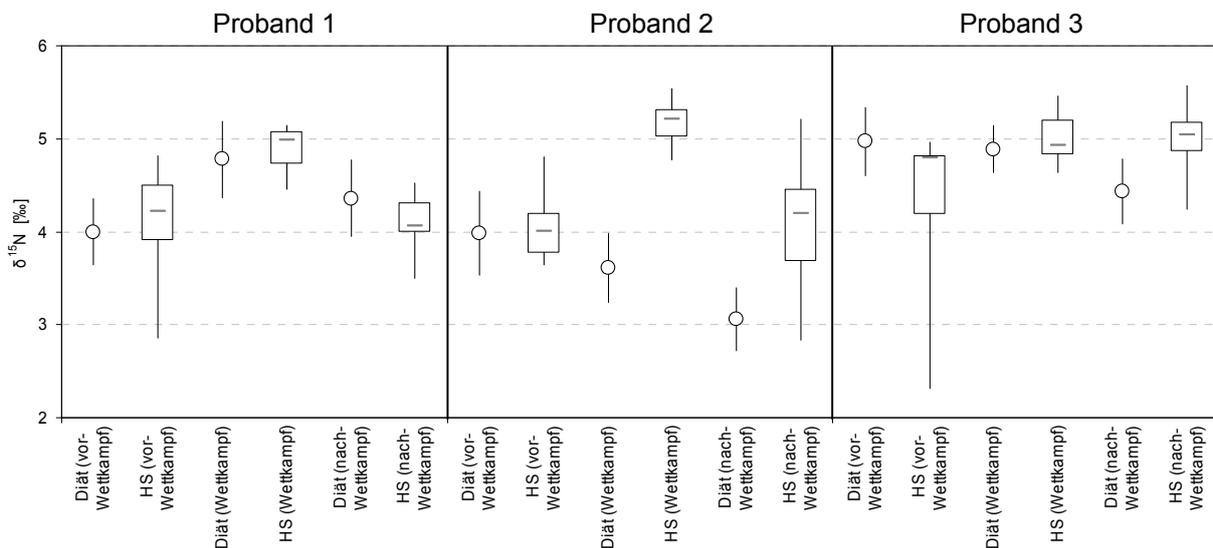
Die ermittelten Werte für die Stickstoffzufuhr und -ausscheidung sowie die Stickstoffbilanz sollen im Rahmen dieser Arbeit nur beispielhaft vorgestellt werden und werden in Kapitel 5.1.4.7 in das Modell zur Berechnung der Differenz zwischen Proteinsynthese und -abbau eingehen. Jedoch zeigt sich, dass die klassische Betrachtung des Ernährungszustandes und des Proteinstoffwechsels durchaus die Interpretation der Stickstoffisotopie verschiedener Kompartimente des Organismus unterstützen kann.

Neben der Menge an zugeführtem und ausgeschiedenem Stickstoff spielt die Stickstoffisotopie des zugeführten Proteins für die Interpretation der Stickstoffisotopenverhältnisse im Organismus eine wichtige Rolle [108, 130]. Mit Hilfe der angefertigten Ernährungsprotokolle vor, während und nach dem Rennen kann die Stickstoffisotopie des zugeführten Proteins durch Messung der Stickstoffisotopie von Nahrungsmittel-Aliquoten bestimmt werden. Da keine Aliquote der im Untersuchungszeitraum verzehrten Nahrung gesammelt wurden, wurden im Anschluss an die Studie ausgewählte Nahrungsmittel, aufgeteilt nach trophischen Stufen, exemplarisch per EA-IRMS analysiert. Soweit möglich, wurden die Lebensmittel derselben Marke untersucht.



**Abb. 39:**  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte verschiedener Nahrungsmittelgruppen, die von den Probanden während des Untersuchungszeitraumes verzehrt wurden. Die Box repräsentiert die mittleren 50 % der Proben, die Horizontale den Median, die Senkrechten die maximalen und minimalen Werte. Bei einzelnen Lebensmitteln ist nur ein Kreis dargestellt.

Die Nahrungsmittel wurden in zehn Gruppen unterteilt, die sich teilweise in der trophischen Stufe unterschieden. Da zwei der Probanden während des Untersuchungszeitraumes kein Fleisch gegessen haben, einer davon aber hauptsächlich Fisch als Eiweißquelle zu sich nahm, war die Unterscheidung in verschiedene trophische Stufen der Nahrung wichtig. Erwartungsgemäß zeigte Fisch die höchsten  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte, wogegen Reis und Nüsse die niedrigsten  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte hatten. Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Gemüse verteilen sich über einen Bereich von -0,64 bis 4,80 ‰. Eine so breite Streuung ist aus der Literatur bekannt und hat ihren Grund in dem unterschiedlichen Anteil an mineralischem oder organischem Dünger beim Anbau [95]. Geflügel und Schweinefleisch liegen in einem ähnlichen Bereich wie Gemüse, nur Rindfleisch und Milchprodukte weisen deutlich höhere  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte auf. Während des Rennens nahm Proband 2 ein Nahrungsergänzungsmittel (NEM) als Eiweiß-Quelle zu sich. Die Quelle des Eiweißes ist auf Grund der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte offensichtlich ebenfalls tierisch. Für die drei Untersuchungsphasen vor, während und nach dem Wettkampf wurden die Anteile der jeweiligen Nahrungsmittelgruppe am in diesem Zeitraum zugeführten Eiweiß mit Hilfe einer Ernährungsanalysensoftware (*EBISpro*, V. 7.0 von 2005) bestimmt und ein Summenwert für die Stickstoffisotopie des zugeführten Eiweißes für den jeweiligen Zeitraum berechnet.



**Abb. 40:** Vergleich der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Nahrung (o) mit denen des Harnstoffes (□) für die drei Phasen des Untersuchungszeitraumes (vor, während und nach dem Wettkampf). Die Boxen (Harnstoff) repräsentieren die mittleren 50 % der Proben, die Horizontale den Median, die Senkrechten die maximalen und minimalen Werte. Für die Nahrung wird der Mittelwert mit durch Fehlerfortpflanzung berechneten Abweichungen dargestellt.

Die Ernährung aller drei Probanden in dem Untersuchungszeitraum wies  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte zwischen 3,06 und 4,97 ‰ auf und unterscheidet sich damit deutlich voneinander. Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Ernährung für die einzelnen Probanden zeigen eine Varianz zwischen 0,29 und 0,46 ‰. Somit lassen sich über den Untersuchungszeitraum signifikante Unterschiede in der Ernährung der drei Probanden untereinander feststellen. Durch den Verzehr von Fisch weist Proband 3 die höchsten  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte auf, wogegen die fleisch- und fischlose Ernährung von Proband 2 die niedrigsten  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für die Nahrung aufweist.

Für Proband 1 liegen die mittleren  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes für alle drei Phasen des Untersuchungszeitraumes innerhalb der Streuung der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Ernährung in diesem Zeitraum. Dies könnte der Fall sein, wenn der Stickstoff-Metabolismus über den gesamten Zeitraum ausgeglichen gewesen wäre. Für zwei der drei Probanden finden sich allerdings signifikante Unterschiede zwischen den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten der Nahrung und den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten des urinären Harnstoffes. Bei Proband 2 liegen während des Wettkampfes die mittleren  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes 1,61 ‰ über denen der Ernährung, dies weist auf den Eintrag eines isotopisch schweren Kompartimentes bei der Synthese des Harnstoffes hin. Dies könnte ein Hinweis auf einen katabolen Zustand sein, bei dem körpereigener Stickstoff mit einem höheren  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert als die Nahrung in den Stoffwechsel eingeschleust wird. Der Unterschied in den Stickstoffisotopenwerten findet sich auch noch in der Erholungsphase, allerdings nicht mehr so ausgeprägt.

Für Proband 3 liegen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes vor dem Wettkampf niedriger als die der Ernährung. Hier könnte ein anaboler Stoffwechsel der Grund sein, der zum Einbau von isotopisch leichterem Stickstoff im Harnstoff führt. Während des Rennens sind die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Nahrung und des Harnstoffes ähnlich, nach dem Rennen findet sich bei Proband 3 ein ähnlicher Zustand wie bei Proband 2, d.h. leicht erhöhte  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte im ausgeschiedenen Harnstoff, die auf den Eintrag von körpereigenem Stickstoff hinweisen.

Auf Grund der Komplexität des Stickstoff-Metabolismus des menschlichen Organismus ist eine genauere Interpretation dieser Daten schwierig. Wie groß der Einfluss der Ernährung auf die Stickstoffisotopie des Harnstoffes ist und in welcher Größenordnung metabolische Vorgänge im Körper dazu beitragen, kann aus den einzelnen Daten so nicht herausgelesen werden. Aus diesem Grund wird in Kapitel 5.1.4.7 ein Modell aufgestellt, in das auch die Daten der Ernährungsanalyse als

Eingangsdaten einfließen, und mit denen die Stickstoffisotopie des ausgeschiedenen Harnstoffes modelliert werden kann.

#### **5.1.4.6 $\delta^{15}\text{N}$ von Harnstoff im Vergleich zu physiologischen Parametern**

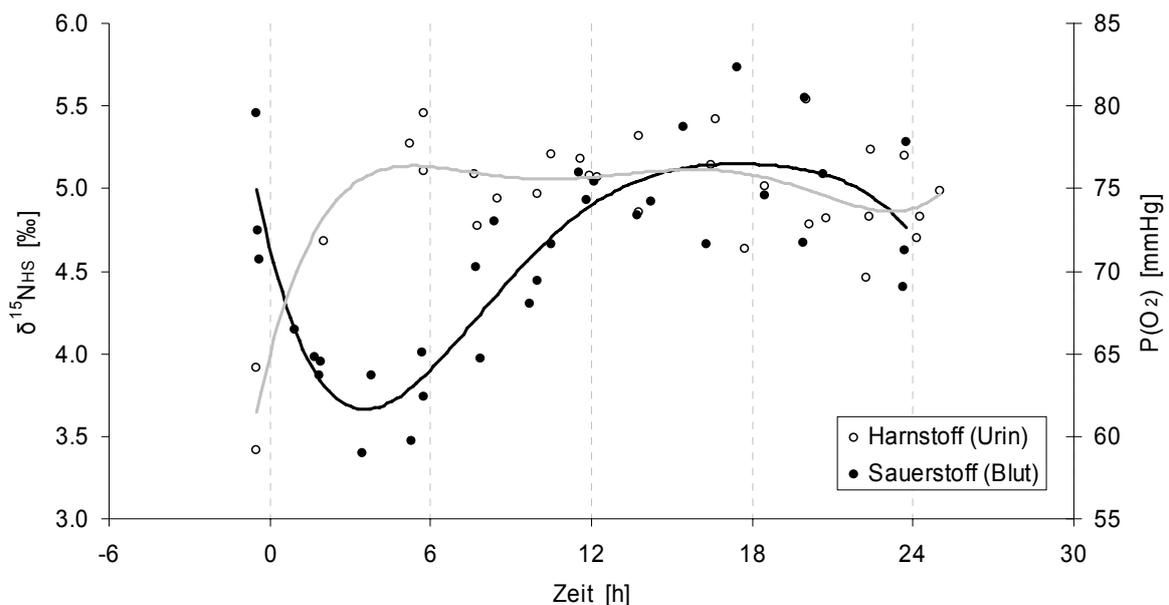
Im Rahmen des 24-Stunden-Radrennens wurde von den drei Probanden ca. alle zwei Stunden Kapillarblut entnommen und vor Ort hinsichtlich Blutgasen ( $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ) und Elektrolyten untersucht. Da körperliche Belastung zu metabolischen Veränderungen im Blut z.B. bezüglich der Sauerstoffbindung an Hämoglobin führt und diese als direkter Einfluss der verstärkten Muskelaktivität angesehen werden [10], wurden die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes während des Rennens mit den Ergebnissen der Blutgasanalyse verglichen. Damit sollten eventuelle Anhaltspunkte gewonnen werden, dass es sich bei den Veränderungen in den Stickstoffisotopenverhältnissen des Harnstoffes um belastungsinduzierte Veränderungen handelt.

Kapillarblut besteht zu 75 % aus venösem Blut, in dem bei starker körperlicher Anstrengung der Sauerstoffgehalt sinkt. Dieser Effekt lässt sich auch bei dem Kapillarblut aller drei Probanden feststellen. So sinkt der Sauerstoffpartialdruck des Blutes ( $P(\text{O}_2)$ ) der Probanden von zwischen 70 und 80 % vor dem Rennen auf 60 bis 65 % nach vier Stunden Renndauer. Danach steigt der Sauerstoffpartialdruck wieder auf Ausgangsniveau an. In dem Zeitraum, in dem der Sauerstoffpartialdruck auf Grund erhöhter Muskelaktivität und damit angeregtem Stoffwechsel absinkt, steigen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes an. Dies geschieht bei allen drei Probanden in ähnlichem Umfang.

Während das Minimum des Sauerstoffpartialdruckes nach 3,5 Stunden erreicht wird, erreichen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes ihr Maximum erst zwei Stunden später nach ca. 5,5 Stunden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert des Harnstoffes einen Zeitintegrierten Summenparameter seit der letzten Urinprobe darstellt. Von daher liegt das eigentliche Maximum der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte im Körper (der Synthesezeitpunkt des Harnstoffes) früher und weiter links auf der Zeitskala, so dass Minimum des Sauerstoffpartialdruckes und Maximum der Stickstoffisotopie des Harnstoffes annähernd zusammenfallen. Es lässt sich zwar

keine direkte Korrelation zwischen den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten des Harnstoffes und dem Sauerstoffpartialdruck erkennen, doch fallen die Zeiträume ihrer größten Änderungen beim Rennen genau aufeinander. Von daher liefert der Vergleich der Blutparameter und der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes einen Hinweis darauf, dass es sich bei den Änderungen in der Stickstoffisotopie zu Beginn des Radrennens um belastungsinduzierte Veränderungen handeln kann.

Allerdings entwickeln sich die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes und der Sauerstoffpartialdruck des Kapillarblutes nach den ersten sechs Stunden wieder unterschiedlich. Während der Sauerstoffpartialdruck wieder auf das Ausgangsniveau ansteigt und somit die Veränderungen anscheinend kompensiert werden, verbleiben die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte auf erhöhtem Niveau. Von daher kann man nicht von einer direkten Verbindung dieser beiden Parameter ausgehen.



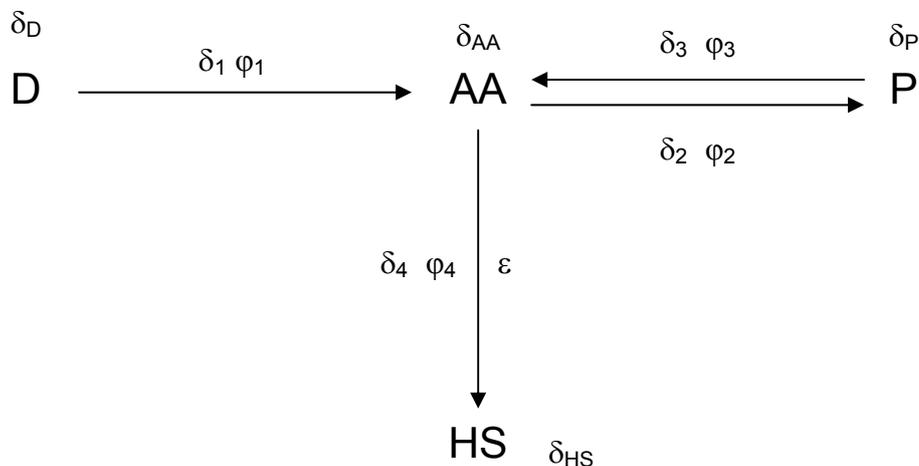
**Abb. 41:** Vergleich der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff (o) mit dem Sauerstoffpartialdruck des Kapillarblutes ( $P(\text{O}_2)$ , •), zusammengefasst für alle Probanden während des Zeitraumes des Rennens. Auffällig sind der fast parallele Anstieg der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes und der Abfall des Sauerstoffpartialdruckes auf Grund der erhöhten körperlichen Aktivität. Zur Verdeutlichung sind durch die Datenpunkte Polynome 6. Grades gelegt.

Studien im Labor unter kontrollierten Bedingungen sollten die beobachteten Veränderungen verifizieren. Der hier vorgestellte Vergleich des Sauerstoffpartialdruckes im Kapillarblut mit den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten des Harnstoffes soll nur

beispielhaft darstellen, dass mit Hilfe der klassischen Parameter der Sportdiagnostik eventuell die Ursachen der Änderungen der Stickstoffisotopenverhältnisse im Urin erklärt werden könnten.

#### 5.1.4.7 Modell zur Erklärung der belastungsinduzierten Änderungen der $\delta^{15}\text{N}$ von urinärem Harnstoff

Der endogene Protein- bzw. Aminosäurestoffwechsel lässt sich schematisch in vier Stoffströme unterteilen. Im Verdauungstrakt werden die durch die Nahrung (D) zugeführten und die von den Darmzellen sezernierten Proteine aufgenommen und dem körpereigenen 'Aminosäurepool' (AA) zugeführt ( $\varphi_1$ ) [99]. Von diesem Aminosäurepool aus werden benötigte Proteine (P) synthetisiert ( $\varphi_2$ ) sowie diesem auch durch Abbau zugeführt ( $\varphi_3$ ). Der Hauptabbauweg der Aminosäuren besteht nach der Aminosäureoxidation in der Bildung von Harnstoff (HS), der mit dem Urin ausgeschieden wird ( $\varphi_4$ ).



**Abb. 42:** Schematische Darstellung des Protein- bzw. Aminosäurestoffwechsels im menschlichen Körper.  $\varphi_i$  bezeichnet die Stoffflüsse des schweren Isotops  $^{15}\text{N}$ ,  $\delta_i$  das Isotopenverhältnis des Kompartimentes bzw. des fließenden Stoffes,  $\varepsilon$  ist eine auftretende Isotopenfraktionierung. D = Diät, AA = Aminosäuren(pool), P = Proteine, HS = Harnstoff

Die Aminosäureoxidation ist mit einem kinetischen Isotopeneffekt verbunden, der zu einer Isotopendiskriminierung gegenüber dem schweren Stickstoff führt [99, 131]. Aus diesem Grund ist der im Harnstoff ausgeschiedene Stickstoff leichter als der

zurückbleibende (in Aminosäuren gebundene) Stickstoff sowie die daraus synthetisierten körpereigenen Proteine [99, 130]. Für die Aufnahme des Nahrungsstickstoffes und die Synthese oder den Abbau von Proteinen über den Aminosäurepool werden in der Literatur keine Isotopenfraktionierungen angenommen.

Um die im Urin gefundenen  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff interpretieren zu können, wird im Folgenden dieses schematische Modell benutzt. In einem körperlichen 'steady state' befinden sich sowohl Stickstoff-Einnahme ( $\varphi_1$ ) und -Ausscheidung ( $\varphi_4$ ) als auch Proteinabbau ( $\varphi_3$ ) und -synthese ( $\varphi_2$ ) im Gleichgewicht und man kann eine Massenbilanz für das schwerere Isotop  $^{15}\text{N}$  unter Berücksichtigung der Stickstoffisotopie aufstellen [141]:

$$\varphi_1 \delta_1 + \varphi_3 \delta_3 = \varphi_2 \delta_2 + \varphi_4 \delta_4$$

Die Isotopenverhältnisse der Stoffströme ( $\delta_1, \delta_2, \dots$ ) lassen sich durch  $\delta_{\text{Edukt}} = \delta_i \varepsilon_i$  ausdrücken. Bei Reaktionen, bei denen keine Isotopenfraktionierung auftritt, ist  $\delta_{\text{Edukt}} = \delta_i$  [141]. Somit ergibt sich für die Massenbilanz:

$$\varphi_1 \delta_D + \varphi_3 \delta_P = \varphi_2 \delta_{AA} + \varphi_4 (\delta_{AA} - \varepsilon)$$

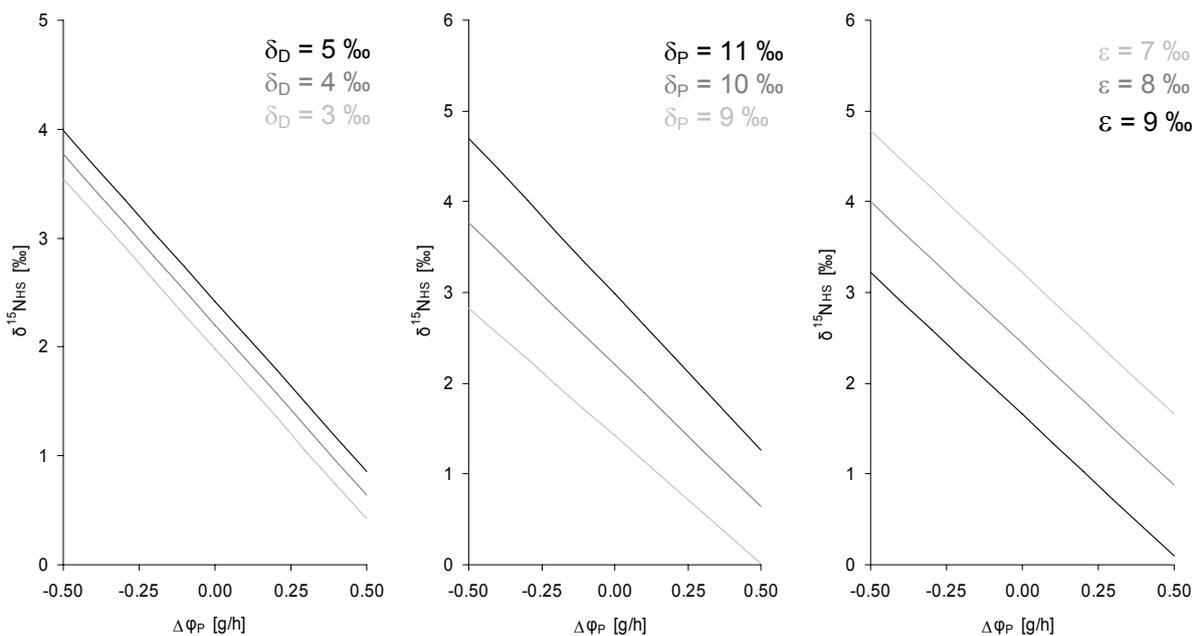
$$\Leftrightarrow \delta_{AA} = \frac{\varphi_1 \delta_D + \varphi_3 \delta_P + \varphi_4 \varepsilon}{\varphi_2 + \varphi_4}$$

Da der ausgeschiedene Harnstoff um  $\varepsilon$  ‰ leichter ist als der Aminosäurepool, kann man  $\delta_{\text{HS}}$  formulieren als:

$$\delta_{\text{HS}} = \frac{\varphi_1 \delta_D + \varphi_3 \delta_P + \varphi_4 \varepsilon}{\varphi_2 + \varphi_4} - \varepsilon$$

Die Differenz  $\varphi_2 - \varphi_3 = \Delta\varphi_P$  stellt das Gleichgewicht zwischen Proteinaufbau und Proteinabbau dar. Ist  $\Delta\varphi_P < 0$ , so überwiegt der Stofffluss  $\varphi_3$  und es wird mehr Protein ab- als aufgebaut (Katabolismus). Ist  $\Delta\varphi_P > 0$ , so überwiegt der Stofffluss  $\varphi_2$  und es wird mehr Protein auf- als abgebaut (Anabolismus).

In Abbildung 43 erkennt man die Abhängigkeit der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von den Eingangsdaten für positive oder negative Differenzen in den Stoffflüssen  $\varphi_2$  und  $\varphi_3$ . In das Modell wurden durchschnittliche physiologische Stoffflüsse für einen 70 kg schweren Mann eingesetzt ( $\varphi_1 = \varphi_4 = 0,7 \text{ g(N)/h}$ ,  $\varphi_2 = \varphi_3 = 2,5 \text{ g(N)/h}$  [142]), sowie typische  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für eine gemischte Diät ( $\delta_D = 4 \text{ ‰}$ ), körpereigene Proteine ( $\delta_P = 10 \text{ ‰}$ ) und ein Fraktionierungsfaktor von  $\varepsilon = 8,3 \text{ ‰}$ , der in der Literatur für die Transaminierung von Glutaminsäure auf Asparaginsäure angegeben wird [131].



**Abb. 43:** Abhängigkeit der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Harnstoff von der Differenz zwischen Proteinaufbau und Proteinabbau ( $\Delta\varphi_P = \varphi_2 - \varphi_3$ ), berechnet nach dem Modell in Abhängigkeit von verschiedenen  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten für die zugeführte Nahrung ( $\delta_D$ ), Serum-Proteine ( $\delta_P$ ) und vom Fraktionierungsfaktor  $\varepsilon$ . Negative  $\Delta\varphi_P$ -Differenzen bezeichnen katabole Zustände, positive Differenzen bezeichnen anabole Zustände.

Überwiegt der Proteinabbau gegenüber dem Proteinaufbau, so verschieben sich die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff auf Grund des größeren Anteiles an (schwerem) körpereigenem Protein im Aminosäurepool hin zu den schweren Isotopen. Umgekehrt wird bei einem vermehrten Proteinaufbau der Harnstoff-Stickstoff leichter. Das Modell liefert mit den angegebenen Werten physiologisch sinnvolle  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte, zeigt aber natürlich eine starke Abhängigkeit von den Eingangsdaten. Diese bewirken unterschiedlich große Unterschiede in den resultierenden  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten für Harnstoff.

Der Einfluss der Diät fällt auf Grund des verhältnismäßig geringen Stoffflusses ( $\varphi_1$ ) nicht so stark ins Gewicht wie der Beitrag der körpereigenen Proteine ( $\varphi_2$  und  $\varphi_3$ ). Grundsätzlich sind die angegebenen Werte aber nur ‚Richtwerte‘, da bis jetzt noch nicht geklärt ist, welchen  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert der Aminosäurepool bzw. die zur Verfügung stehenden körpereigenen Proteine haben. Unsicher ist ebenfalls der für die Fraktionierung angenommene Wert von  $\varepsilon = 8,3 \text{ ‰}$ , der nur die Transaminierung auf Asparaginsäure berücksichtigt [131]. Asparaginsäure liefert im Harnstoffzyklus nur eines der zwei Stickstoffatome des Harnstoffes. Ein Fraktionierungsfaktor für die Desaminierung von Aminosäuren, die zur Bildung von freiem Ammonium führt, worüber später der zweite Stickstoff in den Harnstoff eingebaut wird, ist bis dato noch nicht ermittelt worden.

**Tab. 22:** *In das Modell eingehende Stoffflüsse, Isotopenverhältnisse und Fraktionierungsfaktor, Beschreibung und Herkunft der eingesetzten Daten.*

Symbol	Beschreibung	Quelle
$\varphi_1$	Proteinaufnahme	Berechnet in 24h-Intervallen laut Ernährungsprotokoll
$\varphi_2$	Proteinsynthese	1,86-fache Menge der Proteinaufnahme [142]
$\varphi_3$	Proteinabbau	1,86-fache Menge der Proteinaufnahme [142]
$\varphi_4$	Stickstoffausscheidung	Ausgeschiedener Harnstoff-Stickstoff pro h
$\delta_D$	$\delta^{15}\text{N}$ der Diät	Experimentelle Daten nach Ernährungsprotokoll und Bestimmung von Diät-Aliquote
$\delta_P$	$\delta^{15}\text{N}$ körpereigenes Protein	Experimentelle Daten von Blut-Albumin in 48h-Intervallen
$\varepsilon$	Fraktionierungsfaktor	aus den Daten der vor-Wettkampf Woche berechnet

Verändert man in dem Modell den Fraktionierungsfaktor  $\varepsilon$ , so zeigt sich eine starke Abhängigkeit der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes. Bei einer Verringerung des Fraktionierungsfaktors werden die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes schwerer, bei einem größeren Fraktionierungsfaktor leichter.

Um abzuschätzen, inwiefern das Modell den Verlauf der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff während des Radrennens und in der Erholung erklären kann, wurde für jeden

Zeitpunkt einer Urinprobe durch numerische Iteration ein theoretischer  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert für den Harnstoff berechnet. In das Modell gingen die Stoffflüsse  $\varphi_1$  (Ernährung) ein, die aufgrund der angefertigten Ernährungsprotokolle abgeschätzt werden konnten sowie die experimentellen Daten der Harnstoffkonzentrationen als Umfang der Stickstoffausscheidung ( $\varphi_4$ ). Da die Umfänge an Proteinsynthese und Proteinabbau nicht bestimmt werden konnten, wurde in dem Modell angenommen, dass Proteinsynthese und -abbau 65 % des Gesamtumsatzes an Stickstoff ausmachen [142] unter der Annahme, dass weder Proteinsynthese noch Proteinabbau

überwiegen. In diesem 'steady state', der per Definition in die Woche vor dem Wettkampf gelegt wurde, kann ein Wert für den Fraktionierungsfaktor  $\varepsilon$  berechnet werden:

$$\varepsilon = \frac{\varphi_1 \delta_D + \varphi_3 \delta_P - \delta_P(\varphi_2 + \varphi_4)}{\varphi_2}$$

**Tab. 23:** Bestimmung des Fraktionierungsfaktors  $\varepsilon$  für die Isotopenfraktionierung des Stickstoffes bei der Harnstoffsynthese, berechnet nach Datensätzen aus der Vor-Wettkampf-Woche. Der Fehler zeigt die Streuung (1s) für die einzelnen Datensätze.

	$\varepsilon \pm 1s$
Proband 1 (n=6)	5,61 $\pm$ 0,34
Proband 2 (n=6)	5,97 $\pm$ 0,67
Proband 3 (n=6)	5,83 $\pm$ 0,36

Die berechneten Fraktionierungsfaktoren für die einzelnen Probanden liegen zwischen 5,61 und 5,83 ‰ und stimmen innerhalb der Standardabweichung der sechs Berechnungen überein. Der bestimmte Fraktionierungsfaktor unterscheidet sich deutlich von dem in der Literatur für die Transaminierung von Glutaminsäure auf Asparaginsäure angegebenen Fraktionierungsfaktor von 8,3 ‰ [131]. Allerdings muss man beachten, dass der angenommene  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert des körpereigenen Proteins, welches dem Abbau über Harnstoff zugeführt wird, wahrscheinlich zu niedrig gewählt ist, da die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Glutaminsäure für die drei Probanden nicht bekannt waren (siehe Seite 81). Allerdings liefert bei der Synthese von Harnstoff neben der Transaminierung auch die Desaminierung von Aminosäuren eines der Stickstoffatome. Von daher kann sich der 'Summen'-Fraktionierungsfaktor *in vivo* von dem für die Transaminierung in der Literatur angegebenen unterscheiden.

Der für den jeweiligen Probanden bestimmte mittlere Fraktionierungsfaktor aus der Woche vor dem Wettkampf wurde in der anschließenden Modellrechnung übernommen. Das Modell nimmt an, dass der Harnstoff der Stickstoff-Hauptbestandteil des Urins ist. Der Vergleich der experimentellen Daten der Stickstoffisotopie des Harnstoffes und des Gesamtstickstoffes zeigte aber, dass der Organismus, insbesondere in der Erholungsphase, größere Mengen einer stickstoffhaltigen Substanz mit einem deutlich von Harnstoff unterschiedlichen Isotopenverhältnis ausscheidet (Kapitel 5.1.4.2).

Um diese Substanz und deren Einfluss auf das Modell zu berücksichtigen, wurde das Modell um einen weiteren Stofffluss erweitert (Abbildung 44) und die Formel zur Berechnung der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes angepasst:

$$\delta_{\text{HS}} = \frac{\varphi_1 \delta_{\text{D}} + \varphi_3 \delta_{\text{P}} + \varphi_4 \varepsilon}{\varphi_2 + \varphi_4 + \varphi_?} - \varepsilon$$

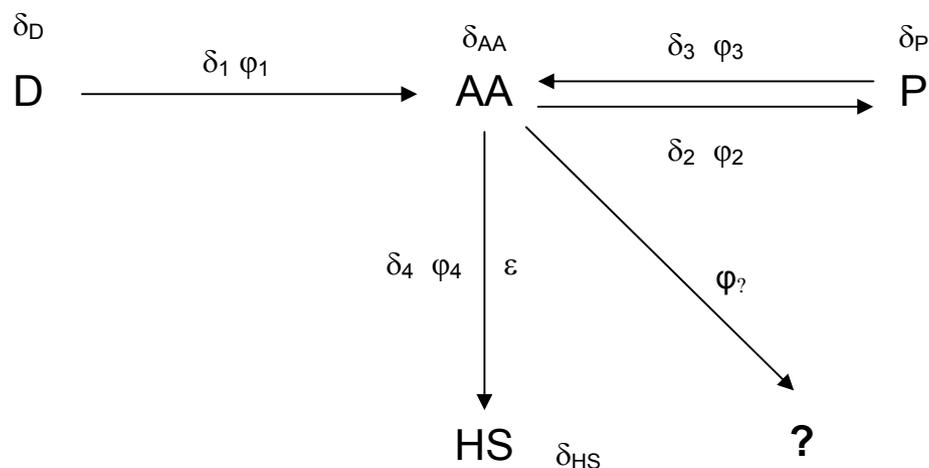
In der angegebenen Formel sind drei der Stoffflüsse unbekannt. Dies sind der Proteinaufbau ( $\varphi_2$ ), der Proteinabbau ( $\varphi_3$ ) und die Ausscheidung der 'unbekannten' stickstoffhaltigen Substanz ( $\varphi_?$ ). Um mit Hilfe der experimentellen Daten und insbesondere der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes Aussagen über eventuelle katabole oder anabole Zustände machen zu können, muss die Differenz  $\Delta\varphi_{\text{P}} = \varphi_2 - \varphi_3$  berechnet werden. Da sich der Eintrag der 'unbekannten' Substanz auf die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Gesamturins auswirkt und angenommen wird, dass es sich bei den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten der 'unbekannten' Substanz um die des Aminosäurepools handelt, kann man für das Stickstoffisotopenverhältnis des Gesamt-Urins ( $\delta_{\text{U}}$ ) formulieren:

$$\delta_{\text{U}} = \frac{\varphi_4 \delta_{\text{HS}}}{\varphi_? + \varphi_4} + \frac{\varphi_? \delta_{\text{P}}}{\varphi_2 + \varphi_4}$$

Da in diesem Modell mehr unbekannte Größen als mathematisch formulierte Beziehungen vorhanden sind, lässt sich das System nicht analytisch lösen. Für die einzelnen Probanden wurden so für jede Urinprobe durch numerische Iteration die Stoffflüsse  $\varphi_2$  und  $\varphi_?$  bestimmt, zur Vereinfachung wurde  $\varphi_3$  konstant gehalten<sup>1</sup>. Die

<sup>1</sup> Durch den konstant gehaltenen Stofffluss  $\varphi_3$  liegen faktisch nur noch zwei unbekannte Größen bei zwei formulierten Beziehung vor und das System wäre dadurch analytisch lösbar. Dies wurde

numerische Iteration wurde solange durchgeführt, bis der Unterschied zwischen den modellierten und experimentellen  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten des Harnstoffes kleiner 0,01 ‰ und für den Gesamtstickstoff kleiner 0,4 ‰ war. Da für  $\varphi_3$  ein konstanter willkürlich gewählter Wert angenommen wurde (65 % der Stickstoffaufnahme mit der Diät, [142]), kann das Modell auch nur relative Abweichungen von dieser Annahme liefern. Aus diesem Grund werden in den Abbildungen 45 bis 47 für  $\Delta\varphi_P$  auch nur die prozentualen Differenzen der Stoffflüsse zwischen Proteinauf- und -abbau angegeben, die aber mit katabolen oder anabolen Zuständen in Beziehung gesetzt werden können.



**Abb. 44:** Erweiterte schematische Darstellung des Protein- bzw. Aminosäurestoffwechsels im menschlichen Körper.  $\varphi_?$  bezeichnet den Stofffluss einer nicht identifizierten stickstoffhaltigen Substanz, die zu gewissen Zeitpunkten vom Körper in größeren Mengen ausgeschieden wird.

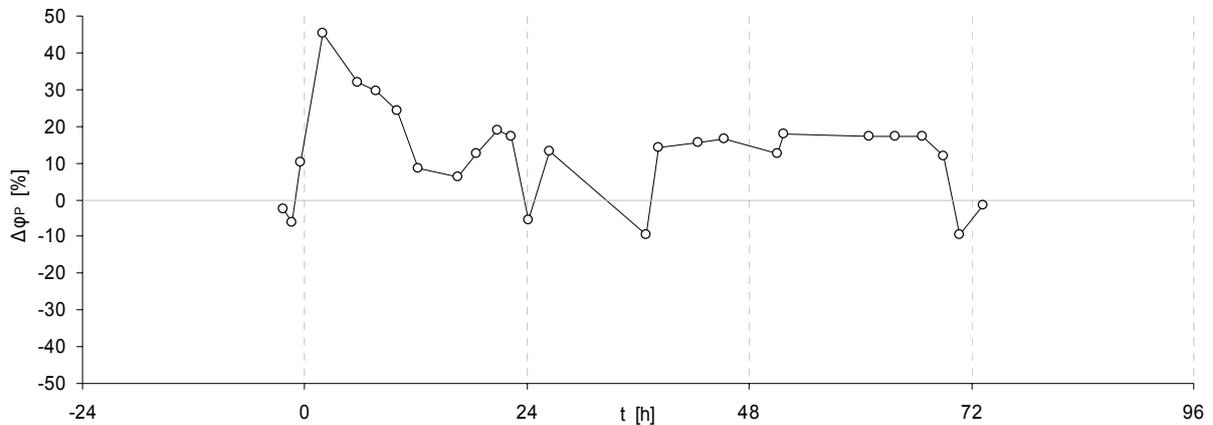
Das Modell berechnet die Daten für jede Urinprobe in einem angenommenen 'steady state' und soll vorerst nur zeigen, dass mit diesem einfachen Flussmodell die Änderungen in den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten des Harnstoffes mit Änderungen im Proteinmetabolismus in Zusammenhang gebracht werden können.

Für Proband 1 zeigt das Modell bis auf wenige Ausnahmen über den gesamten Zeitraum anabole Werte, d.h. einen größeren Umfang der Proteinsynthese als des Proteinabbaus. Da die Stickstoffbilanz von Proband 1 über den kompletten Zeitraum positiv ist (Tabelle 21), und die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes sich nur geringfügig von denen der zugeführten Nahrung unterscheiden (Abbildung 40), kann das Modell nur in Richtung eines anabolen Stoffwechsels, d.h. dem Einbau von Stickstoff in den

---

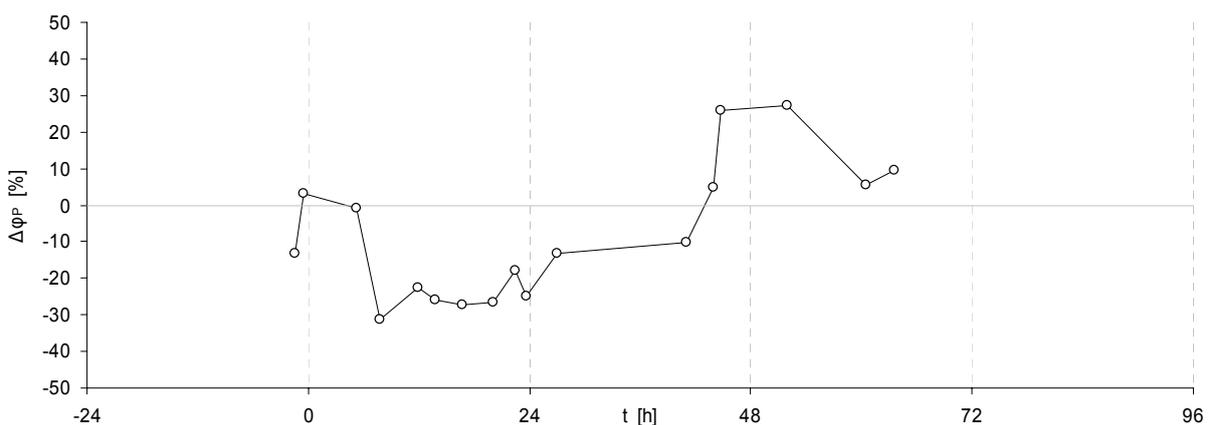
allerdings im Rahmen der Arbeit nicht durchgeführt, da das System durch die numerische Iteration hinreichend gut beschrieben werden konnte.

Körper reagieren. Der starke Anstieg von  $\Delta\varphi_P$  zu Beginn des Rennens auf eine fast 50 % höhere Proteinsynthese als Proteinabbau liegt an dem in das Modell eingehenden sprunghaften Anstieg an zugeführtem Nahrungsstickstoff laut Ernährungsprotokoll.



**Abb. 45:** Nach dem Modell berechnete prozentuale Anteil der Differenz  $\Delta\varphi_P$  der Stoffflüsse  $\varphi_2$  (Proteinsynthese) und  $\varphi_3$  (Proteinabbau) relativ zum 'steady state' vor dem Rennen für Proband 1. Positive Differenzen bezeichnen anabole Zustände, negative Differenzen katabole Zustände.

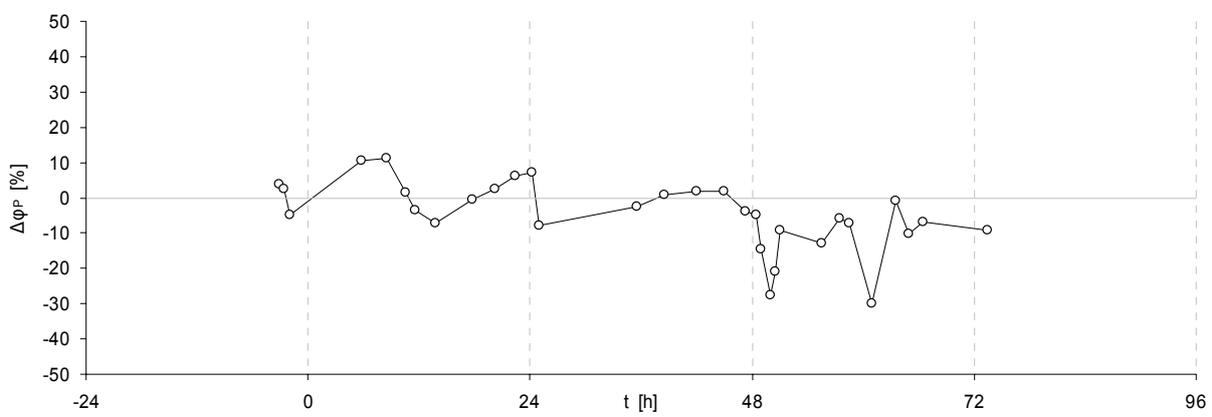
Im späteren Verlauf des Rennens und in den ersten Stunden nach dem Rennen wandelt sich laut dem Modell der Proteinmetabolismus zu einem fast katabolen Zustand, wird aber durch die hohe Proteinzufuhr während und nach dem Rennen abgefangen. Proband 2 zeigt einen anderen Verlauf für den Proteinmetabolismus als Proband 1.



**Abb. 46:** Nach dem Modell berechnete Differenz  $\Delta\varphi_P$  der Stoffflüsse  $\varphi_2$  (Proteinsynthese) und  $\varphi_3$  (Proteinabbau) relativ zum 'steady state' vor dem Rennen für Proband 2. Positive Differenzen bezeichnen anabole Zustände, negative Differenzen katabole Zustände.

Schon beim Vergleich der Stickstoffisotopenwerte der Nahrung und des Harnstoffes fiel auf (Abbildung 40), dass während des Wettkampfes anscheinend ein kataboler Zustand vorherrschte.

Das Modell kann die Unterschiede in den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten der Nahrung und des Harnstoffes nur durch den Eintrag von schwerem körpereigenen Stickstoff kompensieren, was zu einem berechneten Anstieg des Proteinabbaus oder Abfall der Proteinsynthese um 30 % während des Rennens führt. In der Erholungsphase nimmt dieser katabole Zustand ab und 24 Stunden nach dem Rennen befindet sich Proband 2 in einem anabolen Zustand.



**Abb. 47:** Nach dem Modell berechnete Differenz  $\Delta\varphi_P$  der Stoffflüsse  $\varphi_2$  (Proteinsynthese) und  $\varphi_3$  (Proteinabbau) relativ zum 'steady state' vor dem Rennen für Proband 3. Positive Differenzen bezeichnen anabole Zustände, negative Differenzen katabole Zustände.

Proband 3 zeigt während des Rennens sowohl katabole als auch anabole Phasen. Dies passt zu den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten der zugeführten Nahrung und des Harnstoffes (Abbildung 40), die im Mittel auch keine überwiegende Proteinsynthese oder -abbau zeigen. Nach dem Rennen befindet sich Proband 3 größtenteils in einem katabolen Zustand, was auch durch den Vergleich der Stickstoffisotopie von Nahrung und Harnstoff (Abbildung 40) als auch durch die Stickstoffbilanz (Tabelle 21) bekräftigt wird. Das Modell liefert für die Probanden und die untersuchten Zeiträume physiologisch sinnvolle Werte. Katabole und anabole Zustände können über die Differenz der Stoffflüsse  $\varphi_2$  und  $\varphi_3$  bestimmt werden. Über das Modell kann man Werte für das Verhältnis zwischen Proteinsynthese und -abbau berechnen. Natürlich sind die Ergebnisse nur so gut wie die Eingangsdaten. Insbesondere hinsichtlich der zeitlichen Auflösung sowie der Menge und der Stickstoffisotopenverhältnisse der Proteinaufnahme sind Verbesserungen nötig.

Trotzdem bestehen mit der Analyse der natürlichen Stickstoffisotopenverhältnisse urinärer Substanzen Möglichkeiten, explizit das Verhältnis zwischen Proteinsynthese und -abbau zu berechnen. Damit kann die hier vorgestellte Methode, die bisher in der Sportwissenschaft angewandten Verfahren zur Erforschung des Proteinmetabolismus, die sich entweder mit der klassischen Bestimmung der Stickstoffbilanz oder mit Hilfe markierter Substanzen der Proteinsynthese und dem Proteinabbau genähert haben [25-31], unterstützen.

## 5.2 Isolierung von Kreatin und Kreatinin aus dem Urin

### 5.2.1 Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden

In der Literatur finden sich verschiedene Methoden zur Isolierung von Kreatin und Kreatinin und zur Trennung der beiden Substanzen voneinander. Hierzu gehören Fällungsreaktionen z.B. mit Pikrinsäure [143] und Zinnchlorid [144], aber auch die *Reversed Phase* HPLC sowie die HPLC in Verbindung mit der Ionenaustausch-Chromatographie [113, 145]. Um eine geeignete Methode für die Isolierung von Kreatin und Kreatinin für die Analyse per EA-IRMS zu wählen, muss man sich vorher die Anforderungen, die eine ‚*bulk sample*‘ Analyse an die Aufreinigung stellt, genauer ansehen (Kapitel 2.5.1).

Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Systemkonfiguration des EA-IRMS benötigt man für eine ‚*bulk sample*‘ Analyse im Elementaranalysator eine Mindestmenge von 100 µg Kohlenstoff oder 100 µg Stickstoff für eine hinreichend präzise und richtige Analyse. Diese Menge entspricht einer Einwaage von 310 µg (für  $\delta^{13}\text{C}$ ) bzw. 355 µg (für  $\delta^{15}\text{N}$ ) Kreatin oder einer Einwaage von 273 µg bzw. 312 µg Kreatinin. Um eine Doppel- bzw. Dreifachbestimmung durchführen zu können, sollte damit ungefähr eine Ausbeute nach der Isolierung von 1000 µg Kreatin bzw. Kreatinin angestrebt werden. Normalerweise finden sich im menschlichen Urin Konzentrationen zwischen 0,5 und 1,5 mg/ml Kreatinin wieder [15], bei der Einnahme von Kreatin-Monohydrat können Konzentration über 1 mg/ml Kreatin in Urin gefunden werden. Bei normal konzentrierten Urinen wäre damit ein Mindestvolumen von einem Milliliter zur Isolierung einer hinreichend großen Menge an Kreatin bzw. Kreatinin nötig.

Um zu bestimmen, welche der Substanzen im Urin die Analyse der Isotopenverhältnisse des Kreatin und des Kreatinins beeinflussen könnten, muss man den Beitrag derselben zu einem eventuellen Fehler berücksichtigen. Bei einem zu akzeptierenden Beitrag von 0,1 ‰ von Verunreinigungen zum  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert des isolierten Kreatin bzw. Kreatinins und einer maximalen Differenz der Isotopenverhältnisse von Kreatin bzw. Kreatinin und Verunreinigung von maximal 10 ‰, reicht eine 99 ‰ige Reinheit des isolierten Kreatin bzw. Kreatinins für eine hinreichend präzise Bestimmung der Stickstoffisotopenverhältnisse aus. Im menschlichen Urin machen zusammen mit Kreatinin und Kreatin die Substanzen Harnstoff, Ammonium, freie Aminosäuren, Proteine und Harnsäure über 99 % des Stickstoffes aus [15]. Durch die Aufarbeitungsmethode sollten daher diese Substanzen von Kreatin und Kreatinin abgetrennt werden.

Für die Bestimmung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse sieht die Situation etwas anders aus. Zwar macht auch hier der Harnstoff mit 60 % den größten Anteil am Gesamtkohlenstoff des Urins aus, doch sind in 99 % des Gesamtkohlenstoffes im menschlichen Urin im Vergleich zum Stickstoff eine deutlich größere Anzahl an kohlenstoffhaltigen Substanzen vorhanden. Führt man für den Kohlenstoff eine ähnliche Betrachtung der Beiträge eventueller Verunreinigungen zum  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des isolierten Kreatin und Kreatinins durch, so kommen mehr als 40 kohlenstoffhaltige Substanzen in Frage.

Die in der Literatur angegebenen Isolierungsmethoden für Kreatin und Kreatinin mit Hilfe von Fällungs- oder Komplexbildungsreaktionen mit Pikrinsäure oder Zinnchlorid [143, 144] eigneten sich nach Vorversuchen nicht für eine Isolierung für die EA-IRMS und werden deshalb nicht weiter besprochen.

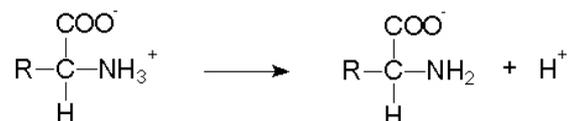
Eine Isolierung von Kreatinin und Kreatin per HPLC erwies sich ebenfalls als ungünstig, da auch bei der Verwendung von präparativen Säulen die Menge an isolierbarem Kreatinin und Kreatin in einem schlechten Verhältnis zur Menge des Lösungsmittels stand, was bei der weiteren Probenvorbereitung für die EA-IRMS stört. Das Prinzip der Trennung von Kreatin und Kreatinin voneinander und von anderen Substanzen per HPLC [113, 145, 146] wurde daher auf die Säulenchromatographie per Kationenaustauscher übertragen. Der Vorteil der Verwendung der Säulenchromatographie lag in der großen Urin- bzw. Substanzmenge die aufgegeben werden kann. Im Folgenden wird die Entwicklung

der Methode zur Isolierung von urinärem Kreatinin und zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse von urinärem Kreatin vorgestellt.

## 5.2.2 Kationenaustauschchromatographie

Aminosäuren werden auf Grund ihres amphoteren Charakters und der Möglichkeit positive Ladungen an den Stickstoff-Gruppen auszubilden, bei bestimmten pH-Werten an Kationenaustauschern gebunden. Organische Säuren und Anionen dagegen werden an Kationenaustauschern nicht gebunden, sondern laufen ungehindert durch diese hindurch. Um Kreatin und Kreatinin daher von anderen im Urin vorhandenen Substanzen zu trennen, bietet es sich an, die Affinität der positiven Stickstoff-Gruppen zu Kationenaustauschern auszunutzen und somit in einem Aufarbeitungsschritt eine weitreichende Isolierung von Kreatin und Kreatinin aus dem Urin zu erreichen.

Verschiedene Aminosäuren können an Kationenaustauschern auf Grund ihrer unterschiedlichen Aziditäten voneinander getrennt werden [145]. Je geringer der  $pK_s$ -Wert einer Aminosäure, desto größer ist die Dissoziation bei höheren pH-Werten nach:



Für die Kationenaustauschchromatographie bedeutet dies, dass amphotere Moleküle auf Grund ihres unterschiedlichen Dissoziationsverhaltens unterschiedlich stark am Kationenaustauscher binden, die Wahl der Bedingungen für den Adsorptions- oder Desorptionsschritt ist daher ausschlaggebend für die Qualität der Aufreinigung.

### 5.2.2.1 Ionenstärke von Urin und Wahl des Puffers

Ionen und geladene Moleküle konkurrieren um die Bindung an einen Ionenaustauscher. Dabei ist zu beachten, dass die Ionen und Moleküle umso fester an die Matrix binden, je geringer die Konzentration der Ionen bzw. die Ionenstärke

der Lösung ist [147]. Für eine quantitative Adsorption des Kreatinins und des Kreatins aus dem Urin an einen Ionenaustauscher ist es daher nötig zu wissen, welche Ionenstärke in humanem Urin ungefähr vorliegt.

Die Ionenstärke  $I$  ist definiert als Summe der Produkte aus dem Quadrat der Ladungszahlen  $z_i$  und der Konzentration  $c_i$  der einzelnen Ionen:

$$I = \frac{1}{2} \sum z_i^2 c_i$$

Die Ionenstärke des Urins wird hauptsächlich durch die anorganischen Salze bestimmt. Aus der in Tabelle 24 aufgeführten Abschätzung der einzelnen Ionenstärken geht hervor, dass in menschlichem Urin eine mittlere Ionenstärke um 0,5 mol/L vorliegt. Von den organischen Substanzen trägt nur der Harnstoff einen nennenswerten Beitrag zur Gesamtionenstärke bei, andere organische Substanzen wurden auf Grund ihrer geringen Konzentration nicht berücksichtigt.

Die bestimmte Gesamtionenstärke für Urin stellt nur einen Richtwert dar um die Versuchsbedingungen festzulegen. Da die Dichte von Urin und damit die Konzentrationen der Inhaltsstoffe in Urin stark schwankt, kann die Abschätzung nur als Anhaltspunkt dienen.

**Tab. 24:** Ausgeschiedene Mengen und abgeschätzte Ionenstärken ausgewählter Salze und Harnstoff von menschlichem Urin.

	m/d* [g]	pK <sub>s</sub>	m/V [g/L]	I <sub>i</sub> **
Na <sup>+</sup>	5,9		3,89	0,17
K <sup>+</sup>	2,7		1,78	0,05
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,8		0,53	0,03
Ca <sup>2+</sup>	0,5		0,33	0,03
Mg <sup>2+</sup>	0,4		0,26	0,04
Cl <sup>-</sup>	8,9		5,87	0,17
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	4,1		2,71	0,26
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2,4		1,58	0,07
Harnstoff	20,0	0,10	10,49	0,17
<i>gesamt</i>				<i>0,49</i>

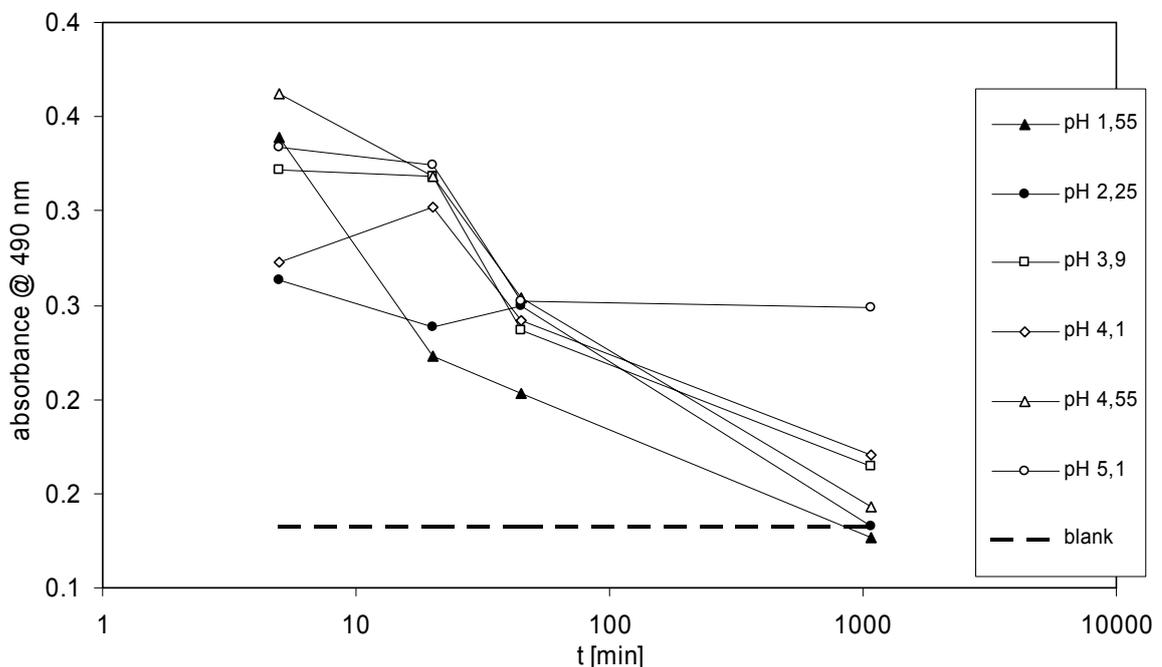
\* durchschnittliche ausgeschiedene Menge in g pro Tag (d)

\*\* Ionenstärken der einzelnen ionischen Bestandteile des Urin

Für Adsorptionsschritte von schwach bindenden Substanzen an Ionenaustauschern werden geringe Pufferkonzentrationen bzw. Ionenstärken empfohlen [147], bei Berücksichtigung des Einsatzes von 1 ml Urin ist daher eine Verdünnung der Probe mit einem 0,01 mol/L Puffer auf ein Volumen von 100 ml gewählt worden. Bei der Wahl des Puffers wurde darauf geachtet, einen kohlenstoff- und stickstofffreien Puffer zu verwenden, um eventuelle Verschleppungen von Kohlenstoff oder Stickstoff in die anschließend per EA-IRMS gemessene Probe zu verhindern. Die im Folgenden dargestellten Aufreinigungen wurden daher mit 0,01 mol/L Phosphatpuffer durchgeführt.

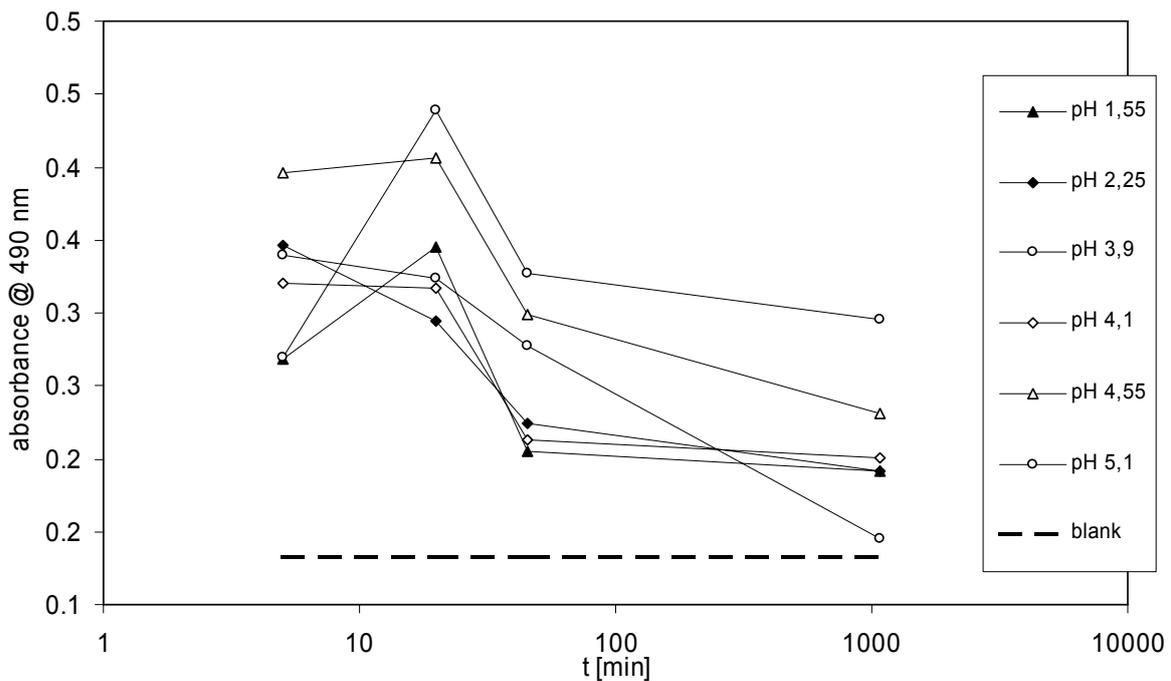
### 5.2.2.2 Adsorption von Kreatin und Kreatinin

Bei Vorversuchen im Batch-Verfahren (Reagenzglas) stellte sich heraus, dass sich die Adsorption von Kreatin und Kreatinin am gewählten Kationenaustauscher bei verschiedenen pH-Werten unterscheidet.



**Abb. 48:** Abhängigkeit der Adsorption von Kreatinin an dem Kationenaustauscher vom pH-Wert. Dargestellt ist die Absorption im Sichtbaren des Meisenheimer-Komplexes nach der Jaffé-Methode für verschiedene pH-Werte in Abhängigkeit von der Zeit. Je niedriger der pH-Wert, desto vollständiger die Adsorption. Die blank-Linie stellt eine Lösung dar, die kein Kreatinin enthält. Eine vollständige Adsorption an dem Kationenaustauscher wurde bei pH-Werten von 2,25 und 1,55 erreicht.

Bei pH-Werten von 2,25 und 1,55 war Kreatinin nach 1000 Minuten vollständig am Kationenaustauscher adsorbiert, mit der *Jaffé*-Methode konnte nicht mehr zwischen einer blank-Lösung, die kein Kreatinin enthielt, und der über dem Kationenaustauscher stehenden Lösung unterschieden werden. Bei weniger sauren pH-Werten konnte nach 1000 Minuten keine vollständige Adsorption festgestellt werden.



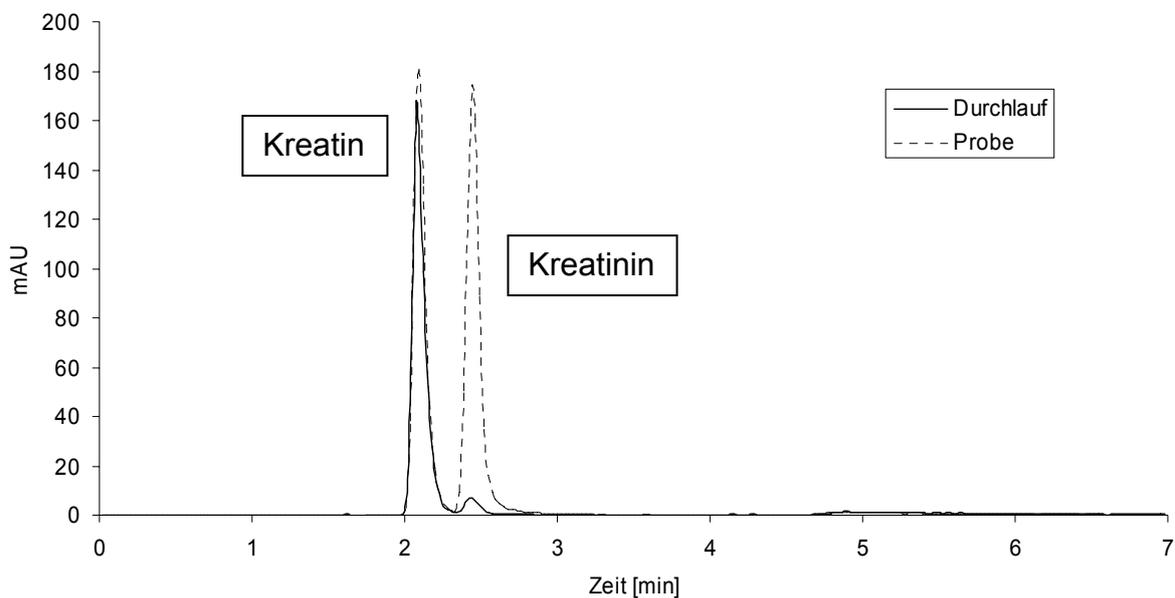
**Abb. 49:** *Abhängigkeit der Adsorption von Kreatin an dem Kationenaustauscher vom pH-Wert. Dargestellt ist die Absorption im Sichtbaren des Meisenheimer-Komplexes nach der Jaffé-Reaktion für verschiedene pH-Werte in Abhängigkeit von der Zeit. Je niedriger der pH-Wert, desto vollständiger die Adsorption, die blank-Linie stellt eine Lösung dar, die kein Kreatin enthält, diese wurde bei keinem der pH-Werte erreicht.*

Für Kreatin dagegen war auch bei den niedrigsten pH-Werten keine vollständige Adsorption an dem Kationenaustauscher zu beobachten (Abbildung 49). Die Kationenaustauschchromatographie im Batch-Verfahren im Reagenzglas hat zwar den Vorteil, dass viele Proben gleichzeitig aufgearbeitet werden können, allerdings adsorbieren Kreatin und Kreatinin bei dieser Methode sehr langsam an den Ionenaustauscher. Bei der Säulenchromatographie, bei der die Lösung kontinuierlich über den Ionenaustauscher läuft, waren die Adsorptionszeiten mit ca. zwei Stunden für 1mg/ml Substanz geringer und von daher wurde bei der weiteren Methodenentwicklung nur noch die Säulenchromatographie benutzt.

Da Kreatin und Kreatinin bei dem pH-Wert von 4,55 deutliche Unterschiede in dem Ausmaß der Adsorption zeigten, wurden weitere Versuche zur Trennung der beiden Substanzen in diesem pH-Bereich durchgeführt.

### 5.2.2.3 Trennung von Kreatin und Kreatinin

Um den optimalen pH-Wert für die Adsorption von Kreatinin an dem Kationenaustauscher bei gleichzeitiger Trennung vom Kreatin zu bestimmen, wurde eine weitere Reihe von Versuchen zur Säulenchromatographie bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Hierzu wurden Lösungen mit Konzentrationen von jeweils 1 mg/ml Kreatin- und Kreatinin-Standard in 0,01 M Phosphatpuffer auf verschiedene pH-Werte eingestellt und über eine mit Kationenaustauscher gefüllte Säule geschickt. Da die *Jaffé*-Methode nicht zwischen Kreatin und Kreatinin unterscheidet, wurden die Konzentration der Lösungen und des Durchlaufes per HPLC bestimmt.



**Abb. 50:** *Übereinandergelegte HPLC-Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 205 nm, ein Chromatogramm mit Kreatin- und Kreatinin-Standard vor der Kationenaustauschchromatographie (CEC), ein Chromatogramm nach der CEC. Nach der CEC ist das Kreatinin (Retentionszeit 2,5 min) bis auf 4 % am Kationenaustauscher adsorbiert, wogegen das Kreatin (Retentionszeit 2,1 min) noch zu 94 % im Durchlauf zu finden ist.*

Beim Vergleich der HPLC-Chromatogramme vor und nach der Kationenaustauschchromatographie für die Lösungen und den Durchlauf erkennt man, dass Kreatinin im Gegensatz zum Kreatin selektiv an den Kationenaustauscher gebunden wird.

So verschwindet die Absorption für Kreatinin bei einer Wellenlänge von 205 nm und einer Retentionszeit von ca. 2,5 Minuten nach der CEC fast vollständig (Abbildung 50). Kreatin dagegen mit einer Retentionszeit von 2,1 min wird nur in geringen Mengen adsorbiert.

Betrachtet man die prozentualen Anteile an Kreatin und Kreatinin im Durchlauf in Bezug auf die eingesetzte Menge, so zeigt sich wie beim Batch-Verfahren eine starke Abhängigkeit der Adsorption vom pH-Wert, die sich zudem bei Kreatin und Kreatinin unterscheidet. Oberhalb eines Wertes von  $\text{pH} = 4,4$  erreicht die Konzentration von Kreatin im Durchlauf innerhalb der Fehlergrenzen 100 %. Es wird damit praktisch nichts am Kationenaustauscher gebunden. Im Gegensatz dazu steigt die Konzentration von Kreatinin im Durchlauf oberhalb von einem  $\text{pH} = 4,4$  auf über 4 %, bei einem  $\text{pH} = 5,5$  findet sich ein Fünftel des Kreatinins aus der Probe im Durchlauf wieder.

**Tab. 25:** Für Kreatinin und Kreatin per HPLC bestimmte prozentuale Anteile (Mittelwert  $\pm 1\sigma$ ) im Durchlauf nach Kationenaustauschchromatographie im Bezug zur eingesetzten Probe.

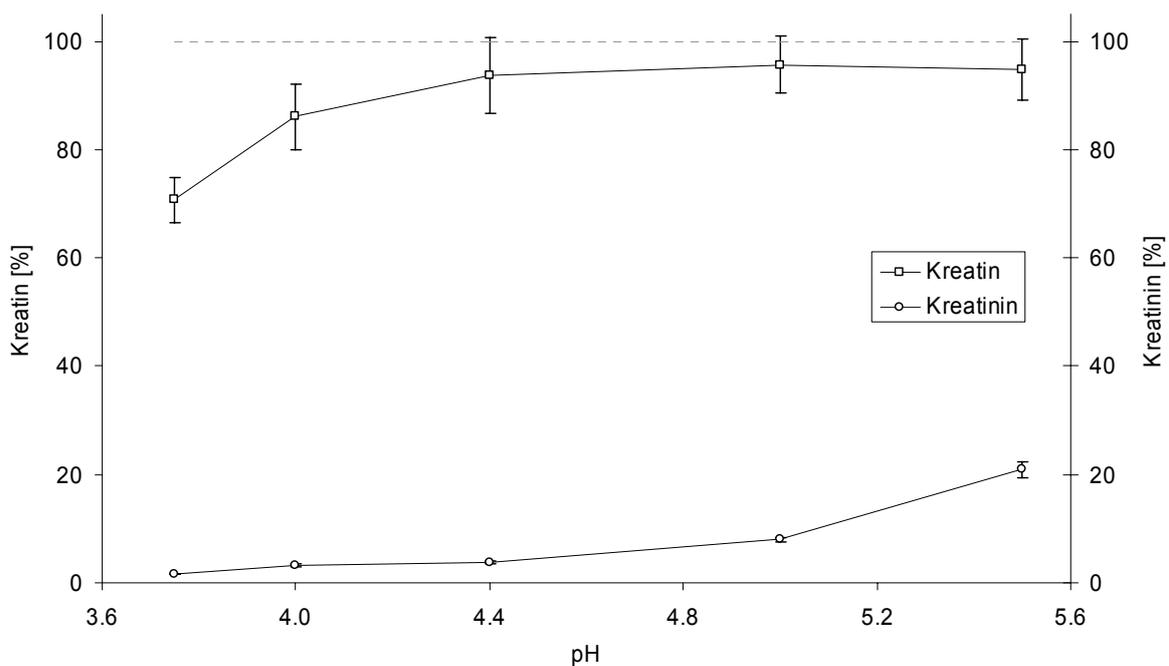
pH	Kreatinin [%]	Kreatin [%]
3,8	$1,6 \pm 0,1$	$70,7 \pm 4,2$
4,0	$3,3 \pm 0,3$	$86,1 \pm 6,0$
4,4	$3,8 \pm 0,3$	$93,7 \pm 7,0$
5,0	$7,9 \pm 0,5$	$95,6 \pm 5,2$
5,5	$21,0 \pm 1,5$	$94,8 \pm 5,7$

Das unterschiedliche Verhalten von Kreatin und Kreatinin kann bei der Trennung dieser beiden Substanzen ausgenutzt werden. Auf Grund der Fragestellung ist es durchaus von Interesse über unterschiedliche Stickstoffisotopenverhältnisse von Kreatin und Kreatinin auf unterschiedliche Quellen zurückzuschließen.

Will man Kreatinin von Kreatin isolieren und kommt es nicht auf eine quantitative Ausbeute an Kreatinin an, so kann man unter den vorgestellten

Bedingungen und Reagenzien oberhalb von  $\text{pH} = 5,5$  davon ausgehen, dass sich nur Spuren von Kreatin am Kationenaustauscher befinden. Befindet sich kein abzutrennendes Kreatin in der Probe und kommt es auf eine quantitative Ausbeute an Kreatinin an, so sollte man die CEC bei niedrigeren  $\text{pH}$ -Werten durchführen, da nur hier gewährleistet werden kann, dass Kreatinin verlustfrei am Kationenaustauscher adsorbiert.

Bei der Wahl der Bedingungen für die Isolierung von Kreatin und Kreatinin aus Urin für die IRMS kommen verschiedene Faktoren in Betracht. Zum einen sollte die Trennung zwischen Kreatin und Kreatinin so gut wie möglich sein, um eventuelle unterschiedliche Quellen identifizieren zu können, zum zweiten sollten die jeweiligen Ausbeuten so hoch wie möglich liegen. Nicht quantitative Ausbeuten an Kationenaustauschern könnten zu Isotopenfraktionierungen führen und sollten daher vermieden werden.



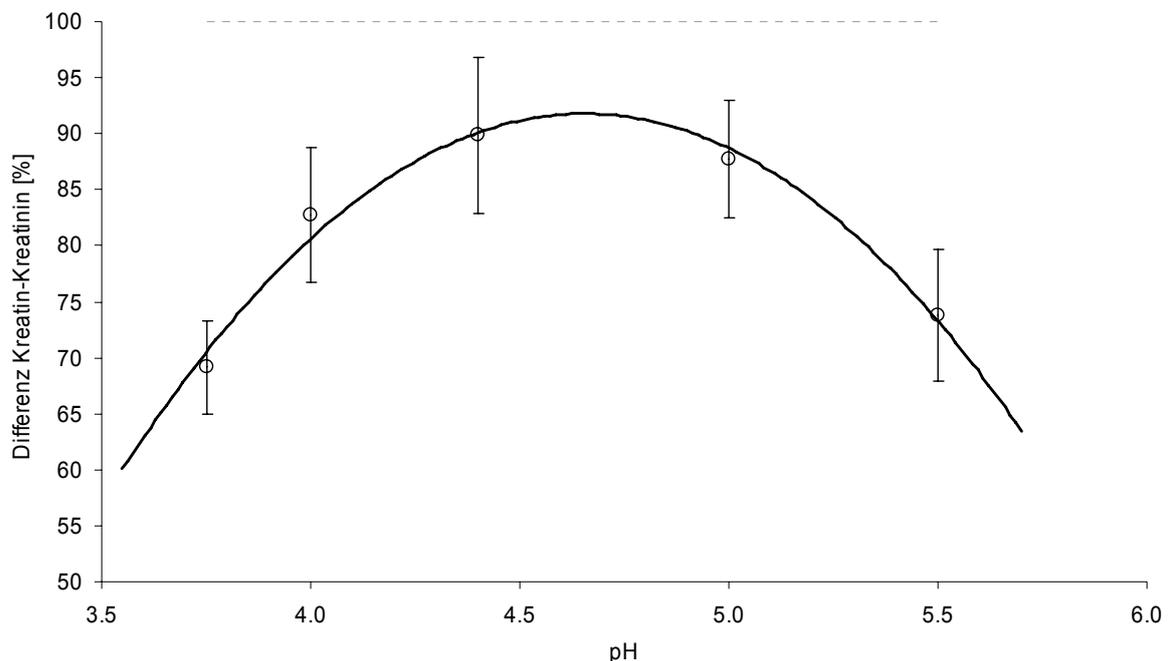
**Abb. 51:** Prozentuale Anteile von Kreatin und Kreatinin im Durchlauf nach der Kationenaustauschchromatographie bei verschiedenen  $\text{pH}$ -Werten im Verhältnis zur eingesetzten Menge. Kreatin- und Kreatinin-Standard wurden zusammen in Lösungen mit den jeweiligen  $\text{pH}$ -Werten über den Kationenaustauscher geschickt. Die Quantifizierung erfolgte per HPLC, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung für verschiedene Messungen an.

Die beste Trennung zwischen Kreatin und Kreatinin erhält man bei dem  $\text{pH}$ -Wert, bei dem die Differenz der Anteile von Kreatin und Kreatinin im Verhältnis zur eingesetzten Menge im Durchlauf nach der CEC am größten ist. In Abbildung 52 sind

die Differenzen für die verschiedenen pH-Werte dargestellt. An die Daten ist ein Polynom 2. Grades der Formel

$$y = -26,0x^2 + 241,7x - 470,8$$

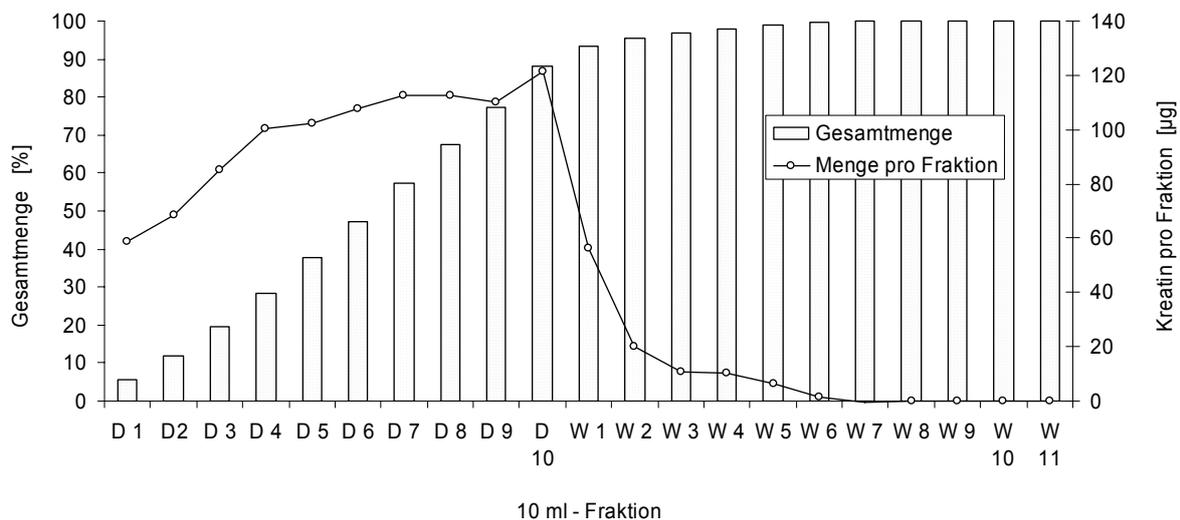
angepasst. Man erkennt ein Maximum bei einem pH-Wert zwischen pH = 4,5 und pH = 4,9. In diesem Bereich erreicht die Trennung von Kreatin und Kreatinin Werte über 90 %. Die Bestimmung des Maximums des Polynoms mit der Bedingung  $y' = 0$  ergibt einen Wert von pH = 4,65. In diesem Bereich sollte man bei gegebenen Bedingungen und Reagenzien die beste Trennung von Kreatin und Kreatinin erwarten. Grundsätzlich liefert bei Abwesenheit von Kreatin in den Proben eine CEC für Kreatinin bei niedrigeren pH-Werten Ausbeuten nahe 100 %. Allerdings muss man beachten, dass bei niedrigeren pH-Werten die Anzahl potenziell positiv geladener Aminosäuren und damit die Gefahr der Adsorption derselben an dem Kationenaustauscher stark zunimmt. Daher ist auch hinsichtlich der Trennung von Kreatinin von anderen Substanzen ein Wert um pH = 4,65 am geeignetsten.



**Abb. 52:** Prozentuale Differenz zwischen der Menge an Kreatin und Kreatinin im Durchlauf nach der Kationenaustauschchromatographie für verschiedene pH-Werte. Wo die Differenz am größten ist, dort liegt das Optimum zwischen Trennung und Ausbeute. Die Fehler ergeben sich aus der Quantifizierung per HPLC. Die durchgezogene Linie stellt ein angepasstes Polynom 2. Grades dar mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,976$ . Das Maximum des Polynoms stellt den pH-Bereich dar, an dem Kreatin und Kreatinin zu über 90 % voneinander getrennt werden.

Bei der hier vorgestellten Methode wird ein Gesamtvolumen von 100 ml an verdünnter Probe auf den Kationenaustauscher gegeben und anschließend mit 100 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Schaut man sich die einzelnen 10-ml-Fractionen des Durchlaufes und des Waschwassers an, so erkennt man, dass nach Beendigung des Waschschrittes kein Kreatin mehr von dem Kationenaustauscher heruntergespült wird.

Mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie unter den vorgestellten Bedingungen und Arbeitsschritten kann Kreatinin von Kreatin und weiteren Aminosäuren aus Urin abgetrennt werden. Der Vorteil der Verwendung der Säulenchromatographie liegt in der frei wählbaren Substanzmenge bzw. des Urinvolumens, welches aufgegeben werden kann, um eine hinreichend große Menge an Kreatinin für die spätere Messung per EA-IRMS aus dem Urin zu isolieren.



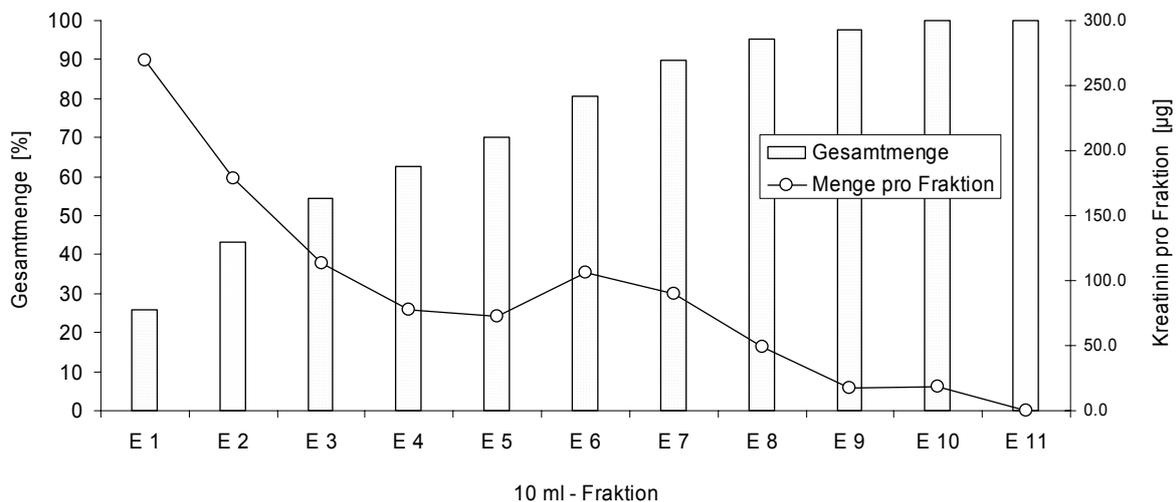
**Abb. 53:** Mengen an Kreatin für einzelne 10-ml-Fractionen des Durchlaufes und des Waschwassers beim ersten Schritt der CEC. Die prozentualen Mengen stellen die aufaddierten Anteile der Einzelmengen an Kreatin in den jeweiligen Fractionen dar. In den ersten fünf Fractionen des Waschwassers kann noch Kreatin nachgewiesen werden.

#### 5.2.2.4 Desorption von Kreatinin

Um das an den Kationenaustauscher gebundene Kreatinin wieder zu desorbieren, gibt es zwei Möglichkeiten. Die eine besteht in der Desorption mit Hilfe einer Lösung mit stark erhöhter Ionenstärke oder einem weniger sauren bzw. eindeutig basischen pH-Wert [147].

Gibt man eine Salzlösung mit erhöhter Ionenstärke auf den Kationenaustauscher, so wird das Kreatinin durch die Ionen des Salzes verdrängt. Um den Salzgehalt des Eluats so gering wie möglich zu halten, wurde versucht mit der geringstmöglichen Salzkonzentration an den Ionenaustauscher zu gehen. In Vorversuchen zeigte sich, dass Kreatinin ab einer Salzkonzentration von 0,1 mol/L quantitativ desorbiert.

Im Folgenden wurden wie bei den Versuchen zur Adsorption 10-ml-Fractionen des Eluats gesammelt und der Gehalt an Kreatinin bestimmt. Es zeigte sich, dass in den ersten 10 ml bereits 25 % des adsorbierten Kreatinins desorbiert sind, nach 30 ml bereits 50 %, allerdings erst nach insgesamt elf 10-ml-Fractionen sämtliches Kreatinin desorbiert worden ist. Da für die Isotopenanalyse eine quantitative Desorption des Kreatinins wichtig ist, muss mit dem gesamten Eluat weitergearbeitet werden. Die Konzentration von Kreatinin beträgt 1 mg in 100 ml Eluat, dagegen befinden sich aber auch ca. 7 g KCl-Salz in dem Eluat. Diese ungünstigen Mengenverhältnisse, sowie das relativ große Volumen erlauben keine vernünftige weitere Aufarbeitung für die EA-IRMS. Das Eluat müsste zur Trockne eingeeengt werden, was für ein hohes Probenaufkommen nicht durchzuführen ist, zudem wäre der Salzgehalt des Rückstandes für die EA-IRMS zu hoch.



**Abb. 54:** Mengen an Kreatinin für einzelne 10-ml-Fractionen des Eluats. Die prozentualen Mengen stellen die aufaddierten Anteile der Einzelmengen an Kreatinin in den jeweiligen Fractionen dar. Eluiert wurde mit einer 0,1 M KCl-Lösung.

Eine Eluierung mit einer größeren Salzkonzentration verringert zwar einerseits das Volumen, bringt aber keine Verbesserung hinsichtlich des ungünstigen

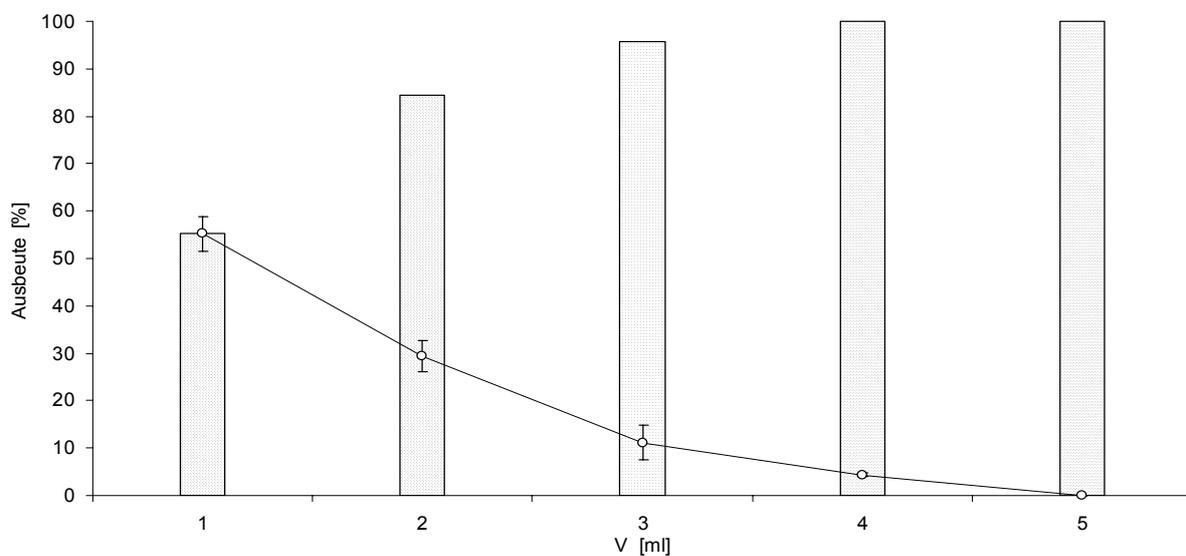
Verhältnisses zwischen Kreatinin und Salz. Für die Desorption des Kreatinins vom Kationenaustauscher wurde daher gesättigte  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung (Barytwasser) verwendet.  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  löst sich in Wasser mit ca. 40g/L, was bei einem Molekulargewicht von 170 g/mol einer 0,24 M Lösung entspricht. Der pH-Wert von Barytwasser liegt bei  $\text{pH} = 14$ . Die Verwendung von Barytwasser zur Desorption bietet folgende Vorteile: Die zweifach geladenen  $\text{Ba}^{2+}$ -Ionen haben ein deutlich größeres Austauschpotential als einfach geladenen Alkalimetallionen [147] und auf Grund des pH-Wertes desorbieren die adsorbierten Substanzen schnell und quantitativ. Im Gegensatz zu anderen alkalischen Lösungen findet sich in Barytwasser kein atmosphärisches  $\text{CO}_2$ , da es direkt als wasserunlösliches Bariumcarbonat ausfällt.

**Tab. 26:** Vergleich verschiedener untersuchter Eluations-Möglichkeiten hinsichtlich Vorteilen und Nachteilen für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse der entsprechenden Eluate per EA-IRMS. Im Rahmen dieser Arbeit wurde schließlich die Eluation mit Hilfe von  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  durchgeführt, da die Vorteile von kleinem Volumen und carbonatfreiem Eluat deutlich die Nachteile überwiegen.

Eluens	Vorteile	Nachteile
KCl	Chromatographie möglich	große Volumina (100 ml) zu hohe Salzkonzentrationen lange Eluierung
KOH	kleine Volumina (5 ml)	keine Chromatographie Carbonat-Verschleppung
$\text{Ba}(\text{OH})_2$	kleine Volumina (3 ml) carbonatfrei	keine Chromatographie Schädigung des Oxidationsreaktors

Ein Nachteil der Verwendung von Barytwasser ist allerdings, dass sämtliche an den Kationenaustauscher gebundenen (organischen) Substanzen eluiert werden, es kann keine Chromatographie durchgeführt werden. Somit kommt der im Kapitel 5.2.2.3 beschriebenen selektiven Adsorption von Kreatinin an den Kationenaustauscher noch größere Bedeutung zu. Ein weiterer Nachteil der Verwendung von Barytwasser, liegt darin, dass das Eluat von überschüssigen  $\text{Ba}^{2+}$ -Ionen befreit werden muss, da Barium das Quarz-Oxidationsrohr des Elementaranalysators beschädigt. Überschüssiges Barium kann allerdings durch Schwefelsäure als Bariumsulfat ausgefällt werden.

Durch die Verwendung von Barytwasser konnte das Volumen des Eluats auf wenige Milliliter reduziert werden. Bei Standzeiten von jeweils 10 Minuten pro ml sind nach 30 min bzw. 3 ml Barytwasser über 90 % des Kreatinins desorbiert. Dabei werden bereits mit dem ersten Milliliter Barytwasser 50 % des Kreatinins desorbiert. Bestimmt man die Wiederfindung des Kreatins im Durchlauf, im Waschwasser und im Eluat nach Aufgabe eines Kreatin bzw. Kreatinin-Standards in wässriger Lösung, so können innerhalb der Messpräzision der HPLC-Methode 100 % der Substanz wieder gefunden werden.



**Abb. 55:** Prozentuale Anteile der Gesamt-Kreatin-Desorption für fünf nacheinander folgende 1 ml Fraktionen von insgesamt fünf Aufarbeitungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Werte für die verschiedenen Aufarbeitungen an. Bereits nach 3 ml sind bei allen Aufarbeitungen über 95 % des Kreatinins eluiert. In den fünften Fraktionen konnte kein Kreatinin mehr nachgewiesen werden.

Mit der hier vorgestellten Methode kann Kreatinin selektiv aus Urin isoliert werden. Eventuell im Urin vorhandenes Kreatin findet sich im Durchlauf und Waschwasser wieder. Eine weitere Aufarbeitung dieser Fraktion ist auf Grund des großen Volumens nicht so leicht möglich. Zwar könnte das Kreatin durch Senkung des pH-Wertes zu Kreatinin umgewandelt werden [112], doch ist dies auf Grund des großen Volumens für eine routinemäßige Aufarbeitung unrentabel. Eine weitere Möglichkeit die Isotopenverhältnisse des Kreatins zu bestimmen, besteht in der Umwandlung des Kreatins in Kreatinin vor der Kationenaustauschchromatographie, um so eine Gesamtkreatinin-Fraktion zu erhalten. Das Gesamtkreatinin kann dann mit derselben Methode wie das Kreatinin aufgearbeitet werden. Die Umwandlung

von Kreatin zu Kreatinin kann in den unverdünnten Urinproben vor der Kationenaustauschchromatographie einfach und mit größerer Probenanzahl durchgeführt werden.

Durch vorherige Quantifizierung der Anteile von Kreatin und Kreatinin in der Urinprobe und die Bestimmung der Isotopenverhältnisse des Kreatinins und des Gesamtkreatinins können so indirekt die Isotopenverhältnisse des Kreatins berechnet werden. Die Berechnung wird im Rahmen der Fallstudie (Kapitel 5.2.5) am Beispiel vorgestellt.

**Tab. 27:** *Eingesetzte und wieder gefundene Menge bei der CEC eines Kreatin-Kreatinin-Standards. Bei Durchlauf, Waschwasser und Eluat wurden Kreatin und Kreatinin per HPLC quantitativ bestimmt. Die 100 %ige Wiederfindung zeigt, dass sich nach der CEC kein Kreatin oder Kreatinin mehr am Kationenaustauscher befindet.*

	eingesetzte Menge [ $\mu\text{g}$ ]	wiedergefundene Menge [ $\mu\text{g}$ ]	
Kreatin	1030,3 $\pm$ 26,9	1084,2 $\pm$ 8,3	Durchlauf, Waschwasser
Kreatinin	981,5 $\pm$ 14,5	992,0 $\pm$ 9,4	Eluat

### 5.2.2.5 Umwandlung von Kreatin zu Kreatinin

Um das in den Urinproben enthaltene Kreatin quantitativ in Kreatinin umzuwandeln und dann anschließend mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie aus dem Urin zu isolieren, werden die Urinproben auf einen pH-Wert  $< 1$  gebracht. Die Umwandlung von Kreatin zu Kreatinin ist auf Grund der Beteiligung eines Protons am geschwindigkeitsabhängigen Schritt abhängig vom pH-Wert der Lösung und von der Temperatur [32].

Um die Effektivität der Methode zu testen und den Durchsatz der Proben zu erhöhen, wurden Versuche zur Umwandlungsgeschwindigkeit von Kreatin zu Kreatinin im Reagenzglas und Heizblock gemacht. Eine solche Versuchsanordnung hat den Vorteil, dass bis zu 48 Proben gleichzeitig aufgearbeitet werden können. Da es sich bei der Umsetzung im Reagenzglas und Heizblock nicht um einen klassischen Aufbau zur Umwandlung von Kreatin zu Kreatinin handelt, wurden Versuche bei verschiedenen Säurekonzentrationen durchgeführt, um die Umsetzungsgeschwindigkeiten zu bestimmen. Hierzu wurden wässrige Lösungen

von Kreatin mit einer Konzentration von 1 mg/ml mit unterschiedlichen Mengen an Salzsäure versetzt und bei 80 °C im Heizblock stehengelassen. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquote entnommen und die Gehalte an Kreatin und Kreatinin per HPLC quantifiziert.

Die Umwandlung von Kreatin zu Kreatinin ist eine Reaktion erster Ordnung und von der Konzentration des Katalysators abhängig [32]. Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  der Reaktion ergibt sich nach:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{[\text{Cr}]_0}{[\text{Cr}]_0 - [\text{Crn}]_t}$$

Hierbei ist  $t$  die Zeit,  $[\text{Cr}]_0$  die Anfangskonzentration an Kreatin und  $[\text{Crn}]_t$  die Konzentration an Kreatinin zur Zeit  $t$  in der Lösung. Für die verschiedenen Konzentrationen an HCl wurden für die Zeitpunkte, bei denen die Reaktion noch nicht vollständig abgelaufen ist, die Geschwindigkeitskonstanten der Umsetzung bestimmt.

**Tab. 28:** Geschwindigkeitskonstanten mit Standardabweichungen für die Umsetzung von Kreatin zu Kreatinin bei 80 °C im Heizblock bei verschiedenen Säurekonzentrationen.

[HCl] [mol/L]	$k$ [s <sup>-1</sup> ]	$\Delta k$ [s <sup>-1</sup> ]
0,05	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$7,6 \cdot 10^{-7}$
0,10	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$9,5 \cdot 10^{-6}$
0,20	$3,6 \cdot 10^{-5}$	*
0,40	$6,3 \cdot 10^{-5}$	*

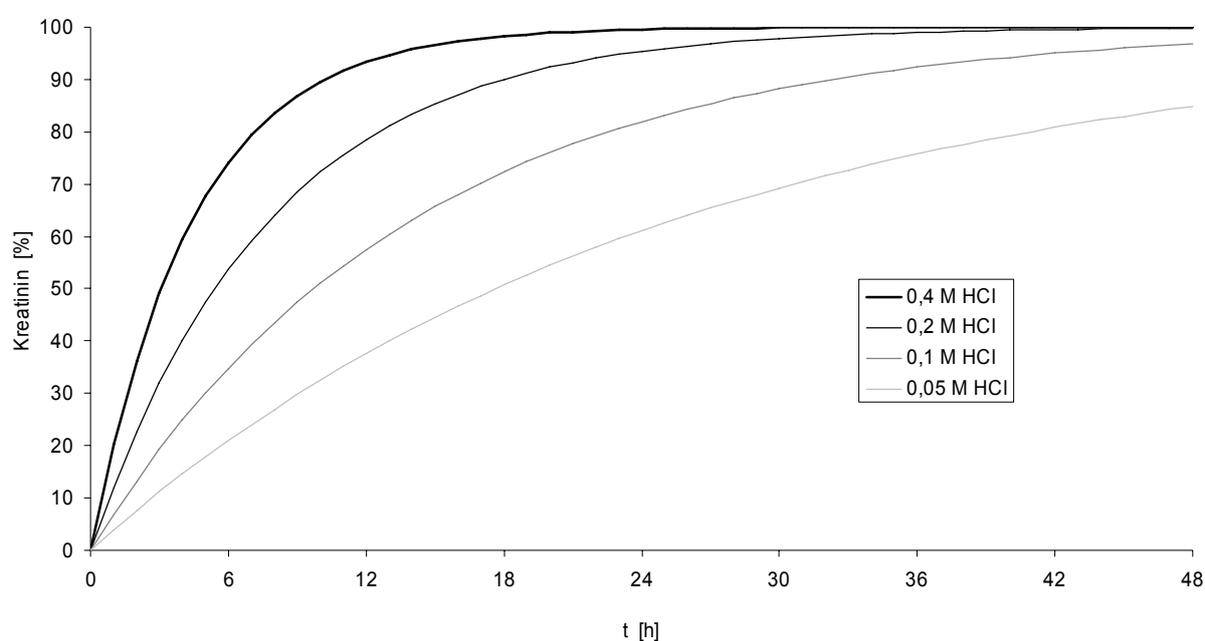
\*: bei den Säurekonzentrationen von 0,2 und 0,4 mol/L konnte keine Standardabweichung bestimmt werden, da nach 24 Stunden kein Kreatin mehr detektiert werden konnte.

Man erkennt einen Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der Konzentration der Säure. Ziel der Versuche war es, den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die Umsetzung vom Kreatin zum Kreatinin vollständig abgelaufen ist. Um die dafür notwendige Zeit zu berechnen, wird die Gleichung nach  $[\text{Crn}]_t$  umgewandelt:

$$[\text{Crn}]_t = -[\text{Cr}]_0 e^{-kt} - [\text{Cr}]_0$$

Die zur jeweiligen Zeit  $t$  vorhandene Konzentration an Kreatinin  $[\text{Crn}]_t$  wird mit Hilfe der per HPLC bestimmten Konzentrationen an Kreatin und der daraus berechneten Geschwindigkeitskonstanten  $k$  berechnet.

In Abbildung 56 wird deutlich, dass erst bei einer Säurekonzentration von 0,4 mol/L innerhalb von 24 Stunden das Kreatin komplett zu Kreatinin umgewandelt worden ist. Für eine quantitative Umwandlung des Kreatins in Kreatinin im Reagenzglas im Heizblock empfiehlt sich daher eine Mindeststandzeit von 24 Stunden mit einer Säurekonzentrationen größer 0,4 mol/L. Bei Aufarbeitungen von Urinproben wurde daher der Urin mit derselben Menge an 1 M HCl versetzt sowie die Umsetzung zu Kreatinin per HPLC überprüft.



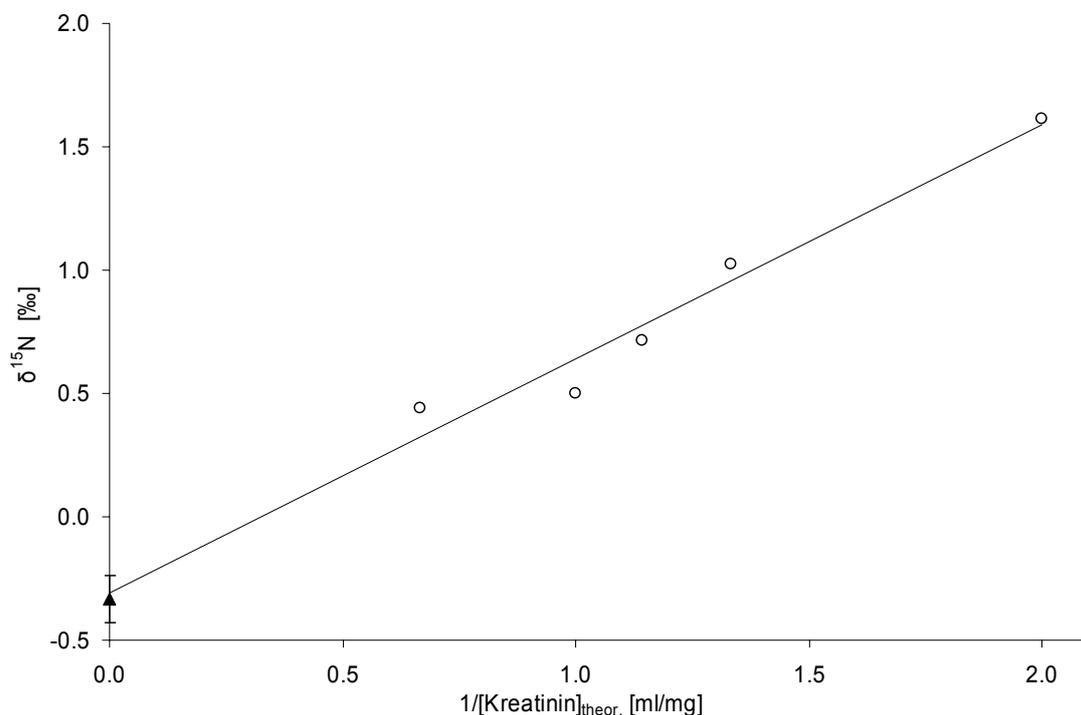
**Abb. 56:** Umwandlung von Kreatin zu Kreatinin im Reagenzglas bei 80 °C im Heizblock für verschiedene Säurekonzentrationen. Die Berechnung der Linien für die verschiedenen Konzentrationen an Säure basiert auf den bestimmten experimentellen Geschwindigkeitskonstanten.

### 5.2.3 Präzision und Richtigkeit der Methode

Die Methode wurde hinsichtlich eventueller Isotopenfraktionierungen bei der Aufarbeitung oder Verunreinigungen im isolierten Kreatinin überprüft. Vier Aliquote eines Urins wurden mit verschiedenen Mengen eines Kreatinin-Standards gespiked und aufgearbeitet. Theoretisch kann man aus der Auftragung der reziproken Kreatininkonzentration gegen die Isotopenwerte und nach linearer Regression den

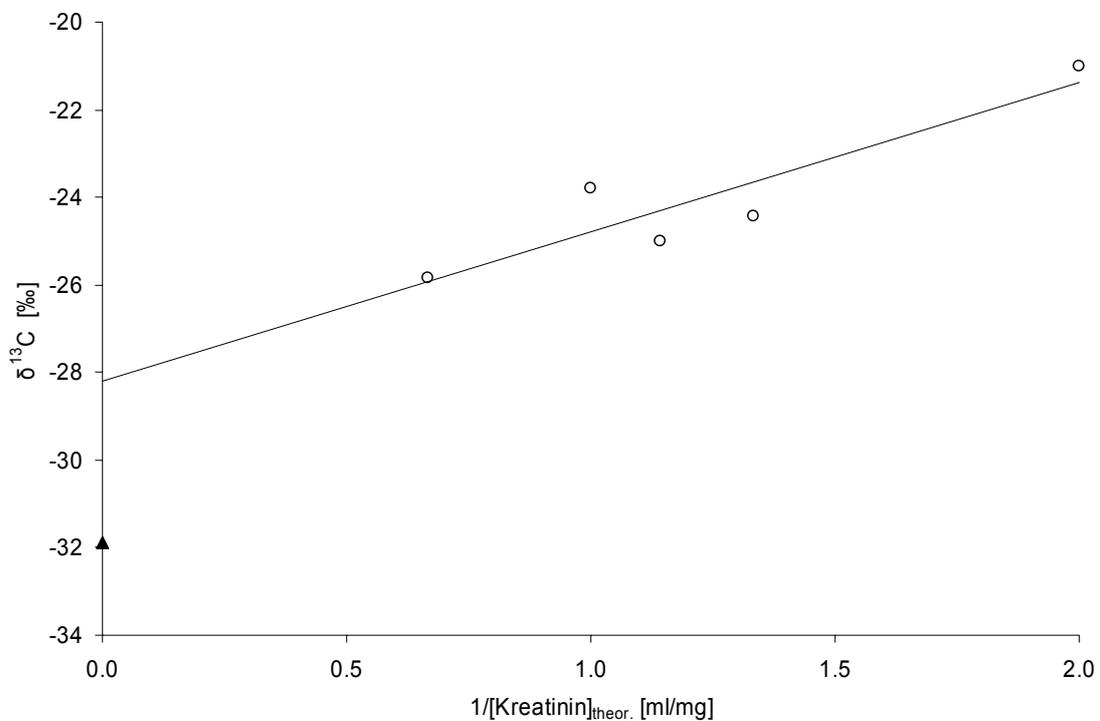
Isotopenwert des zugesetzten Standards ermitteln (Kapitel 4.9). Bei der Identifizierung eventueller exogener Quellen des urinären Kreatins und Kreatinins sind sowohl die  $\delta^{15}\text{N}$ - als auch die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte interessant. Nach der Aufarbeitung wurden daher sowohl die Stickstoff- als auch die Kohlenstoffisotopenverhältnisse per EA-IRMS bestimmt

In Abbildung 57 erkennt man die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für die verschiedenen Mischungen (Urin/Standard). Mit zunehmender Konzentration an Kreatinin-Standard in der Probe nähern sich die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte denen des Kreatinin-Standards an. Während der Urin einen  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von 1,6 ‰ aufweist, lag der zugegebene Standard bei -0,4 ‰. Da von den Urinproben sowohl die Stickstoff- als auch die Kohlenstoffisotopenverhältnisse bestimmt wurden, konnte für jede Urinprobe pro Element nur eine Messung durchgeführt werden. Die lineare Regression liefert für den Stickstoff des zugefügten Kreatinins einen  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von -0,31 ‰, der damit innerhalb der Präzision der Methode gut mit dem Stickstoffisotopenverhältnis des Kreatinin-Standards übereinstimmt.



**Abb. 57:** Keeling-Plot für  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Kreatinin. Vier Aliquote eines Urins wurden mit verschiedenen Mengen eines Kreatinin-Standards versetzt und das Kreatinin per CEC isoliert. Die Linie stellt die Regressionsgerade dar, die einen  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von 0,31 ‰ für den zugesetzten Kreatinin-Standard (-0,33 ‰) liefert.

Für die Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Kreatinins weichen die experimentellen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von den theoretischen Daten ab. So findet sich zwar eine leichte Verschiebung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte mit zunehmendem Anteil des Kreatinin-Standards am Kreatinin im Urin, doch liefert die lineare Regression für den zugegebenen Standard einen um 4 ‰ zu hohen  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert. Grund für diese Differenz zwischen theoretischem und experimentellem Werten könnten Verunreinigungen des isolierten Kreatinins während der Aufarbeitung sein. Verunreinigungen durch atmosphärisches  $\text{CO}_2$ , das sich leicht in starken Laugen löst, wurden durch die Verwendung von Barytwasser verhindert. Allerdings scheinen die drastischen Bedingungen, unter denen das Kreatinin eluiert wird, zu der Verunreinigung an Kohlenstoff zu führen.



**Abb. 58:** Keeling-Plot für  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Kreatinin. Vier Aliquote eines Urins wurden mit verschiedenen Mengen eines Kreatinin-Standards versetzt und das Kreatinin per CEC isoliert. Die Linie stellt die Regressionsgerade dar, die nicht den  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Standards liefert, sondern isotopisch zu schwere Werte aufweist.

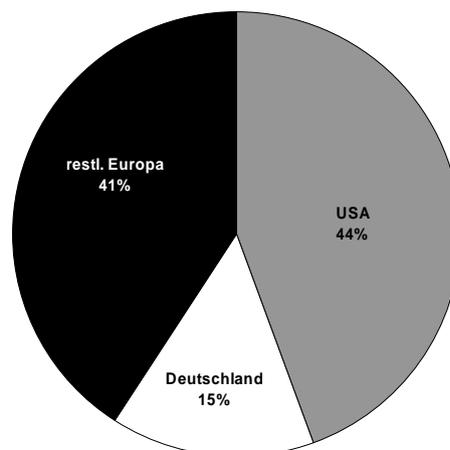
Bei der Elementaranalyse wurde für das isolierte Kreatinin ein Stickstoff zu Kohlenstoff-Verhältnis von 1:4,1 gefunden, theoretisch müsste dies allerdings bei 1:3,3 liegen. Somit ist der Anteil an Kohlenstoff im isolierten Kreatinin zu hoch. Auffällig ist, dass das isolierte Kreatinin eine braune Farbe aufweist, die auch beobachtet werden kann, wenn man den Kationenaustauscher in Barytwasser

stehen lässt. Anscheinend lösen sich Teile des Kationenaustauschers während der Eluierung bei dem hohen pH-Wert auf. Selbst durch häufiges Waschen und Konditionieren des Kationenaustauschers konnte dies nicht verhindert werden. Andere basische Eluierungsmittel oder organische Lösungsmittel brachten keine Verbesserung.

Wie gezeigt funktioniert die Methode hinsichtlich einer Isolierung des Kreatinins für die Analyse der Stickstoffisotopenverhältnisse. Was eine Aufarbeitung für die Analyse der Kohlenstoffisotopenverhältnisse angeht, so müssten neue Verfahren zur Isolierung ausprobiert werden. Eine Möglichkeit zur Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Kreatin und Kreatinin liegt eventuell in der LC-IRMS [97], deren Anwendung auf die Kohlenstoffisotopie begrenzt ist und deren Anforderung an die Methodik der HPLC allerdings von Kreatin und Kreatinin erfüllt werden könnte.

#### 5.2.4 Synthetische Kreatin-Monohydrate

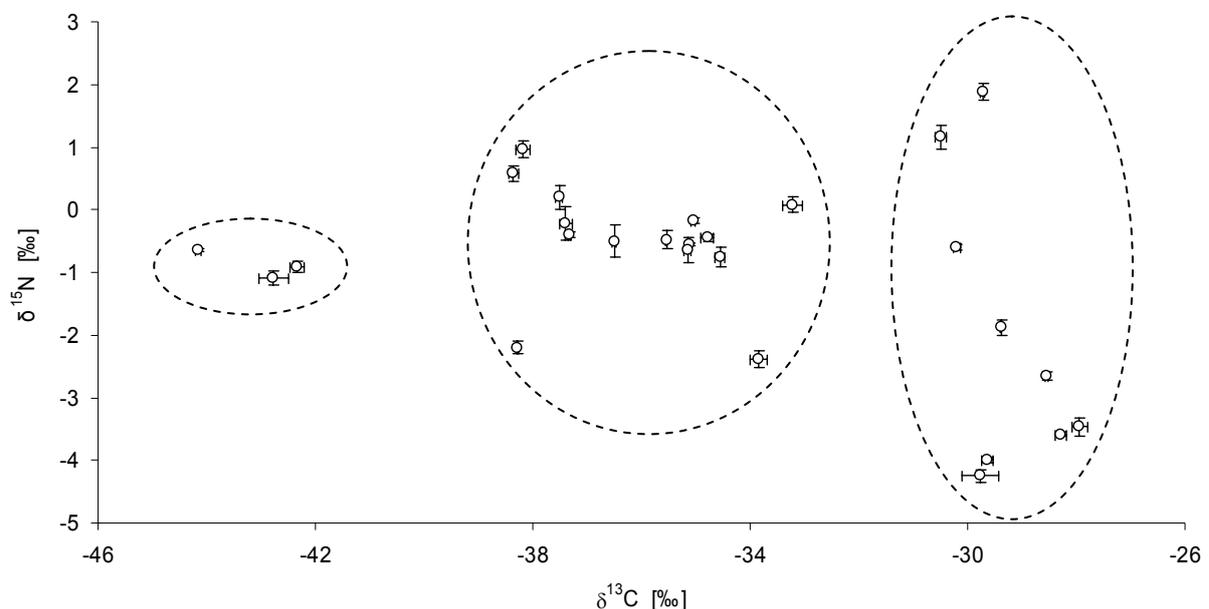
Im Rahmen dieser Arbeit wurden 27 Kreatin-Monohydrate (NEM) untersucht. Die Nahrungsergänzungsmittel wurden im Rahmen verschiedener Studien des *Instituts für Biochemie* der *Deutschen Sporthochschule Köln* im Handel in Europa und Amerika in den Jahren 2001 bis 2005 eingekauft. Auf den Etiketten waren Abfüller- und Vertriebsfirmen angegeben, von denen nicht direkt auf den pharmazeutischen Hersteller geschlossen werden kann.



**Abb. 59:** Prozentualer Anteil der Herkunftsangaben der untersuchten Kreatin-Monohydrate, Gesamtanzahl 27. Die Länderbezeichnungen beziehen sich auf die Abfüller bzw. angegebenen Vertriebe, von ihnen kann nicht auf den pharmazeutischen Hersteller geschlossen werden.

44 % der Kreatin-Monohydrate hatten als Herkunftsangabe die USA, der Rest stammte aus Europa, davon vier (15 %) aus Deutschland. Da Kreatin-Monohydrate oftmals noch weitere Inhaltsstoffe oder Verunreinigungen enthalten, wurde der Gehalt an Kreatin-Monohydrat per HPLC überprüft. Hierzu wurden die Nahrungsergänzungsmittel an der Feinwaage eingewogen, in Lösung gebracht und mit dem externen Standard *creapure*<sup>TM</sup>, der zu 100 % aus Kreatin-Monohydrat besteht, verglichen. Die 27 Kreatin-Monohydrate zeigten alle einen fast 100 %igen Gehalt an Kreatin ( $100,5 \% \pm 2,5 \%$ , siehe Anhang 9) und wurden alle ohne weitere Aufreinigung per EA-IRMS gemessen

Die  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für die synthetischen Kreatin-Monohydrate verteilen sich über einen weiten Bereich. So variieren die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von -28 bis hin zu -44 ‰ und die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte zwischen 1,9 und -4,4 ‰. Da es sich bei den Kreatin-Monohydraten sowohl um rein synthetische Produkte handeln kann, deren Kohlenstoff auf fossilen Edukten und deren Stickstoff auf aus fraktionierter Luft gewonnenem Stickstoff besteht, aber diese auch aus organischem Material isoliert worden sein können, dürften die unterschiedlichen Herstellungsprozesse der Grund für die großen Unterschiede in den  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten sein.



**Abb. 60:**  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für insgesamt 27 synthetische Kreatin-Monohydrate, die als Nahrungsergänzungsmittel (NEM) verkauft werden. Die Produkte lassen sich in drei Gruppen einteilen.

Die Edukte für die industrielle Synthese von Kreatin-Monohydrat sind die großtechnisch hergestellten Substanzen Natriumcyanid, Formaldehyd, Methylamin und Cyanamid [60].  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für andere halb- oder totalsynthetische Produkte zeigen nicht so leichte Werte, wie zum Beispiel für Testosteron (-25 ‰ bis -32 ‰ [148]), Benzoesäure (-29 ‰), Vanillin (-29 ‰), Paracetamol (-28,7), Acetylsalicylsäure (-26 bis -34 ‰) [97].

Die Kreatin-Monohydrate lassen sich nach den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe umfasst 10 Kreatin-Monohydrate mit den schwersten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von -28 bis -31 ‰, deren Basis bei der Synthese durchaus auf organischem Material beruhen könnte. Die größte Gruppe mit 15 Kreatin-Monohydraten liegt bei  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten zwischen -33 und -39 ‰ und eine kleine Gruppe mit drei Kreatin-Monohydraten mit extrem leichten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von -42 bis -44 ‰.

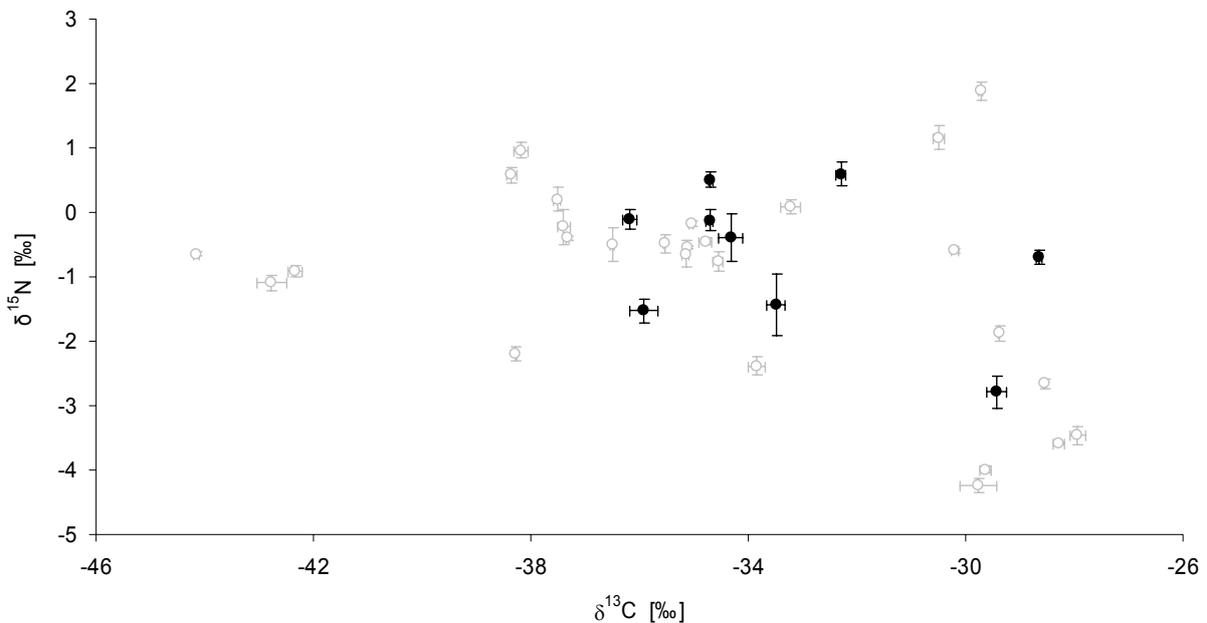
**Tab. 29:** Hersteller, Herkunft und Name verschiedener synthetischer Kreatin-Monohydrate.

<b>Firma</b>	<b>Herkunftsland</b>	<b>Name</b>
<i>Degussa</i>	Deutschland	<i>creapure™</i>
<i>DSM</i>	Österreich	<i>Kreatin ultra pure</i>
<i>Pfanstiehl</i>	USA	Creatine fine grind
<i>ACROS</i>	USA	Creatine monohydrate 99 %
<i>Merck</i>	Deutschland	Creatine-Monohydrat > 99 %
<i>Lancaster</i>	Großbritannien	Creatine monohydrate 99 %
<i>EGA</i>	Deutschland	Kreatin
<i>Aldrich</i>	USA	Creatine monohydrate 99 %
unbekannt	China	unbekannt

Auffällig ist, dass die Streuung der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von der leichtesten zur schwersten Gruppe hin deutlich zunimmt. So liegen bei der schwersten Gruppe nur maximal 0,5 ‰ zwischen den einzelnen Kreatin-Monohydraten, bei der mittleren Gruppe 3,4 ‰ und bei der schwersten Gruppe 6,1 ‰. Dies könnte ebenfalls auf unterschiedliche Edukte oder Synthesewege hinweisen. Um die drei Gruppen eventuellen Produktionsstandorten zuweisen zu können, wurden neun Kreatin-Monohydrate, die direkt vom Hersteller bezogen wurden, per EA-IRMS gemessen. Davon stammten drei Produkte aus den USA, drei aus Deutschland und je ein Produkt aus Österreich, Großbritannien und China.

Von den Herstellern waren bis auf *Degussa*, die *creapure*<sup>TM</sup> in einem deutschen Werk herstellen, keine genaueren Angaben zu Produktionsverfahren oder Produktionsstandort zu beziehen. Sieben der neun Produkte ordnen sich in die mittlere Gruppe ein, nur das chinesische Kreatin-Monohydrat und das Produkt von *EGA* weisen deutlich schwerere  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte auf.

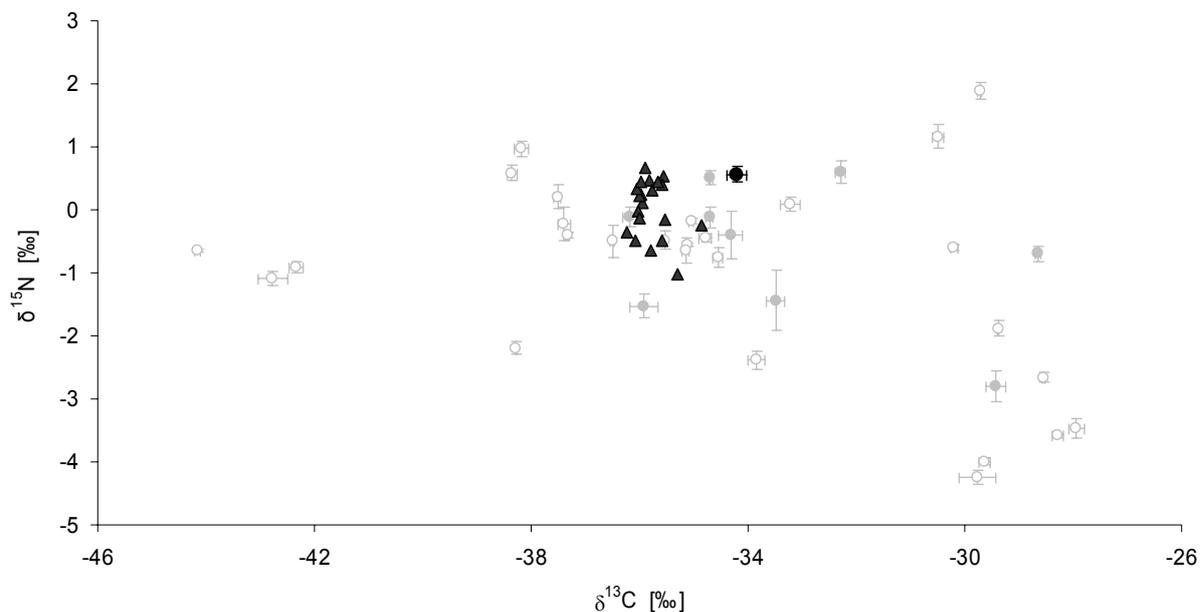
Das analysierte Kreatin von *EGA* ist eindeutig das älteste Kreatin, sowohl das Herstellungsdatum als auch der Syntheseweg können nicht mehr ermittelt werden, dürften aber in die 70er oder 80er Jahre zurückreichen. Eventuell wurde das Kreatin-Monohydrat aus China und das von *EGA* auf einem heute in Europa und der USA nicht mehr verwendeten Syntheseweg hergestellt und hat vielleicht sogar organische Quellen, d.h. es stammt aus konventioneller Produktion und wurde aus Fleischabfällen isoliert.



**Abb. 61:**  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für 27 synthetische Kreatin-Monohydrate (NEM) und neun Kreatin-Monohydrate mit bekannter Herkunft (●). Bis auf ein Kreatin-Monohydrat ordnen sich die Produkte in die drei Gruppen ein.

Für die Gruppe mit den drei Kreatin-Monohydraten mit extrem leichten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten konnte kein Hersteller zugeordnet werden. Der Hauptgruppe der Kreatin-Monohydrate, wo sich auch sieben der neun Produkte der bekannten Hersteller befinden, scheint derselbe Syntheseweg und/oder ähnlich Isotopenverhältnisse der Edukte zu Grunde zu liegen.

Um die Varianz der  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für ein Kreatin-Monohydrat eines einzelnen Produktionsstandortes abschätzen zu können, wurden verschiedene Lots desselben Produktes untersucht. Insgesamt wurden 22 verschiedene Lots des Kreatin-Monohydrates *creapure*<sup>TM</sup> der Firma *Degussa* aus einem Zeitraum von 30 Monaten untersucht. Der Zeitraum erstreckte sich von Januar 2001 bis Mitte des Jahres 2003. Elf Proben stammten von ein und derselben Produktionsanlage aus der 20. Woche, neun weitere Proben bildeten einen Querschnitt über das Jahr 2003. Eine Probe stammte aus dem Jahr 2001.



**Abb. 62:** Verteilung der  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Kreatin-Monohydrat (*creapure*<sup>TM</sup>) für den Standort Degussa, Deutschland in den Jahren 2001 und 2003 (▲). In grau Werte für 36 synthetische Kreatin-Monohydrate.

Die Untersuchungen zeigen, dass sich die 22 verschiedenen Lots sowohl in den  $\delta^{13}\text{C}$ - als auch den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten signifikant unterscheiden. So liegt die maximale Varianz zwischen zwei Lots hinsichtlich der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bei 1,90 ‰ und die der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte bei 1,68 ‰.

Die Streuung verschiedener Lots, zusammengefasst für unterschiedliche Zeiträume, liegt zwischen 0,17 ‰ und 0,44 ‰ für Kohlenstoff sowie bei 0,19 ‰ und 0,46 ‰ für Stickstoff. Damit liegen sie in der Größenordnung der Messpräzision des EA-IRMS-Systems. Allerdings erkennt man mit Zunahme des Beobachtungszeitraumes von Tagen über Monate hin zu Jahren, dass die maximalen Unterschiede zwischen den Proben zunehmen. Dies bedeutet, dass man über einen längeren Zeitraum deutliche Veränderungen der Isotopie der Syntheseprodukte erwarten

kann. Solche Schwankungen in den Isotopenverhältnissen dürften auf unterschiedliche Bedingungen während der Synthese oder wechselnde Edukte zurückzuführen sein. Trotzdem liegen die einzelnen *creapure*<sup>TM</sup> Lots alle innerhalb der mittleren Gruppe von Kreatin-Monohydraten und die Varianz der Isotopenverhältnisse für die verschiedenen Lots von *creapure*<sup>TM</sup> dürfte als Größenordnung für die Schwankungen der Isotopenverhältnisse an einem Standort herangezogen werden.

**Tab. 30:**  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für verschieden Lots des Produktes *creapure*<sup>TM</sup> der Firma Degussa aus den Jahren 2001 bis 2003. Für verschiedene Zeiträume sind die jeweiligen Mittelwerte für die Kohlenstoff- und Stickstoffisotopenwerte der jeweiligen Lots und die maximalen Unterschiede ( $\Delta_{\text{max}}$ ) zwischen den Lots zu sehen.

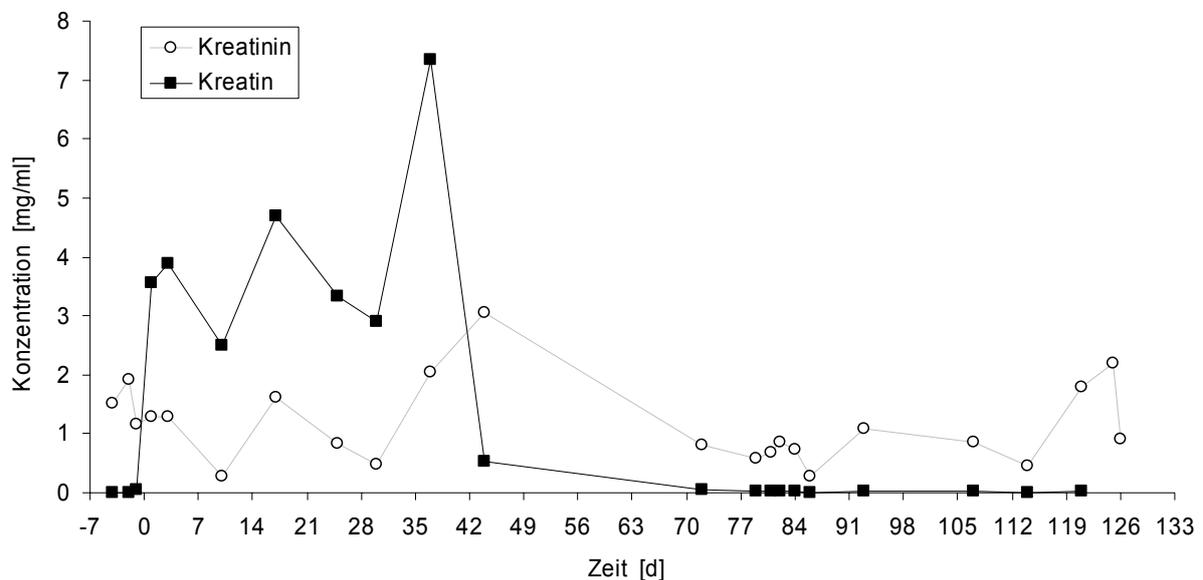
Zeitraum	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]	$\Delta_{\text{max}}^{13}\text{C}$ [‰]	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]	$\Delta_{\text{max}}^{15}\text{N}$ [‰]
20. Woche 2002 (n=11)	$-35,87 \pm 0,17$	0,49	$0,34 \pm 0,19$	0,68
5. - 31. Woche 2003 (n=9)	$-35,67 \pm 0,42$	1,36	$-0,34 \pm 0,40$	1,46
2000 - 2003 (n=21)	$-35,71 \pm 0,44$	1,90	$0,01 \pm 0,46$	1,68

Die klare Abgrenzung von *creapure*<sup>TM</sup> von den zwei anderen Gruppen von Kreatin-Monohydraten, aber auch anderen Produkten innerhalb der mittleren Gruppe, könnte eventuell für Authentizitätskontrollen genutzt werden. So könnte überprüft werden, ob ein Kreatin-Monohydrat, das als *creapure*<sup>TM</sup> gehandelt wird, wirklich die Isotopensignatur der Produkte von *Degussa* zeigt oder nicht. Eines der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel (IOC-NEM 484, von *Ultimate Nutrition*, USA) wird unter dem Namen *creapure*<sup>TM</sup> vertrieben. Sowohl die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ( $-35,54 \pm 0,01$  ‰) als auch die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte ( $-0,48 \pm 0,14$  ‰) weisen darauf hin, dass das Produkt wirklich aus der Produktion von *Degussa* stammt. Bei dieser Beurteilung müsste natürlich eine laufende Kontrolle der *creapure*<sup>TM</sup> Lots gegeben sein, um eventuelle produktionsbedingte Schwankungen in den Isotopenwerten erkennen zu können.

### 5.2.5 Fallstudie Kreatin-Monohydrat-Supplementierung

Um eine Kreatin-Monohydrat-Supplementierung durch Analyse der Isotopenverhältnisse von urinärem Kreatin und Kreatinin zu identifizieren, wurden Urine eines/einer ‚unbekannten‘ Proband/in einer Kreatin-Monohydrat-Studie untersucht. Im Rahmen dieser am *Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln* durchgeführten Studie nahmen Probanden über sechs Wochen morgens je 5 g Kreatin-Monohydrat zu sich. Die Studie wurde als doppelblind cross-over Studie durchgeführt, wobei die Probanden entweder Kreatin-Monohydrat oder Maltodextrin als Placebo erhielten. Die Probanden sammelten während der ganzen Untersuchungszeit mehrfach Urinproben. Die Urinproben wurden auf Grund der geschilderten methodischen Problematik nur hinsichtlich der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Kreatins und Kreatinins untersucht.

Die Urinproben sollten von den Probanden morgens wenige Stunden nach der Einnahme gesammelt werden, da bereits nach acht Stunden nach einer einmaligen Einnahme von Kreatin-Monohydrat kaum noch Kreatin im Urin ausgeschieden wird [44].



**Abb. 63:** Verlauf der Konzentrationen für Kreatin und Kreatinin im Urin für einen ausgewählten Probanden im Rahmen einer Studie mit Kreatin-Monohydrat Supplementierung. Zum Zeitpunkt 0 wurde mit der Einnahme des Kreatin-Monohydrates bzw. Placebos begonnen. Der deutliche Anstieg der Kreatininkonzentrationen weist darauf hin, dass in den Tagen 1 bis 42 Kreatin-Monohydrat eingenommen wurde.

Kreatin und Kreatinin wurden per HPLC quantitativ bestimmt. Für einen ausgewählten Probanden, der auf Grund erhöhter Ausscheidung an Kreatin auffällig war, wurden die Urinproben hinsichtlich der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Kreatin und Kreatinin untersucht. Eine Konzentration von Kreatin im Urin größer 1 mg/ml weist auf eine exogene Kreatin-Gabe hin [44]; durch Analyse der Stickstoffisotopie des Kreatins sollte sich diese Annahme bestätigen lassen.

Die Konzentrationsverläufe für Kreatin und Kreatinin des ausgewählten Probanden zeigen eine deutlich erhöhte Ausscheidung von Kreatin innerhalb der ersten sechs Wochen des Untersuchungszeitraumes (Tag 0 bis Tag 42). Nach der vorgeschlagenen Konzentrationsgrenze von 1 mg/ml [44] kann man hier von einer Supplementierung mit Kreatin-Monohydrat ausgehen. Nach der Supplementierungsphase wurde sechs Wochen lang von den Probanden kein Kreatin oder Placebo eingenommen, ab Tag 84 startete die zweite Phase der Supplementierung. Nach den beobachteten Kreatinkonzentrationen kann man davon ausgehen, dass bei dem ausgesuchten Probanden in der ersten Phase (Tag 0 bis 42) Kreatin-Monohydrat, und in der zweiten Phase (Tag 84 bis 126) Placebo (Maltodextrin) eingenommen wurde.

Aus den Urinproben des/der ausgewählten Probanden/Probandin wurden Kreatinin und in einem zweiten Schritt Gesamtkreatinin isoliert und per EA-IRMS gemessen. Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Kreatins ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{Cr}}$ ) wurden anschließend indirekt nach der Quantifizierung des Kreatinins und Gesamtkreatinins per HPLC bestimmt:

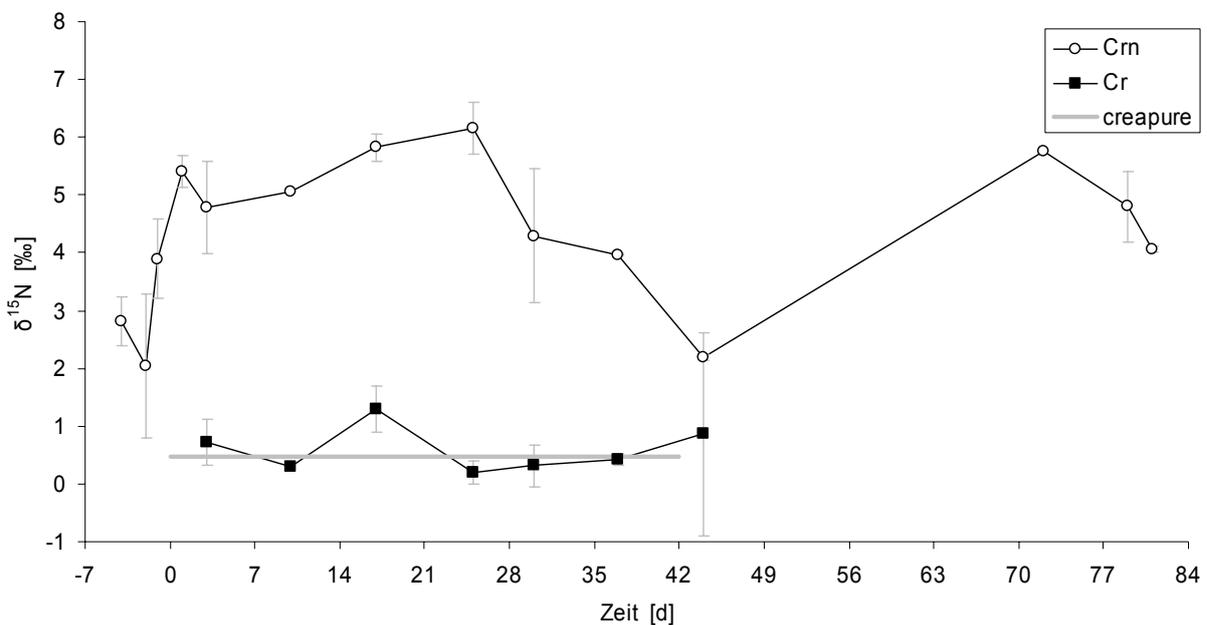
$$\delta^{15}\text{N}_{\text{Cr}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{TCr}} - a \delta^{15}\text{N}_{\text{Crn}}}{b}$$

Hierbei bezeichnen  $a$  und  $b$  den Anteil des Kreatinins bzw. des Kreatins am Gesamtkreatinin, und es gilt:  $a + b = 1$ . Der Fehler für  $\delta^{15}\text{N}_{\text{Cr}}$  wurde mit Hilfe der Fehlerfortpflanzung berechnet, eingehende Fehler sind die Messunsicherheit der Konzentrationsbestimmung per HPLC sowie die Standardabweichung ( $1\sigma$ ) der Dreifach-Bestimmung der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Kreatinin ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{Crn}}$ ) und Gesamtkreatinin ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TCr}}$ ) per EA-IRMS.

Für die Urinproben, die Kreatin enthalten, wurden die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Kreatin zwischen 0,24 und 1,29 ‰ bestimmt. Während der Studie wurde den Probanden das Kreatin-Monohydrat *creapure*<sup>TM</sup> der Firma *Degussa* zur Einnahme gegeben. Per EA-IRMS wurde für dieses Produkt ein  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von  $0,47 \pm 0,15$  ‰ ermittelt. Somit

stimmen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des urinären Kreatins für fünf der sechs untersuchten Urinproben mit dem verabreichten *creapure*<sup>TM</sup> innerhalb der Fehlergrenzen überein und weisen damit eindeutig auf die Einnahme dieses Kreatin-Monohydrates hin.

Für eine der Urinproben wurde ein  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von  $1,29 \pm 0,39$  ‰ berechnet, der damit geringfügig schwerer ist als das eingenommene Kreatin-Monohydrat. Für diese Differenz kommen zwei Erklärungen in Betracht: Entweder handelt es sich um einen nicht identifizierten Fehler in der Aufarbeitung oder der Proband hat teilweise isotopisch schwereres Kreatin ausgeschieden, das entweder körpereigener Herkunft ist oder aus der Nahrung stammen könnte.



**Abb. 64:**  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Kreatinin (Crn) und berechnete Werte für Kreatin (Cr). Der graue Balken stellt den  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert des synthetischen Kreatin-Monohydrates (*creapure*<sup>TM</sup>) dar, dem die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des urinären Kreatins (in sechs von sieben Proben) innerhalb der durch Fehlerfortpflanzung berechneten Fehlergrenzen entsprechen.

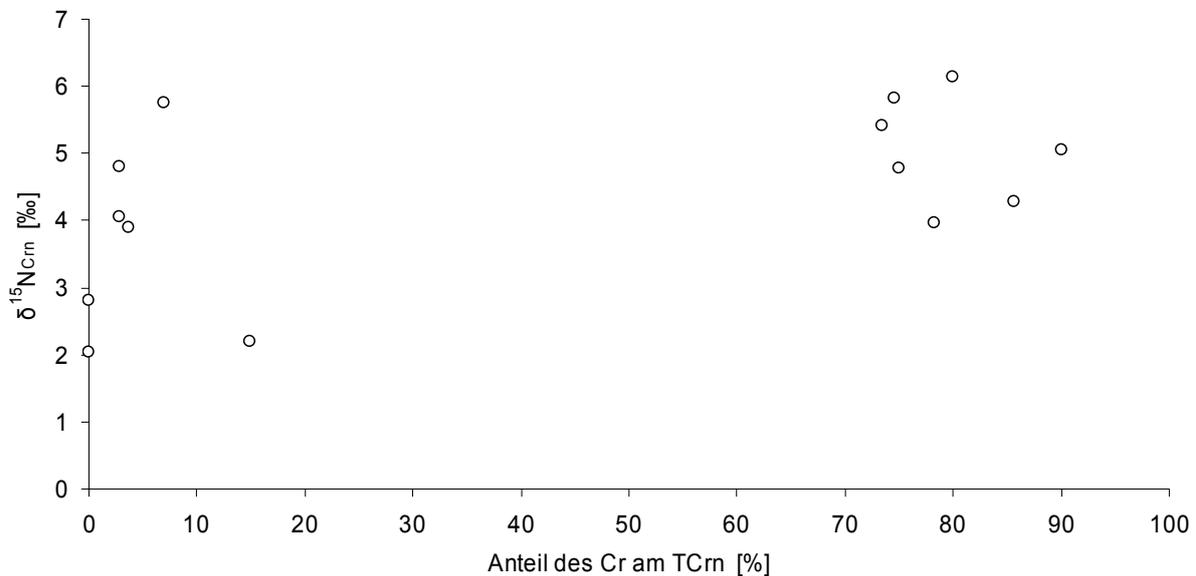
Die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Kreatinins steigen während der ersten drei Wochen des Zeitraumes der Einnahme des Kreatin-Monohydrates an. So erreichen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte ein Maximum mit  $5,82 \pm 0,68$  ‰ und das Kreatinin ist damit um  $2,46$  ‰ schwerer als vor der Supplementierung. Danach fallen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Kreatinins wieder auf das Ausgangsniveau vor der Supplementierung ab und steigen danach wieder an. Allerdings sind die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Urinproben während des Zeitraumes der Supplementierung mit einer Woche relativ groß und kurzfristige Schwankungen könnten dadurch nicht erkannt werden.

Die Kreatininkonzentrationen steigen in dem Supplementierungszeitraum geringfügig an, was auch aus der Literatur bekannt ist [149]. Grund für diesen Anstieg könnte in der Freisetzung von endogenem Kreatinin bzw. Kreatin liegen, das im Körper zu Kreatinin metabolisiert und im Urin ausgeschieden wird. Ein zweiter Grund für ansteigende Kreatininkonzentrationen könnte in der Umwandlung von Teilen des synthetischen Kreatins zu Kreatinin im Organismus begründet sein. Dies würde zu Veränderungen der Stickstoffisotopenverhältnisse des ausgeschiedenen Kreatinins in Richtung des eingenommenen Kreatin-Monohydrates führen. Bei den letzten beiden Urinproben des Supplementierungszeitraumes erkennt man sowohl erhöhte Konzentrationen an Kreatinin als auch im Vergleich zu den fünf davor untersuchten Urinproben signifikant niedrigere  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte, die auf eine Vermischung von endogenem und exogenem Kreatin/Kreatinin hinweisen.

Bei der Untersuchung der Methode der Isolierung des Kreatinins aus dem Urin mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie wurde dargestellt, dass bei der CEC durchaus auch Kreatin an dem Kationenaustauscher gebunden werden kann (Kapitel 5.2.2.3). Da im Verlauf der Studie bei sieben Urinen das Kreatin zwischen 70 und 90 % des Gesamtkreatinins ausmacht, bestünde hier grundsätzlich die Möglichkeit, dass durch eine Verunreinigung des isolierten Kreatinins mit Kreatin die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Kreatinins verfälscht würden. In Abbildung 65 erkennt man keine offensichtliche Abhängigkeit der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des isolierten Kreatinins vom Anteil an Kreatin am Gesamtkreatinin. Obwohl das ausgeschiedene Kreatin bis zu 90 % des Gesamtkreatinins ausmacht, scheint die Aufarbeitungsmethode hinsichtlich der Trennung zwischen Kreatin und Kreatinin hinreichend gut zu funktionieren.

Mit Hilfe dieser Fallstudie konnte gezeigt werden, dass bei 85 % der Urinproben, die für eine Bestimmung genug Kreatin enthielten, die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte innerhalb der Fehler dem Wert des zugeführten Kreatin-Monohydrates entsprachen und damit die Quelle des Kreatins exogener Natur war. Um bei unbekanntem Proben auf eine exogene und synthetische Quelle schließen zu können, müssten noch weitere Studien durchgeführt werden. So gälte es zu ermitteln, welchen Wert zwar exogenes, aber mit der normalen Nahrung zugeführtes Kreatin hätte. Zudem müssten die kommerziell erhältlichen Kreatin-Monohydrate umfassend hinsichtlich ihrer Stickstoffisotopenverhältnisse untersucht werden, um sicherzustellen, dass eine Differenz zwischen synthetischem Kreatin-Monohydrat und endogenem Kreatinin besteht. Des Weiteren wären Untersuchungen zum Kreatin-Metabolismus wichtig,

um zu klären, in welchem Bereich sich natürliche Stickstoffisotopenverhältnisse von urinärem Kreatinin bewegen. Zur Identifizierung exogener und synthetischer Quellen wäre damit die Bestimmung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse des ausgeschiedenen Kreatins per LC-IRMS hilfreich.



**Abb. 65:** Anteil des Kreatins am Gesamtkreatinin der Urinproben und  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des zugehörigen Kreatinins. Auch bei hohen Anteilen an Kreatin zeigen die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Kreatinins keine offensichtliche Verunreinigung durch isotopisch leichteres Kreatin.

### 5.3 Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ von Bicarbonat aus Urin

Eine Isolierung von Bicarbonat aus Urin für die IRMS sollte weitestgehend quantitativ und ohne Isotopenfraktionierung stattfinden. Es gibt nur eine Untersuchung, die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für urinäres Bicarbonat geliefert hat. Hierbei wurde Bicarbonat durch Säurefreisetzung aus Pferdeurin isoliert [76]. Allerdings wird diese Methode nicht genauer beschrieben und ist von daher auch nicht nachzuvollziehen und zu überprüfen. Gefunden wurden  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für  $\text{TCO}_2$  in einem weiten Spektrum von  $-9,1$  ‰ bis zu  $-17,8$  ‰, alle deutlich schwerer als die korrespondierenden Werte für den Gesamt-Kohlenstoff des Pferdeurins von  $-16,2$  ‰ bis zu  $-23,4$  ‰.

Bicarbonat als Salz der Kohlensäure steht in wässrigen Lösungen, und von daher auch im Urin, mit Carbonat und  $\text{CO}_2$  im Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht ist stark abhängig vom pH-Wert. So liegt im Säuren, unterhalb der ersten Säurekonstante der

Kohlensäure  $pK_s = 6,5$ , mehr  $\text{CO}_2$  als Bicarbonat, im alkalischen oberhalb der zweiten Säurekonstante von  $pK_s = 10,5$ , mehr Carbonat als Bicarbonat vor. Gelöstes  $\text{CO}_2$  wiederum steht mit dem gasförmigen  $\text{CO}_2$  aus der Atmosphäre in einem thermischen Gleichgewicht. Dieses fragile Gesamtgleichgewicht bietet vielfache Möglichkeiten zu Isotopenfraktionierungen zwischen den einzelnen Bestandteilen, von denen das gelöste  $\text{CO}_2$  bei niedrigen pH-Werten durch seine Flüchtigkeit extrem zu Isotopenfraktionierung neigt, da vermehrt der leichte Kohlenstoff in die Gasphase übertritt und der schwere Kohlenstoff in der Lösung verbleibt. Um diesen Effekt zu vermeiden, ist das Arbeiten mit dem Urin im alkalischen Bereich am günstigsten, da hier das Carbonat die vorherrschende Fraktion ist.

Aufgrund der oben angeführten Überlegungen wurde eine Methode bei alkalischen pH-Werten entwickelt, um eventuelle Isotopenfraktionierungen zu vermeiden. Durch Zugabe von gesättigter  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung (Barytwasser) zu verdünntem Urin entsteht augenblicklich das in Wasser schwerlösliche  $\text{BaCO}_3$  (Löslichkeit bei  $20\text{ }^\circ\text{C}$ :  $0,2\text{ g/L}$ ). Der Niederschlag kann leicht abzentrifugiert, gewaschen und getrocknet werden. Der quantitative Nachweis von Kohlensäure oder auch gasförmigem  $\text{CO}_2$  als Bariumcarbonat wird seit dem 19. Jahrhundert benutzt. Inwiefern diese Methode zur Isolierung von Kohlensäure bzw. Carbonat, Hydrogencarbonat und gelöstem  $\text{CO}_2$  (zusammengefasst als  $\text{TCO}_2$ ) aus Urin benutzt werden kann und ob dies ohne nennenswerte Isotopenfraktionierungen stattfindet, wird in den nächsten Kapiteln dargestellt.

### 5.3.1 Richtigkeit der Methode

Um die Richtigkeit der Methode zu überprüfen wurde kommerziell erhältlichliches  $\text{NaHCO}_3$  (*Kaisernatron*<sup>®</sup>) als Pulver und als Lösung in bidestilliertem Wasser und nachfolgender Aufarbeitung gemessen. Die Analyse des Pulvers als ‚bulk sample‘ lieferte einen  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von  $-5,90 \pm 0,09\text{ ‰}$ , ähnlich  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von  $-5,1$  bis  $-5,7\text{ ‰}$ , die in der Literatur für technisches  $\text{NaHCO}_3$  angegeben werden [74-76]. Das  $\text{NaHCO}_3$ , analysiert nach Auflösen und Aufarbeitung, lieferte einen Wert von  $\delta^{13}\text{C} = -6,45 \pm 0,05\text{ ‰}$  und liegt damit um  $0,55\text{ ‰}$  niedriger als das Ergebnis des ‚bulk sample‘. Dieser Unterschied kann seinen Ursprung entweder in

kohlenstoffhaltigen Verunreinigungen im *Kaisernatron*<sup>®</sup> oder in geringfügigen Isotopenfraktionierungen bei der Aufarbeitung haben.

Um die Methode hinsichtlich der Richtigkeit bei der Isolierung von TCO<sub>2</sub> aus Urin zu untersuchen, wurden fünf Aliquote von Pferdeurin mit unterschiedlichen Mengen einer 1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und anschließend aufgearbeitet und analysiert. Die Verhältnisse zwischen Pferdeurin und Lösung lagen zwischen 1:0,2 und 1:3,1 (jeweils v/v). Die Konzentrationen von TCO<sub>2</sub>, ermittelt nach gravimetrischer Analyse des TCO<sub>2</sub> des Pferdeurins plus die eingewogenen Mengen an NaHCO<sub>3</sub>, lagen zwischen 0,32 mol/L und 1,31 mol/L.

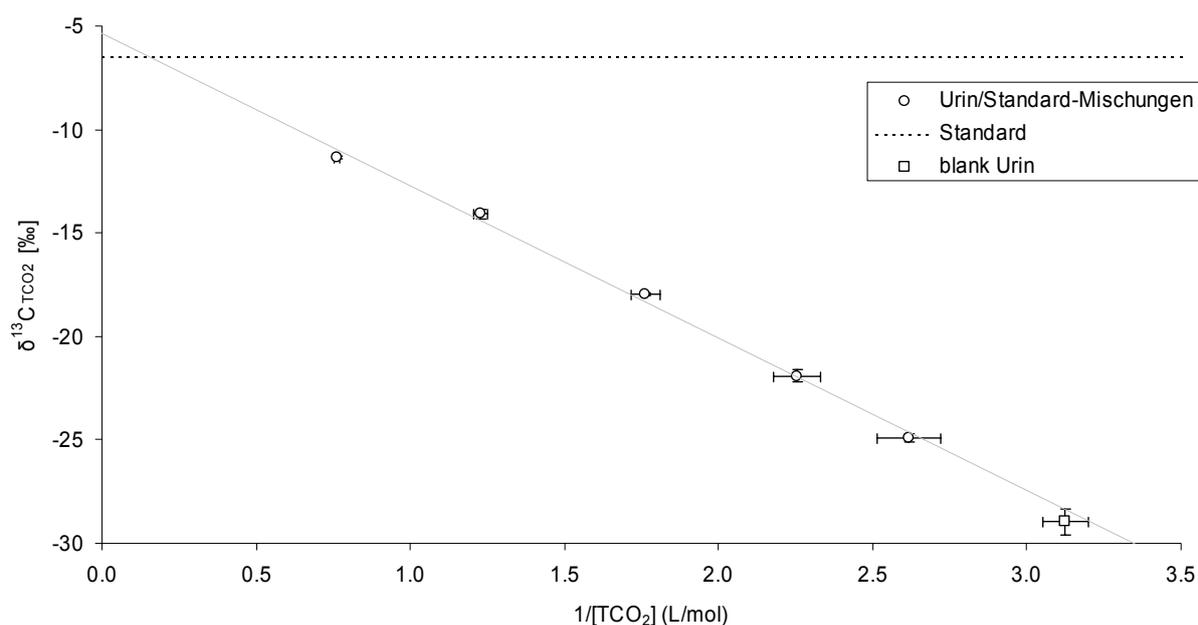
**Tab. 31:** *Volumenverhältnisse Urin zu Standard, TCO<sub>2</sub>-Konzentrationen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Pferdeurin, 5 Mischungen und NaHCO<sub>3</sub>-Standard.*

	Verhältnis (v/v) Urin zu Standard	[TCO <sub>2</sub> ] [mol/L]	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]
Pferdeurin		3,13 ± 0,14	-28,97 ± 0,61
Urin/Standard #1	1 : 0,19	2,62 ± 0,10	-24,89 ± 0,20
Urin/Standard #2	1 : 0,38	2,25 ± 0,08	-21,92 ± 0,29
Urin/Standard #3	1 : 0,76	1,76 ± 0,04	-17,99 ± 0,07
Urin/Standard #4	1 : 1,56	1,23 ± 0,02	-14,09 ± 0,23
Urin/Standard #5	1 : 3,12	0,76 ± 0,01	-11,33 ± 0,07
Standard			- 6,45 ± 0,05
Standard (bulk sample)			- 5,90 ± 0,09

Falls während der Aufarbeitung keine Isotopenfraktionierungen auftreten, sollten die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der fünf Urin/Standard-Mischungen mit den reziproken TCO<sub>2</sub>-Konzentrationen korrelieren und sich mit Hilfe der linearen Regression der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert für den hinzugefügten Standard extrapolieren lassen. Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für die fünf Mischungen zeigen mit zunehmendem Anteil an NaHCO<sub>3</sub>-Standard positivere Werte und nähern sich dem  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des technischen NaHCO<sub>3</sub> an. Der reine Pferdeurin zeigt den leichtesten  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von  $-29,0 \pm 0,6$  ‰.

Lineare Regression liefert bei einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,997$  einen y-Achsenabschnitt von  $-5,34$  ‰ für den zugesetzten NaHCO<sub>3</sub>-Standard. Damit wird der durch Aufarbeitung der reinen Lösung ermittelte Wert von  $\delta^{13}\text{C} = -6,45$  ‰ zwar um  $1,1$  ‰ überschätzt, ist aber im Verhältnis zu den zu erwartenden Unterschieden

zwischen technischem und organischem Bicarbonat tolerabel. Bei der Bestimmung der Gesamtkonzentration an Bicarbonat der Mischungen wurde davon ausgegangen, dass kein  $\text{CO}_2$ -Verlust beim Lösen und Mischen auftritt. Da es aber durchaus denkbar ist, dass auf Grund von  $\text{CO}_2$ -Verlusten die realen Konzentrationen unter den theoretisch berechneten liegen, könnte dieser nicht genauer abzuschätzende Fehler die  $\delta^{13}\text{C}$ -Differenz zwischen dem  $\text{NaHCO}_3$ -Standard und dem Ergebnis der linearen Regression erklären.



**Abb. 66:** Auftragung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Bicarbonat isoliert aus Pferdeurin ( $\square$ ) und Mischungen von Pferdeurin/ $\text{NaHCO}_3$ -Lösung in verschiedenen Verhältnissen (o). Die Fehlerbalken geben die Varianz ( $1\sigma$ ) für  $n=2$  Messungen wieder. Die gepunktete waagerechte Linie stellt den  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des zugefügten  $\text{NaHCO}_3$  Standards dar, die Linie repräsentiert die durch lineare Regression gelieferte Gerade mit  $y = -7,57x - 5,34$  mit  $R^2 = 0,997$ .

Trotz dieser Differenz zeigt Abbildung 66 deutlich, dass die  $\text{BaCO}_3$ -Methode hinreichend gut die theoretischen Isotopenverhältnisse der verschiedenen Mischungen darstellt und sich daher für die Bestimmung des  $\delta^{13}\text{C}$  von urinärem  $\text{TCO}_2$  eignet.

### 5.3.2 Präzision der Methode

Um die Präzision der Methode zu überprüfen, wurden drei Aliquote eines Human- und eines Pferdeurins aufgearbeitet und analysiert. Zudem wurde als Standard  $\text{BaCO}_3$  (99,999 %) mit dem zweiten Teil der Methode untersucht, um die Aufarbeitungspräzision der Isolierung aus dem Urin und die Messpräzision der Isotopenanalyse mit Hilfe des modifizierten EA-IRMS-Systems zu überprüfen.

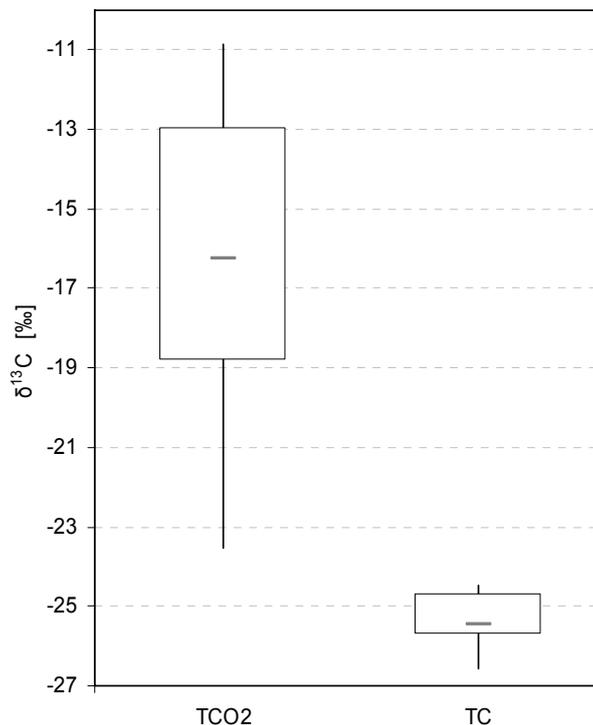
**Tab. 32:** *Präzision verschiedener Proben und Standards für die Bicarbonat-Methode, jeweils wurden n Aliquote aufgearbeitet, der  $\text{NaHCO}_3$ -Standard wurde vor der Aufarbeitung in bidestilliertem Wasser gelöst, der  $\text{BaCO}_3$  Standard wurde nur dem letzten Teil der Analyse unterzogen und repräsentiert so die Präzision des modifizierten EA-IRMS-Systems.*

Probe	$1\sigma$ [‰]	n
Pferdeurin	0,45	3
$\text{NaHCO}_3$ -Standard (aq.)	0,05	3
$\text{NaHCO}_3$ -Standard (fest)	0,09	3
$\text{BaCO}_3$ -Standard	0,14	3

Die Aufarbeitungspräzision aus Pferdeurin ist mit 0,45 ‰ etwas schlechter als die Aufarbeitungspräzision einer wässrigen  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und der Messpräzision des  $\text{BaCO}_3$ -Standards. Die Messpräzision für eine Bestimmung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses per EA-IRMS liegt bei nur 0,05 ‰. Damit führt die Modifizierung des EA-IRMS-Systems zur Messung von Carbonaten zu einer leichten Verschlechterung der Messpräzision, die allerdings tolerierbar ist. Bei der Isolierung von  $\text{TCO}_2$  aus Pferdeurin führen anscheinend Verunreinigungen zu einer weiteren Verschlechterung der Präzision. Hinweis darauf ist auch die leicht bräunliche Färbung des aus Pferdeurin ausgefällten  $\text{BaCO}_3$ . Trotzdem liegt die Präzision im Vergleich zum erwarteten Unterschied zwischen technischem und organischem Bicarbonat in einem tolerierbaren Bereich.

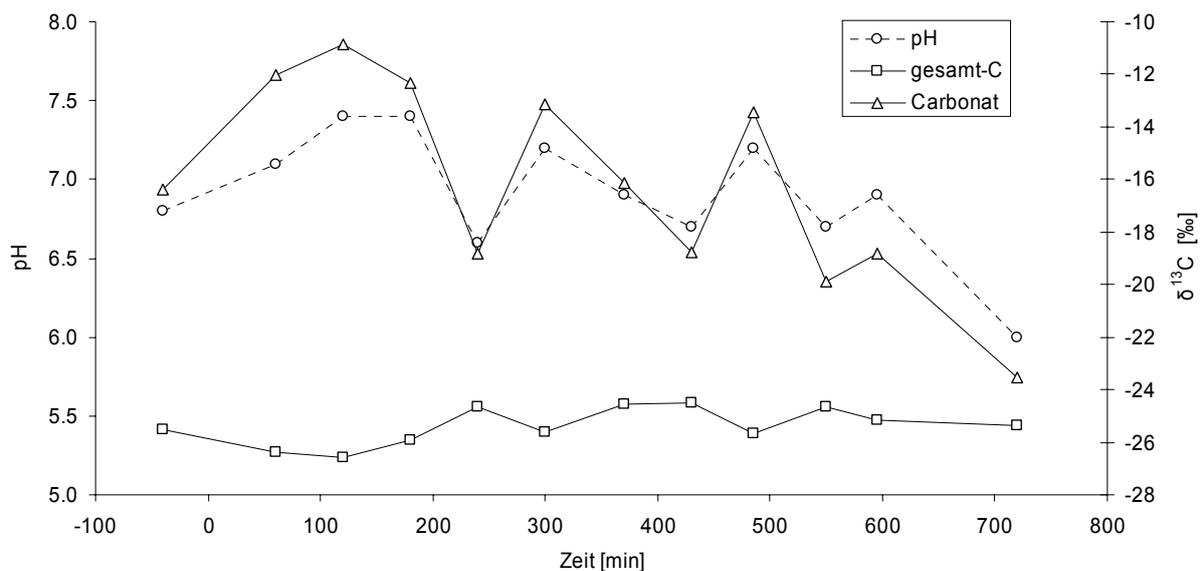
### 5.3.3 Analyse von Humanurin

Insgesamt 12 Urine von einer Person wurden über einen Zeitraum von zwölf Stunden gesammelt und die Isotopenverhältnisse des Gesamturins und des  $\text{TCO}_2$  wurden bestimmt. Bicarbonat war ein Bestandteil der Ernährung der Person, zudem wurde Bicarbonat als Antiazidum eingesetzt. Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für den Gesamtkohlenstoff des Urins schwankten während dieses Zeitraumes in einem engen Bereich von 2,11 ‰ um einen Median von -25,46 ‰. Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für  $\text{TCO}_2$  unterschieden sich deutlich von denen des Gesamtkohlenstoffs: Die Schwankungsbreite liegt bei 12,69 ‰ um einen Median von -16,26 ‰ (Abbildung 67). Die Isotopensignatur des Gesamtkohlenstoffs und des  $\text{TCO}_2$  unterscheiden sich signifikant, die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Gesamtkohlenstoffes deutet auf eine überwiegende C3-Ernährung hin, die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für  $\text{TCO}_2$  sind deutlich positiver und scheinen größtenteils von einer anderen Quelle zu stammen.



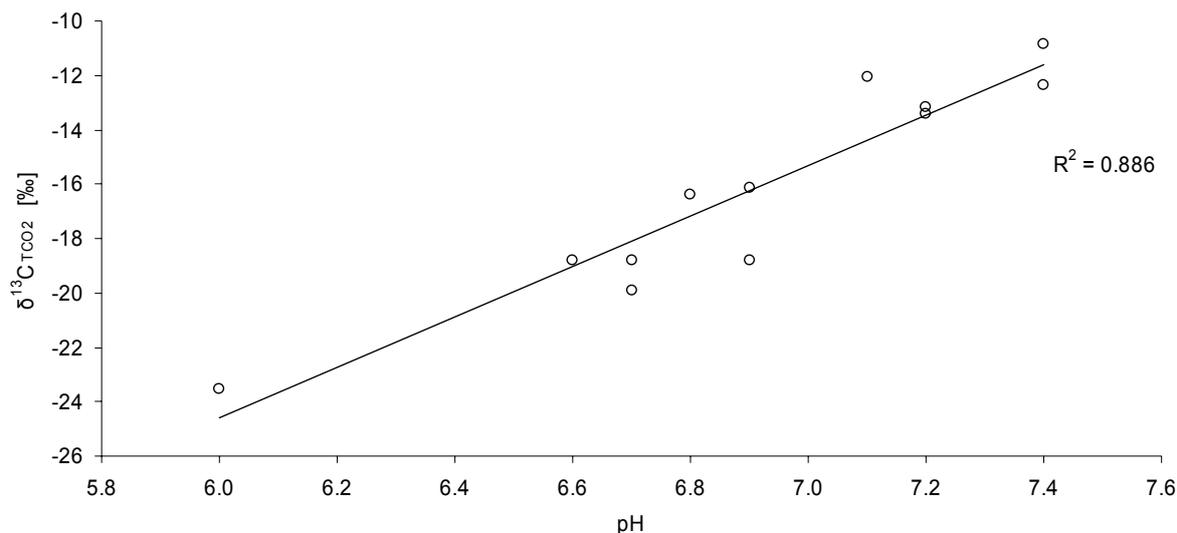
**Abb. 67:**  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für  $\text{TCO}_2$  und Gesamtkohlenstoff von Humanurin ( $n=12$ ). Auffallend ist der hoch signifikante Unterschied zwischen den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten für  $\text{TCO}_2$  und Gesamtkohlenstoff. Die Box repräsentiert die mittleren 50 % der Proben, die Horizontale den Median, die Senkrechten die maximalen und minimalen Werte.

Zum Zeitpunkt  $t = 0$  min nahm die Person 4 g *Kaisernatron*<sup>®</sup> in 100 ml Wasser zu sich, zum Zeitpunkt  $t = 140$  min ein Abendessen, tagsüber wurde Mineralwasser und Softdrinks getrunken, ab ungefähr  $t = 400$  min wurde alkoholfreies Bier getrunken. Diese Ernährung findet sich im zeitlichen Verlauf der  $\delta^{13}\text{C}$  des urinären  $\text{TCO}_2$  wieder. Isotopenverhältnisse von  $\text{CO}_2$  Getränken können sich deutlich voneinander unterscheiden. Mineralwasser und mit technischem  $\text{CO}_2$  versetzte Getränke weisen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen  $-5,0$  bis  $2,1$  ‰ auf, Getränke mit natürlicher Gärungskohlensäure wie (Weizen-)Bier dagegen C3 Signatur ( $-28,0$  ‰), Bier mit Maisanteil (C4)  $-17,4$  ‰ [150]. Wie in Abbildung 67 zu erkennen, scheinen die Isotopenverhältnisse des urinären  $\text{TCO}_2$  teilweise mineralische Quellen zu haben, und über den Verlauf der Probenahme ändert sich die Zusammensetzung des  $\delta^{13}\text{C}$  von  $\text{TCO}_2$  von einem größeren Anteil mit einer Signatur von technischem Bicarbonat zu einer C3-dominierten Quelle. Auffällig ist die Ähnlichkeit im zeitlichen Verlauf von  $\delta^{13}\text{C}$  von  $\text{TCO}_2$  und dem pH-Wert des Urins.



**Abb. 68:** Zeitliche Veränderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von  $\text{TCO}_2$  und Gesamtkohlenstoff sowie der pH-Werte von Humanurin über 12 h. Zum Zeitpunkt  $t=0$  wurde 4 g *Kaisernatron* in 100 ml Leitungswasser eingenommen.

In Abbildung 69 erkennt man die Korrelation zwischen pH-Wert und der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von  $\text{TCO}_2$ .



**Abb. 69:** Abhängigkeit von  $\delta^{13}\text{C}$  von  $\text{TCO}_2$  von dem pH-Wert des Urins. Lineare Regression liefert eine Gerade mit  $y = 9,26x - 80,17$  mit  $R^2 = 0,886$ .

Je niedriger der pH-Wert ist, desto negativer (isotopisch schwerer) ist auch das  $\text{TCO}_2$ . Von den Urinproben wurden keine Konzentrationen an Bicarbonat bestimmt, doch verändert eine vermehrte Ausscheidung von Bicarbonat im Urin auch den pH-Wert desselben [15]. Wird über die Nahrung vermehrt Bicarbonat mit einem deutlich anderen Isotopenverhältnis als das körpereigene eingenommen, sollte sich dies auch auf die Ausscheidung von Bicarbonat und damit auf die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte auswirken.

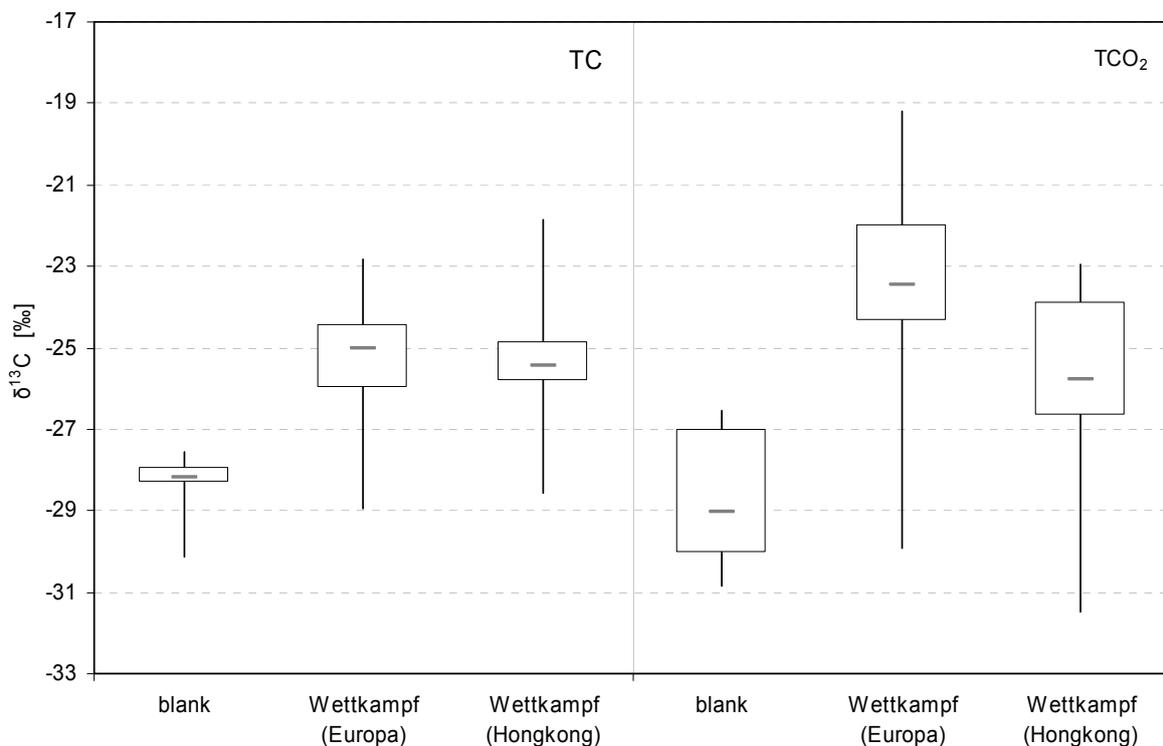
Diese Fallstudie zeigt, dass sich in humanem Urin deutliche Hinweise für eine exogene und mineralische Quelle des Bicarbonates finden lassen.

### 5.3.4 Analyse von Pferdeurin

Insgesamt wurden 60 Urine von Pferden untersucht. Hiervon waren acht Urine von Pferden, denen mit Sicherheit kein Bicarbonat oder andere exogene Substanzen gegeben wurden, diese wurden als 'blank-Urine' untersucht. Des Weiteren wurden 52 Urinproben (Wettkampfproben) aus Europa und Hongkong untersucht, als Beispiel für reale Dopingproben. Von den Urinen wurden jeweils die Isotopenverhältnisse sowohl des Gesamtkohlenstoffs als auch des Kohlenstoffs des  $\text{TCO}_2$  bestimmt. Abbildung 70 zeigt die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für die beiden Fraktionen

aufgeteilt in die Populationen 'blank', 'Wettkampfproben aus Europa' und 'Wettkampfproben aus Hongkong'.

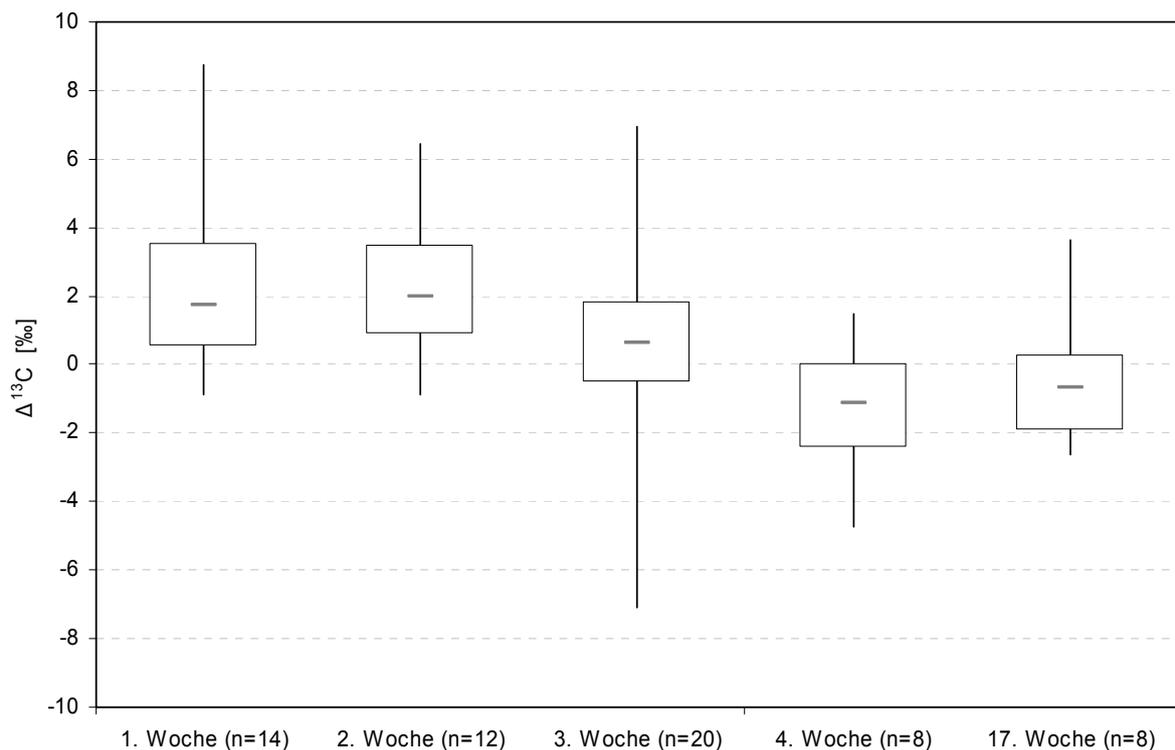
Auffällig ist der signifikante Unterschied im Gesamtkohlenstoff (TC) zwischen den 'blank' Urinen und den Wettkampfproben sowohl aus Europa als auch aus Hongkong. Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für den Gesamtkohlenstoff der 'blank-Urine' weisen eine eindeutige C3-Signatur auf, die Pferde haben sich nachweislich von Heu und Gras ernährt und kein Kraftfutter bekommen. Dagegen sind die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für die Wettkampfpferde deutlich schwerer, dies könnte durch einen Anteil an C4-Pflanzen im Kraftfutter der Pferde begründet sein (Mais). Vergleicht man die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Gesamtkohlenstoff und  $\text{TCO}_2$  der einzelnen Populationen, so finden sich deutliche Unterschiede. Bei den 'blank-Urinen' und den Wettkampfproben aus Hongkong ist zwar die Varianz der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von  $\text{TCO}_2$  größer als die des Gesamtkohlenstoffes, allerdings unterscheiden sie sich kaum in den absoluten Werten. Auch die Mediane unterscheiden sich nicht signifikant. Anders ist dies bei den Wettkampfproben aus Europa: Hier weisen einige der Urine deutlich schwerere  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für  $\text{TCO}_2$  auf als für Gesamtkohlenstoff.



**Abb. 70:**  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von  $\text{TCO}_2$  und Gesamt-Kohlenstoff für verschiedenen Populationen von Pferdeurinproben. 'blank' sind Pferde, denen kein Bicarbonat verabreicht wurde ( $n=8$ ), die restlichen sind Wettkampfproben aus Europa ( $n=36$ ) und Hongkong ( $n=16$ ). Die Box repräsentiert die mittleren 50 % der Proben, die Horizontale den Median, die Senkrechten die maximalen und minimalen Werte.

Kategorisiert man die Urine nach der Zeit, die zwischen Probenahme und Analyse vergangen ist, so kann ein Trend erkannt werden. Auffällig ist, dass bei Urinen, bei denen zwischen Probenahme und Analyse nur ein oder zwei Wochen vergangen sind, fast alle  $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte positiv sind, d.h. der Kohlenstoff von  $\text{TCO}_2$  ist isotopisch leichter als vom Gesamturin. Bei Urinproben, die nach vier oder siebzehn Wochen analysiert wurden, ist die Verteilung anders, so treten hier deutlich kleinere und negative  $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte auf.

Es handelt sich bei den Urinproben zwar um unterschiedliche Urine, doch ist es auffällig, dass mit zunehmender Zeitspanne zwischen Probenahme und Analyse deutlich weniger positive Differenzen auftreten. Grund hierfür könnten eventuelle enzymatische Reaktionen sein, die die Isotopenverhältnisse des  $\text{TCO}_2$  verändern, eventuell durch Zersetzung von Harnstoff. Dieser Trend zeigt, dass Urine so schnell wie möglich nach Probenahme aufgearbeitet werden sollten, um eventuelle Verschiebungen der Isotopenverteilung zu vermeiden.



**Abb. 71:** Differenz zwischen  $\delta^{13}\text{C}$  von  $\text{TCO}_2$  und Gesamt-Kohlenstoff ( $\Delta^{13}\text{C}$ ), für Urinproben analysiert in der jeweiligen Woche nach Probenahme. Die Box repräsentiert die mittleren 50 % der Proben, die Horizontale den Median, die Senkrechten die maximalen und minimalen Werte.

Auch sind die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für  $\text{TCO}_2$  der Wettkampfproben, aber auch der 'blank-Urine' mit Vorsicht zu betrachten, da eventuell der Zeitraum zwischen Probenahme

und Analyse schon zu groß war. Die beobachteten Effekte zeigen, dass sich die Isolierung von urinärem  $\text{TCO}_2$  durch Zugabe von Barytwasser sehr gut für die Dopinganalyse eignet, da die Fällung direkt nach Probenahme vor Ort erfolgen kann.

Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit auf Grund des organisatorischen Aufwandes keine Ausscheidungsstudie bei einem Pferd durchgeführt werden und so kein Anhaltspunkt für eine Veränderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von  $\text{TCO}_2$  im Urin nach Applikation von Bicarbonat ermittelt werden. Auffällig ist jedoch, dass die Unterschiede der Kohlenstoffisotopenverhältnisse zwischen Bicarbonat und Gesamtkohlenstoff im Pferdeurin bei den untersuchten Urinen kleiner war als bei der Fallstudie in humanem Urin. Ob eine Gabe von Bicarbonat beim Pferd ähnliche Auswirkungen auf die urinären Kohlenstoffisotopenverhältnisse wie beim Menschen hat, könnte aber nur durch eine Fallstudie am Pferd geklärt werden. Des Weiteren wäre die Wahl einer unabhängigen, nicht von Bicarbonat beeinflussten Referenzsubstanz aus dem Urin für die Beurteilung einer exogenen Quelle des Bicarbonates wichtig.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die natürlichen Isotopenverhältnisse für die Hauptbestandteile von humanem Urin Harnstoff ( $\delta^{15}\text{N}$ ), Kreatinin und Kreatin ( $\delta^{15}\text{N}$ ) und Bicarbonat ( $\delta^{13}\text{C}$ ) bestimmt. Diese Substanzen sind für die Sportwissenschaft und Dopinganalytik von Interesse. Harnstoff wird als Hauptmetabolit des endogenen Protein- bzw. Aminosäurestoffwechsels schon seit Jahrzehnten für die Interpretation metabolischer Vorgänge bei Belastung herangezogen. Kreatin und sein Metabolit Kreatinin sind für die Dopinganalytik interessant, da eine übermäßige Supplementierung mit Kreatin-Monohydrat nach der Doping-Definition des Europarates von 1963 als Doping angesehen werden kann, bisher aber noch kein analytischer Nachweis zur Identifizierung von exogenem Kreatin aus dem Urin besteht. Bicarbonat steht im Pferdesport auf der Liste der verbotenen Substanzen, allerdings weist der bisherige Dopingnachweis über die Konzentration an Gesamt- $\text{CO}_2$  im Plasma methodische Schwächen auf.

Die Analyse der Isotopenverhältnisse des Harnstoff-Stickstoffs ermöglicht zusätzlich zur klassischen Interpretation der Konzentrationen an Harnstoff im Urin weitere Interpretationsmöglichkeiten, da von den  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten des Harnstoffes auf die Quellen der abgebauten Aminosäuren zurück geschlossen werden kann. Zusätzlich dazu ermöglicht die Analyse der Stickstoffisotopenverhältnisse des Harnstoffes unter Berücksichtigung der Isotopenverhältnisse der Ernährung und der Serum- und Strukturproteine Aussagen über das Ausmaß der endogenen Proteinsynthese und des Proteinabbaus.

Die Methode zur Isolierung von Harnstoff aus Urin mit Hilfe der Xanthidrol-Fällung wurde aus dem Tierversuch übernommen und für humanen Urin überprüft. Harnstoff kann aus humanem Urin mit einer Aufarbeitungspräzision von 0,2 ‰ isoliert werden. Auf Grund der Instabilität des Harnstoffes hinsichtlich seines Stickstoffisotopenverhältnisses sollte der Urin so schnell wie möglich nach Abnahme aufgearbeitet werden. Das isolierte Produkt Dixanthylurea ist über Monate hinweg lagerbar und hinsichtlich der  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte stabil.

In einer Fallstudie bei einem 24-Stunden-Radrennen konnte gezeigt werden, dass sich die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des urinären Harnstoffes bei Belastung und in der Erholung unterscheiden. Das Ausmaß dieser Unterschiede variierte unter den drei Probanden. Um die Stickstoffisotopenwerte des Harnstoffes zur Interpretation metabolischer

Vorgänge bei Belastung heranzuziehen, wurden weitere Parameter wie die Konzentrationen an Harnstoff, Kreatinin, Ammonium und Proteinen bestimmt sowie einerseits die Stickstoffisotopenverhältnisse des mit der Nahrung zugeführten Proteins als auch andererseits der Serum- und Struktur-Proteine ermittelt. Mit Hilfe eines Stoffflussmodells, das die wichtigsten Stoffflüsse des endogenen Protein- bzw. Aminosäurestoffwechsels berücksichtigt, konnte für die einzelnen Probanden für jeden Zeitpunkt einer Urinprobe das Verhältnis zwischen Proteinsynthese und -abbau berechnet werden. Mit Hilfe des Modells lassen sich katabole und anabole Phasen des Stoffwechsels bei den einzelnen Probanden eindeutig identifizieren.

Um die Isotopenverhältnis von urinärem Kreatin und Kreatinin per EA-IRMS zu bestimmen, wurde eine Aufarbeitungsmethode mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie entwickelt. Die Methodenentwicklung berücksichtige sowohl die besonderen Anforderungen an eine Analyse per EA-IRMS als auch die Anforderungen hinsichtlich einer einfachen und in der Routineanalytik einsetzbaren Methode. Die Isolierung von Kreatinin aus dem Urin für die Bestimmung der Stickstoffisotopenverhältnisse erfolgt ohne signifikante Isotopenfraktionierung und Verunreinigung an Fremdstickstoff. Die Isotopenverhältnisse von eventuell im Urin vorhandenem Kreatin können indirekt über die Konzentrationsbestimmung von Kreatin und Kreatinin und die Analyse der Stickstoffisotopenverhältnisse von Kreatinin und Gesamtkreatinin (Kreatin und Kreatinin, isoliert als Kreatinin nach Umwandlung des Kreatin zu Kreatinin) erfolgen.

Die Analyse der Isotopenverhältnisse von 27 als Nahrungsergänzungsmittel gekennzeichneten Kreatin-Monohydraten zeigte eine breite Spanne der  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte. Die Stickstoffisotopenverhältnisse der synthetischen Kreatin-Monohydrate lagen fast ausschließlich in einem Bereich, der sich außerhalb der bekannten physiologischen  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Menschen befindet. Hinsichtlich der Kohlenstoffisotopenverhältnisse können die Kreatin-Monohydrate in drei Gruppen eingeteilt werden. Offensichtlich kann man dabei zwischen technischem Kreatin-Monohydrat und Kreatin, isoliert aus organischem Material, unterscheiden.

Die Analyse des Stickstoffisotopenverhältnisses von Kreatin und Kreatinin im Urin kann neben der Bestimmung der Konzentrationen eine exogene Gabe von synthetischem Kreatin-Monohydrat belegen. Obwohl 2002 von der WADA empfohlen wurde, Kreatin-Monohydrat nicht auf die Liste der verbotenen Substanzen zu setzen, kann mit einer in der vorliegenden Arbeit dargestellten Fallstudie durchaus belegt

werden, dass exogenes Kreatin, das wenige Stunden nach Einnahme unmetabolisiert ausgeschieden wird, direkt mit dem eingenommenen Nahrungsergänzungsmittel in Verbindung gebracht werden kann. Das Argument, das durch Analyse des Urins grundsätzlich nicht zwischen synthetischem und organischem Kreatin unterschieden werden kann, ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht mehr haltbar.

Die Analyse der Kohlenstoffisotopenverhältnisse von urinärem Bicarbonat ist mit Hilfe der quantitativen Fällung durch Barytwasser und der Messung mit einem für die Gasanalyse modifizierten EA-IRMS-System möglich. Die Analyse des Kohlenstoffisotopenverhältnisses von Bicarbonat aus humanem Urin zeigte, dass sich das ausgeschiedene Bicarbonat hinsichtlich seiner Kohlenstoffisotopie deutlich von dem Rest des Urins unterscheidet und auf mit der Nahrung zugeführte Quellen aus technischer Produktion hinweist. Die Analyse der Kohlenstoffisotopenverhältnisse von Bicarbonat aus Pferdeurin zeigt nicht so große Unterschiede zwischen der Bicarbonat-Kohlenstofffraktion und dem restliche Urin. Trotzdem sollte eine Identifizierung technischer Quellen des Bicarbonates im Pferdeurin über die Analyse der Kohlenstoffisotopenverhältnisse möglich sein und könnte im Rahmen einer kontrollierten Ausscheidungsstudie beim Pferd überprüft werden.

## Literaturverzeichnis

- [1] Peterson, B.J., B. Fry, Stable isotopes in ecosystem studies, *Annual Review Ecology Systematics*, **18**: 293-320 (1987)
- [2] Post, D.M., Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions, *Ecology*, **83**: 703-718 (2002).
- [3] Rounick, J.S., M.J. Winterbourn, Stable carbon isotopes and carbon flow in ecosystems, *BioScience*, **36**: 171-177 (1986)
- [4] Ehleringer, J., D.A. Cooper, M.J. Lott, G.S. Cook, Geo-location of heroin and cocaine by stable isotope ratios, *Forensic Science International*, **106**: 27-35 (1999)
- [5] Hobson, K.A., Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review, *Oecologia*, **120**: 314-326 (1999)
- [6] Becchi, M., R. Aguilera, Y. Farizon, M.-M. Flament, H. Casabianca, P. James, Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **8**: 304-308 (1994)
- [7] Weilacher, T., G. Gleixner, H.-L. Schmidt, Carbon isotope pattern in purine alkaloids a key to isotope discriminations in C1 compounds, *Phytochemistry*, **41**: 1073-1077 (1996)
- [8] Flenker, U., F. Hülsemann, W. Schänzer, Elucidation of original and metabolic sources of ephedrines by stable isotope analysis, *Proceedings of the Manfred Donike Workshop, 25th Cologne Workshop on Dope Analysis*, Köln, 2007
- [9] Herxheimer, H., Grundriss der Sportmedizin, Thieme, Leipzig 1933
- [10] Hollmann, W., Sportmedizin: Grundlagen für Arbeit, Training und Präventivmedizin, Schattauer, Stuttgart 2000
- [11] Hobson, K.A., R.G. Clark, Assessing avian diets using stable isotopes II: factors influencing diet-tissue fractionation, *Condor*, **94**: 189-197 (1992)
- [12] Hobson, K.A., R.T. Alisauskas, R.G. Clark, Stable-nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: implications for isotopic analyses of diet, *Condor*, **95**: 388-394 (1993)

- [13] Fuller, B.T., J.L. Fuller, N.E. Sage, D.A. Harris T.C. O'Connell, R.E.M. Hedges, Nitrogen balance and  $\delta^{15}\text{N}$ : why you're not what you eat during pregnancy, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **18**: 2889-2896 (2004)
- [14] Fuller, B.T., J.L. Fuller, N.E. Sage, D.A. Harris T.C. O'Connell, R.E.M. Hedges, Nitrogen balance and  $\delta^{15}\text{N}$ : why you're not what you eat during nutritional stress, *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**: 2497-2506 (2005)
- [15] Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Körperflüssigkeiten, 8. Auflage, Basel 1977
- [16] Chanutin, A., The fate of creatine when administered to man, *J Biol Chem*, **67**: 29-41 (1925)
- [17] Peronnet, F., B. Aguilaniu, Lactic acid buffering, nonmetabolic  $\text{CO}_2$  and exercise hyperventilation: a critical reappraisal. *Respir Physiol Neurobiol*, **150**: 4-18 (2005)
- [18] Harkins, J.D., S.G. Kamerling. Effects of induced alkalosis on performance in thoroughbreds during a 1 600-m race, *Equine Vet J*, **24**: 94-98 (1992)
- [19] Lawrence, L., K. Kline, P. Miller-Graber, A. Siegel, E. Kurcz, M. Fisher, K. Bump, Effect of sodium bicarbonate on racing standardbreds, *J Anim Sci*, **68**: 673-677 (1990)
- [20] Linderman, J.K., K.L. Gosselink, The effects of sodium bicarbonate ingestion on exercise performance, *Sports Med*, **18**: 75-80 (1994)
- [21] Matson, L.G., Z.V. Tran, Effects of sodium bicarbonate ingestion on anaerobic performance: a meta-analytic review, *Int J Sport Nutr*, **3**: 2-28 (1993)
- [22] Auer, D.E., K.V. Skelton, S. Tay, F.C. Baldock. Detection of bicarbonate administration (milkshake) in standardbred horses, *Aust Vet J*, **70**: 336-340 (1993)
- [23] Wöhler, F., Sur la formation artificielle de l' urée, *Annal Chim Phys*, **37**: 330-334 (1828)
- [24] Fick, A., J. Wislicenus, On the origin of muscular power, *Phil Mag Lond*, **31**: 485-503 (1866)
- [25] Haralambie, G., A. Berg, Serum urea and amino nitrogen changes with exercise duration, *Europ J Appl Phys*, **36**: 39-48 (1976)

- [26] Dohm, G.L., R.T Williams, G.J. Kasperek, A.M van Rij, Increased excretion of urea and N-tau-methylhistidine by rats and humans after a bout of exercise, *J Appl Physiol*, **52**: 27-33 (1982)
- [27] Tarnopolsky, L.J., J.D. MacDougall, S.A. Atkinson, M.A. Tarnopolsky, J.R. Sutton, Gender differences in substrate for endurance exercise, *J Appl Physiol*, **68**: 302-308 (1990)
- [28] Urhausen, A., M. Heckmann, W. Kindermann, Ammoniakverhalten bei erschöpfender Ausdauerbelastung, *Dt Z Sportmedizin*, **39**: 354-365 (1988)
- [29] Rennie, M.J., J.L. Boowtell, D.J. Millward, Physical activity and protein metabolism, in: C. Bouchard, R.J. Shephard, T. Stephens (Ed.): Physical activity, fitness, and health, *International Proceedings and Consensus Statement*. Human Kinetics Publishers, Champaign (Ill.) 1994
- [30] Millward, D.J., C.T. Davies, D. Halliday, S.L. Wolman, D. Matthews, M. Rennie, Effect of exercise on protein metabolism in humans as explored with stable isotopes, *Fed Proc*, **41**: 2686-2691 (1982)
- [31] Wolfe, R.R., Does exercise stimulate protein breakdown in humans? Isotopic approaches to the problem, *Med Sci Sports Exerc*, **19**: 172-178 (1987)
- [32] Edgar, G., R.A. Wakefield, The kinetics of the conversion of creatine into creatinine in hydrochloric acid solutions, *J Am Chem Soc*, **45**: 2242-2245 (1923)
- [33] Bloch, K., R. Schonheimer, Studies in protein metabolism. XI. The metabolic relation of creatine and creatinine studied with isotopic nitrogen. *J Biol Chem*, **131**: 111-119, (1939)
- [34] Chevreul, M.E., Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der Fleischbrühe, *J Prakt Chem*, **6**: 120-130 (1835)
- [35] Pettenkofer, M., Vorläufige Notiz über einen neuen stickstoffhaltigen Körper im Harn, *Annal Chem Pharm*, **52**: 97-100 (1844)
- [36] Liebig, J., Über die Bestandteile der Flüssigkeiten des Fleisches, *Liebig's Annalen*, **62**: 257-369 (1847)
- [37] Wyss, M., R. Kaddurah-Daouk, Creatine and creatinine metabolism, *Physiol Reviews*, **80**: 1107-1213 (2000)
- [38] Walker, J.B., Creatine: biosynthesis, regulation and function, J. Wiley, A Meister (Ed.), *Advances of Molecular Biology*, New York: 177-241 (1979)

- [39] Balsom, P.D., K. Söderlund, B. Ekblom, Creatine in humans with special reference to creatine supplementation, *Sports Med*, **18**: 268-280 (1994)
- [40] Persky, A.M., G.A. Brazeau, Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate, *Pharmacological Reviews*, **53**: 161-176, (2001)
- [41] Juhn, M.S., M. Tarnopolsky, Oral creatine supplementation and athletic performance: a critical review, *Clin J Sport Med*, **8**: 286-297 (1998)
- [42] Benzi, G., Is there a rationale for the use of creatine either as nutritional supplementation or drug administration in humans participating in a sport? *Pharmacol Res*, **41**: 255-264 (2000)
- [43] Hoberman, H.D., E.A.H. Sims, J.H. Peters, Creatine and creatinine metabolism in the normal male adult studied with the aid of isotopic nitrogen, *J Biol Chem*, **172**: 45-58 (1948)
- [44] Gotzmann, A., B. Komanns, A. Adib, M. Bredehöft, W. Schänzer, Creatine - a doping substance? *Proceedings of the Manfred Donike Workshop*, **8**: 33-40 (2000)
- [45] Goldman, R., J.X. Moss, Synthesis of creatine in nephrectomized rats, *Am J Physiol*, **197**: 865-868 (1959)
- [46] Walker, J.B., Metabolic control of creatine biosynthesis, *J Biol Chem*, **235**: 2357-2361 (1960)
- [47] Hoogwerf, B.J., D.C. Laine, E. Greene, Urine C-peptide and creatinine (Jaffe method) excretion in healthy adults on varied diets: sustained effects of varied carbohydrate, protein and meat content, *Am J Clin Nutr*, **43**: 350-360 (1986)
- [48] Delanghe, J., J.P. De Slypere, M. De Buyzere, J. Robbrecht, R. Wieme, A. Vermeulen, Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians, *Clin Chem*, **35**:1802-1803 (1989)
- [49] Newbold, R.P., R.K. Scopes, Post-mortem glycolysis in ox skeletal muscle, *Biochem J*, **105**: 127-136 (1967)
- [50] Judel, K.G., Die Geschichte von Liebigs Fleischextrakt, *Spiegel der Forschung*, **20**: 6-17 (2003)
- [51] Schneller durch Fleischextrakt, *Der Spiegel*, **35**: 227 (1992)
- [52] Bamberger, M., The magic portion, *Sports Illustrated*, **88**: 58-61 (1998)

- [53] Metzl, J.D., E. Small, S.R. Levine, J.C. Gershel, Creatine use among young athletes, *Pediatrics*, **108**: 421-425 (2001)
- [54] Williams, M.H., R.B. Kreider, J.D. Branch, Creatine: the power supplement, *Human Kinetics*, Champaign, IL 1999
- [55] Bird, S.P., Creatine supplementation and exercise performance: a brief review, *J Sports Science Medicine*, **2**: 123-132 (2003)
- [56] Poortmans, J.R., M. Francaux, Long-term oral creatine supplementation does not impair renal function in healthy athletes, *Med Sci Sports Exerc*, **31**: 1108-1110 (1999)
- [57] Schilling, B.K., M.H. Stone, A. Utter, J.T. Kearney, M. Johnson, R. Coglianese, L. Smith, H.S. O'Bryant, A.C. Fry, M. Starks, R. Keith, M.E. Stone, Creatine supplementation and health variables: a retrospective study, *Med Sci Sports Exerc*, **33**: 183-188 (2001)
- [58] Poortmans, J.R., M. Francaux, Adverse effects of creatine supplementation: fact or fiction? *Sports Medicine*, **30**: 155-170 (2000)
- [59] McArdle, W.D., Exercise Physiology: Energy, Nutrition and Human Performance, Lippincott Williams, Baltimore, 2007
- [60] Weiss, S., H. Krummer, Process for the preparation of a creatine or creatine monohydrate, *US patent 5719319* (1998)
- [61] An, L., Y. Zheng, G. Zhang, Process for producing creatine or creatine-monohydrate, *US patent 6326513* (2001)
- [62] Harris, R.C., Effects and safety of dietary and supplementary creatine, in: Creatine - from the basis science to clinical application, Kluwer Academic Publishers, 2000
- [63] Brink, W.D., What's really in your creatine? Muscle Magazine Intl. Mississauga, Canada, 2000
- [64] Schänzer, W., M. Thevis, Doping und Dopinganalytik: Wirkstoffe und Methoden, *Chemie in unserer Zeit*, **38**: 230-241 (2004)
- [65] Sehling, M., R. Pollert, D. Hackfort, Doping im Sport: Medizinische, sozialwissenschaftliche und juristische Aspekte, BLV, München 1989
- [66] Hultman, E., Is creatine administration doping? *Lakartidningen*, **91**: 356-358 (1994)
- [67] Maelicke, A., Kreatin und Doping, *Nachr Chem Tech Lab*, **47**: 1326 (1999)

- [68] World Anti Doping Agency (WADA): Ethics and Education Committee Meeting 3 July 2002, Montreal, Canada, [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org) (1.5.2007)
- [69] Kindermann, W., Dopingproblematik und aktuelle Dopingliste, *Dt Zeitschr Sportmed*, **55**: 90-95 (2004)
- [70] Pitts, R.F., J.L. Ayer, W.A. Schiess, P. Miner, The renal regulation of acid-base balance in man. III The reabsorption and excretion of bicarbonate, *J Clin Invest*, **28**: 35-44 (1949)
- [71] Wassermann, K., J.E. Hansen, D.Y. Sue, R. Casaburi, B.J. Whipp, Principles of exercise testing and interpretation. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2005
- [72] McKenzie, D.C., Changes in urinary pH following bicarbonate loading. *Can J Sport Sci*, **13**: 254-256 (1988)
- [73] Kline, K.H., "Milkshakes" for the horse, *J Equi Vet Sci*, **24**: 374-378 (2004)
- [74] Stenhouse, A., D. Auer, K. Skelton, R. Osborne, J. Rogerson, R. Kazlauskas, G. Trout, A. Bryce, A. Andrew, Analytical confirmation of sodium bicarbonate administrations to horses using carbon isotope ratio mass spectrometry, *Proc 14th Int Conf Racing Analysts Veterinarians*, Orlando, USA: 189-191 (2002)
- [75] Kenneth, W., B.V. Hinchcliff, A. Sams. Effect of nasogastric administration of sodium bicarbonate on carbon-13 isotopic enrichment of carbon dioxide in serum of horses, *Am J Veter Res*, **63**: 307-310 (2004)
- [76] Andrew, A.S., A.J. Bryce, A. Stenhouse, J. Rogerson, Evaluation of an independent confirmatory test for total plasma carbon dioxide (TCO<sub>2</sub>), RIRDC Publication No 05/167, Australia 2005
- [77] Platzner, I., Second generation isotope ratio mass spectrometers, in: I. T. Platzner (Ed.): Modern isotope ratio mass spectrometry, *Chemical Analysis*, **145**: 7-10 (1997).
- [78] Sano, M., Y. Yotsui, H. Abe, S. Sasaki, A new technique for the detection of metabolites labelled by the isotope <sup>13</sup>C using mass fragmentography, *Biomed Mass Spectrom*, **3**: 1-3 (1976)
- [79] Matthews, D.E., J.M. Hayes, Isotope-ratio-monitoring gas chromatography-mass spectrometry, *Anal Chem*, **50**: 1465-1473 (1978)

- [80] Habfast, K., Advanced isotope ratio mass spectrometry I: Magnetic isotope ratio mass spectrometers, in: I. T. Platzner (Ed.): Modern isotope ratio mass spectrometry, *Chemical Analysis*, **145**: 11-82 (1997).
- [81] Werner, R.A., B.A. Bruch, W.A. Brand, Conflow III - an interface for precision  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  analysis, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **13**: 1237-1241 (1999)
- [82] Santrock, J., A. Stephen, J.M. Hayes, Isotopic analyses based on the mass spectrum of carbon dioxide, *Anal Chem*, **57**: 1444-1448 (1985)
- [83] Epstein, S., T. Mayeda, Variation of O18 content of waters from natural sources, *Geochim Cosmochim Acta*, **4**: 213-224 (1953)
- [84] IAEA-TECDOC-825, Reference and intercomparison materials for stable isotopes of light elements, IAEA, VIENNA, 1995
- [85] Mariotti, A., Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural  $^{15}\text{N}$  abundance measurements, *Nature*, **303**: 685-687 (1983)
- [86] IAEA, Database of natural matrix reference materials, <http://www-naweb.iaea.org/nahu/nmrm/nmrm2003/browse.htm> (22.04.2007)
- [87] Donike, M., K.-R. Bärwald, K. Klostermann, W. Schänzer, J. Zimmermann, Nachweis von exogenem Testosteron, in: H. Heck, W. Hollmann, H. Liesen, R. Rost (Ed.), Sport: Leistung und Gesundheit, Deutscher Ärzte Verlag, Köln: 293-298 (1983)
- [88] Zimmermann, J., Untersuchung zum Nachweis von exogenen Gaben von Testosteron, Dissertation, Deutsche Sporthochschule Köln, 1986
- [89] WADA Laboratory Committee, Reporting and Evaluation Guidance for Testosterone, Epitestosterone, (T/E) Ratio and Other Endogenous Steroids, Montreal, World Anti Doping Agency, WADA document TD2004EAAS, 2004
- [90] Stöckigt, D., H.-L. Schmidt, A. Rossmann, N. Christoph, Herkunft und Authentizität von Lebensmitteln: Stabilisotopenanalytik, *Chemie in unserer Zeit*, **39**: 90-99 (2005)
- [91] Kelly, S.D., Using stable isotope ratio mass spectrometry (IRMS) in food authentication and traceability, in: M. Lees (Ed.) Food authenticity and traceability, CRC Press, Boca Raton 2003
- [92] Jamin, E., J. Gonzalez, G. Remaud, N. Naulet, G.G. Martin, Detection of exogenous sugars or organic acids addition in pineapple juices and

- concentrates by  $^{13}\text{C}$  IRMS analysis, *J Agric Food Chem*, **45**: 3961-3967 (1997)
- [93] Boner, M., H. Förstel, Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef, *Anal Bioanal Chem*, **378**: 301-310 (2004)
- [94] Kornexl, B.E., T. Werner, A. Roßmann, H.-L. Schmidt, Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients – a possible tool for origin assignement and quality control, *Zeitschr Lebensmitteluntersuchung -forschung A*, **205**: 19-24 (1997)
- [95] Schmidt, H.-L., A. Roßmann, S. Voerkelius, W.H. Schnitzler, M. Georgi, J. Graßmann, G. Zimmermann, R. Winkler, Isotope characteristics of vegetables and wheat from conventional and organic production, *Isotopes Environ Health Studies*, **41**: 223-228 (2005)
- [96] Brooks, J.R., N. Buchmann, S. Philipps, B. Ehleringer, R.D. Evans, M. Lott, L.A. Martinelli, W.T. Pockmann, D. Sandquist, J.P. Sparks, L. Sperry, D. Williams, J.R. Ehleringer, Heavy and light beer: a carbon isotope approach to detect C4 carbon in beers of different origins, styles, and prices, *J Agric Food Chem*, **50**: 6413-6418 (2002)
- [97] Krummen, M., A.W. Hilkert, D. Juchelka, A. Duhr, H.J. Schlüter, R. Pesch, A new concept for isotope ratio monitoring liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **18**: 2260-2266 (2004)
- [98] Galimov, E.M., V.S. Sevastyanov, E.V. Kulbachevskaya, A.A. Golyavin, Isotope ratio mass spectrometry:  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  analysis for tracing the origin of illicit drugs, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **19**: 1213-1216 (2005)
- [99] Schoeller, D.A., Isotope fractionation: why aren't we what we eat? *J Archaeol Sci*, **26**: 667–673 (1999)
- [100] Lajtha, K., J.D. Marshall, Sources of variation in the stable isotope composition of plants, in: K. Lajtha, R.H. Michener (Ed.): *Methods in ecology: stable isotopes in ecology and environmental science*, Blackwell, Oxford: 1-21 (1994)
- [101] Lajtha, K., J.D. Marshall, Stable isotopes ratios as tracers in marine aquatic food webs, in: K. Lajtha, R.H. Michener (Ed.): *Methods in ecology: stable isotopes in ecology and environmental science*, Blackwell, Oxford: 138-157 (1994)

- [102] De Niro, M.J., S. Epstein, influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals, *Geochim Cosmochim Acta*, **42**: 495-506 (1978)
- [103] Tieszen, L.L., T.W. Boutton, K.G. Tesdahl, N.A. Slade, Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet, *Oecologia* **57**: 32-37 (1983)
- [104] Nakamura, K., D.A. Schoeller, F.J. Winkler, H.L. Schmidt, Geographical variation in the carbon isotope composition of the diet and hair in contemporary man, *Biomed Mass Spectrom* **9**: 390-394 (1982)
- [105] Koch, P.L., M.L. Fogel, N. Tuross, Tracing the diets of fossil animals using stable isotopes, in: K. Lajtha, R.H. Michener (Ed.): *Methods in ecology: stable isotopes in ecology and environmental science*, Blackwell, Oxford: 138-157 (1994)
- [106] Minagawa, M., E. Wada, Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food chains: Further evidence and the relation between  $^{15}\text{N}$  and animal age, *Geochim Cosmochim Acta*, **48**: 1135-1140 (1984)
- [107] Katzenberg, N.M., H.R. Krause, Application of stable isotope variation in human tissues to problems of identification, *Can Soc Forens Sci J*, **22**: 7-19 (1989)
- [108] Sick, H., N. Roos, E. Saggau, K. Haas, V. Meyn, B. Walch, N. Trugo, Amino acid utilization and isotope discrimination of amino nitrogen in nitrogen metabolism of rat liver in vivo, *Z Ernährungswiss*, **36**: 340-346 (1997)
- [109] Fosse, R., A. Robyn, F. Francois, *Compt Rend Acad*, **159**: 367 (1914)
- [110] Engel, M.G., F.L. Engel. The colorimetric microdetermination of urea nitrogen by the xanthydrol method, *J Biol Chem*, **167**: 535-541 (1947)
- [111] Saggau, E., Untersuchungen des Stickstoff-Metabolismus bei monogastrischen Tieren (Ratten) durch Analyse der N-Isotopendiskriminierung, Diplomarbeit, Universität zu Kiel, 1994
- [112] Edgar, G., W.S. Hinegardner, The preparation of creatinine from creatine, *J Biol Chem*, **56**: 881-886 (1925)
- [113] Smith-Palmer, T., Separation methods applicable to urinary creatine and creatinine, *J Chromat B*, **781**: 93-106 (2002)
- [114] Taussky, H.H., G. Kurzmann, A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction, *J Biol Chem*, **208**: 853-861 (1954)

- [115] Matissek, R., F.-M. Schnepel, G. Steiner, Lebensmittelanalytik, Springer, Berlin, 2005
- [116] Iwata, T., H. Iwata, J.F. Holland, Isolation of albumin from human serum by means of trichloroacetic acid and ethanol, *Clinical Chem*, **14**: 22-30 (1968)
- [117] Rodkey, F.L., Separation and determination of the total globulins of human serum, *Clinical Chem*, **11**: 488-494 (1965)
- [118] Thermo Finnigan, Isodat NT, Operating Manual, Issue 06/2002, Thermo Finnigan, Egelsbach, 2002
- [119] DesMarais, D.J., J.M. Hayes, Tube cracker for opening glass-sealed ampoules under vacuum, *Anal Chem*, **48**: 1651-1652 (1976)
- [120] Le Q. Stuart-Williams, H., A new method for the isotopic examination of sub-milligram carbonate samples, using sulphamic acid (NH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H) at elevated temperatures, in: P.A. de Groot (Ed.), Handbook of stable isotope analytical techniques, Elsevier, Amsterdam **1**: 229-236 (2004)
- [121] Keeling, C.D., The concentration and isotopic abundances of atmospheric carbon dioxide in rural areas, *Geochim Cosmochim Acta*, **13**: 322-334, (1958)
- [122] Keeling, C.D., The concentration and isotopic abundance of carbon dioxide in rural and marine air, *Geochim Cosmochim Acta*, **24**: 277-298, (1961)
- [123] Pataki, D.E., J.R. Ehleringer, L.B. Flanagan, D. Yakir, D.R. Bowling, C.J. Still, N. Buchmann, J.O. Kaplan, J.A. Berry, The application and interpretation of keeling plots in terrestrial carbon cycle research, *Global Biogeochemical Cycles*, **17**: 22.1-22.14 (2003)
- [124] Liu, P., Untersuchung zur Stabilität des <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N-Verhältnisses von Harnstoff im Humanurin, Diplomarbeit, Deutsche Sporthochschule Köln, 2007
- [125] Case, S., D. Evans, G. Tibbets, D. Miller, Dietary intakes of participants in the Iditarod human powered ultramarathon, *Alaska Med*, **37**: 20-24 (1995)
- [126] Gabel, A., A. Aldous, C. Edgington, Dietary intake of two elite male cyclists during 10-day, 2'050-mile ride, *Int J Sport Nutr*, **5**: 56-61 (1995)
- [127] Knechtle, B., G. Müller, Ernährung bei einem Extremausdauerwettkampf, *Dtsch Z Sportmed*, **53**: 54-57 (2002)
- [128] Lindemann, A.K., Nutrient intake of an ultraendurance cyclist, *Int J Sport Nutr*, **1**: 79-85 (1991)

- [129] Ainsworth, B.E., W.L. Haskell, M.C. Whitt, M.L. Irwin, A.M. Swartz, S.J. Strath, W.L. O'Brien, D.R. Basset, K.H. Schmitz, P.O. Emplaincourt, D.R. Jacobs, A.S. Leon, Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities, *Med Sci Sports Exerc*, **32**: 498-516 (2000)
- [130] Petzke, K.J., H. Boeing, C.C. Metges, Choice of dietary protein of vegetarians and omnivores is reflected in their hair protein  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  abundance, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, **19**: 1392-1400
- [131] Macko, S.A., M.L.F. Estep, M.H. Engel, P.E. Hare, Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination, *Geochim Cosmochim Acta*, **50**: 2143-2146 (1986)
- [132] Decombaz, J., P. Reinhardt, K. Anantharaman, G. van Lutz, J.R. Poortmans, Biochemical changes in a 100 km run: Free amino acids, urea and creatinine, *Eur J Appl Physiol*, **41**: 61-72 (1979)
- [133] Refsum, H.E., S.B. Stromme, Urea and creatinine production and excretion in urine during and after prolonged heavy exercise, *Scand J Clin Lab Invest*, **33**: 247-274 (1974)
- [134] Sutton, J.R., C.J. Toews, G.R. Ward, I.H. Fox, Purine metabolism during strenuous muscular exercise in man, *Metabolism*, **29**: 254-260 (1980)
- [135] Macko, S.A., M.H. Engel, V. Andrusevich, G. Lubec, T.C. O'Connell, R.E.M. Hedges, Documenting the diet in ancient human populations through stable isotope analysis of hair, *Phil Transact Royal Soc B: Biol Sci*, **354**: 65-76 (1999)
- [136] Hare, P.E., M.L. Fogel, T.W. Stafford, A.D. Mitchell, T.C. Hoering, The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins, *J Archaeol Sci*, **18**: 277-292 (1991)
- [137] Saitoh, M., M. Uzuka M. Sakamoto, T. Kobori, in: Hair Growth, W. Montagna, R.L. Dobson (Ed.), Pergamon Press, Oxford, 183-201 (1969)
- [138] Steele, K.W., R.M. Daniel, Fractionation of nitrogen isotopes by animals: a further complication to the use of variations in the natural abundance of  $^{15}\text{N}$  for tracer studies, *J Agric Sci Cambridge*, **90**: 7-9 (1978)
- [139] Araki, S., F. Sata, K. Murata, Adjustment for urinary flow rate: an improved approach to biological monitoring, *Int Arch Occup Environ Health*, **62**: 471-477 (1990)

- [140] Köhler, K., Effects of supplementation with zinc-monomethionine-aspartate on the metabolism of testosterone in young men, Diplomarbeit, Universität von Hohenheim, 2006
- [141] Hayes, J.M., Fractionation of the isotopes of carbon and hydrogen in biosynthetic processes, in: P.H. Ribbe, J.J. Rosso (Ed.), Stable Isotope Geochemistry, Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 43: Mineralogical Society of America and the Geochemical Society, Washington, 2001
- [142] Mader, A., A transcription-translation activation feedback circuit as a function of protein degradation, with the quality of protein mass adaption related to the average functional load, *J Theor Biol*, **134**: 135-157 (1988)
- [143] Vasillades, J., Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: I Kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex, *Clin Chem*, **22**: 1664-1671 (1976)
- [144] Peabody, W.A., Improved preparation of creatinic zinc chloride, *J Am Chem Soc*, **68**: 1131 (1946)
- [145] Yokoyama, Y., H. Sato, M. Tsuchiva, H. Kakinuma, Simultaneous determination of urinary creatinine and aromatic amino acids by cation-exchange chromatography with ultraviolet detection, *J Chromat*, **566**: 19-28 (1991)
- [146] Achari, R., M. Mayersohn, K.A. Conrad, HPLC analysis of creatinine in human plasma and urine, *J Chrom Science*, **21**: 278-281 (1983)
- [147] Sternbach, H., Chromatographische Methoden in der Biochemie, Stuttgart: Thieme, 1991
- [148] de la Torre, X., J.C. Gonzáles, S. Pichini, J.A. Pascual, J. Segura,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Isotope Ratio MS analysis of testosterone, in chemicals and pharmaceutical preparations, *J Pharm Biomed Anal*, **24**: 645-650 (2001)
- [149] Parise, G., S. Mihic, D. MacLennan, K.E. Yarasheski, M.A. Tarnopolsky, Effects of acute creatine monohydrate supplementation on leucine kinetics and mixed-muscle protein synthesis, *J Appl Physiol*, **91**: 1041-1047 (2001)
- [150] Calderone, G., N. Naulet, C. Guillou, F. Reniero, A.I.B. Cortes, Analysis of  $^{13}\text{C}$  natural abundances of  $\text{CO}_2$  gas from sparkling drinks by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spec*, **19**: 701-705 (2005)

## 8 Anhang

### Anhang 1 Chemikalienliste

**Tab. 33:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien, Reinheit und Bezug.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Acetonitril	HPLC grade	<i>J. T. Baker</i> , Deventer, NL
Albumin, bovine (LOT 129H14201)	RIA grade	<i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D
Amidoschwefelsäure	99,3 %	<i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D
Bariumhydroxid Octahydrat	≥ 98 %	<i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D
Chloroform	p.a.	<i>Merck</i> , Darmstadt, D
Dikaliumhydrogenphosphat	p.a.	<i>Merck</i> , Darmstadt, D
Essigsäure	≥ 99,7 %	<i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D
Ethanol	p.a.	<i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D
9-Hydroxyxanthen	98 %	<i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a.	<i>Merck</i> , Darmstadt, D
Kaliumhydroxid	p.a.	<i>KMF</i> , Lohmar, D
Methanol	>99,8 %	<i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D
Natriumhydrogencarbonat	p.a.	<i>KMF</i> , Lohmar, D
Natriumhydroxid	>97,0 %	<i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D
di-Phosphorpentoxid	reinst	<i>Merck</i> , Darmstadt, D
Pikrinsäure	98 %	<i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D
Salzsäure	32 %	<i>KMF</i> , Lohmar, D
Schwefelsäure	95-97 %	<i>Merck</i> , Darmstadt, D
Trichloressigsäure	>99 %, p.a.	<i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D

## Anhang 2 Experimentelle Daten Belastungsstudie

Tab. 34: Experimentelle Daten Belastungsstudie Proband 1.

Probe Name	Datum d/m/y	Uhrzeit hh:mm	$\Delta t$ min	t h	V ml	pH	Dichte g/ml	[HS] mmol/L	[Cn] mmol/L	[NH <sub>4</sub> ] $\mu$ mol/L	[Prot] mg/L
P1 01	11/09/2006	11:30	510	-104,0	200	7,0	1,018	233	7,98	10140	161,4
P1 02	11/09/2006	20:00	1125	-95,5	420	6,9	1,007	75	2,25	4560	35,7
P1 03	12/09/2006	14:45	1035	-76,8	340	6,9	1,016	168	5,20	9200	130,6
P1 04	13/09/2006	08:00	1800	-59,5	60	6,5	1,018	246	7,26	11120	136,0
P1 05	14/09/2006	14:00	1630	-29,5	140	7,2	1,028	282	14,42	7660	157,4
P1 06	15/09/2006	17:10	60	-2,3	400	6,8	1,015	179	4,82	7080	69,5
P1 07	15/09/2006	18:10	50	-1,3	350	6,8	1,006	75	1,94	3040	57,3
P1 08	15/09/2006	19:00	90	-0,5	350	7,2	1,006	54	1,70	2820	53,2
P1 09	15/09/2006	20:30	60	1,0	500	6,6	1,004	38	1,32	2680	63,1
P1 10	15/09/2006	21:30	225	2,0	500	6,6	1,005	46	1,60	3740	100,5
P1 11	16/09/2006	01:15	115	5,8	360	6,7	1,018	177	5,66	8340	104,2
P1 12	16/09/2006	03:10	140	7,7	250	6,8	1,020	211	5,89	5780	136,3
P1 13	16/09/2006	05:30	135	10,0	270	7,1	1,020	212	4,96	5180	82,9
P1 14	16/09/2006	07:45	120	12,3	350	7,1	1,021	224	4,17	5740	115,9
P1 15	16/09/2006	09:45	135	14,3	280	6,8	1,021	259	6,33	7960	84,3
P1 16	16/09/2006	12:00	120	16,5	260	6,3	1,023	329	5,14	11200	42,0
P1 17	16/09/2006	14:00	135	18,5	180	6,0	1,024	377	6,14	16780	54,9
P1 18	16/09/2006	16:15	90	20,8	260	6,2	1,024	379	6,31	13840	39,8
P1 19	16/09/2006	17:45	115	22,3	500	6,2	1,025	411	6,92	12360	42,9
P1 20	16/09/2006	19:40	140	24,2	260	5,9	1,025	522	6,66	15480	38,7
P1 21	16/09/2006	22:00	620	26,5	250	6,4	1,024	440	7,03	13660	56,3
P1 22	17/09/2006	08:20	85	36,8	450	5,4	1,028	698	14,26	47360	60,6
P1 23	17/09/2006	09:45	255	38,3	60	6,1	1,027	620	13,78	27420	104,9
P1 24	17/09/2006	14:00	165	42,5	330	6,7	1,022	452	8,34	17300	78,9
P1 25	17/09/2006	16:45	345	45,3	250	6,6	1,018	403	7,93	18580	97,3
P1 26	17/09/2006	22:30	40	51,0	560	6,4	1,018	349	6,81	17080	37,3
P1 27	17/09/2006	23:10	560	51,7	100	5,6	1,010	206	4,08	13920	35,7
P1 28	18/09/2006	08:30	165	61,0	900	6,3	1,016	313	6,79	19780	54,1
P1 29	18/09/2006	11:15	180	63,8	410	7,4	1,009	171	4,10	10720	42,9
P1 30	18/09/2006	14:15	135	66,8	400	7,1	1,012	201	4,61	11660	35,6
P1 31	18/09/2006	16:30	105	69,0	500	6,6	1,016	194	3,93	8100	168,4
P1 32	18/09/2006	18:15	150	70,8	350	6,5	1,014	186	3,11	9060	50,3
P1 33	18/09/2006	20:45	210	73,3	510	7,4	1,009	123	2,13	2900	45,5
P1 34	19/09/2006	00:15	420	76,8	500	6,4	1,005	76	1,56	5660	35,9
P1 35	19/09/2006	07:15	290	83,8	320	5,7	1,016	240	6,01	24340	43,0
P1 36	19/09/2006	12:05	430	88,6	570	6,0	1,017	213	4,80	13900	59,0
P1 37	19/09/2006	19:15	405	95,8	280	6,9	1,013	162	3,47	3360	41,2
P1 38	20/09/2006	02:00	390	102,5	640	5,4	1,002	31	0,94	3820	27,6
P1 39	20/09/2006	08:30	660	109,0	610	5,0	1,012	159	4,70	16960	35,2
P1 40	20/09/2006	19:30	380	120,0	430	5,3	1,013	205	5,10	20260	41,9
P1 41	21/09/2006	01:50		126,3	570	5,7	1,002	29	1,09	5800	12,2

**Tab. 35:** Experimentelle  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte Belastungsstudie Proband 1, # bezeichnet die Einzelmessung, m den Mittelwert der Einzelmessung,  $1\sigma$  ist die Standardabweichung.

Probe	$\delta^{15}\text{N}$ (Gesamt-N)					$\delta^{15}\text{N}$ (Harnstoff)				
	#1	#2	#3	m	$1\sigma$	#1	#2	#3	m	$1\sigma$
Name	‰									
P1 01	4,03	4,65		4,34	0,44	3,07	2,64		2,85	0,31
P1 02	4,16	5,07	4,64	4,62	0,46	4,33		4,32	4,32	0,01
P1 03	5,07	4,59		4,83	0,34	4,49		4,42	4,45	0,05
P1 04	4,32	5,02	4,66	4,67	0,35	4,92		4,72	4,82	0,14
P1 05	4,14	4,48	4,17	4,26	0,19	4,83		4,51	4,67	0,22
P1 06	3,90	4,62	4,62	4,38	0,42	4,31	3,94		4,12	0,26
P1 07		4,33	4,71	4,52	0,27	4,10	4,04		4,07	0,04
P1 08		4,17	4,60	4,38	0,30	3,46	3,37		3,42	0,07
P1 09		4,34	4,80	4,57	0,33					
P1 10	4,49	4,24	4,83	4,52	0,29	4,64	4,71		4,68	0,05
P1 11	5,19	5,88	5,08	5,38	0,43	5,31	4,79	5,11	5,07	0,26
P1 12		5,13	5,14	5,13	0,00	5,67	4,72	5,08	5,16	0,48
P1 13		5,34	5,09	5,22	0,18	5,18	4,76		4,97	0,29
P1 14		5,73	5,18	5,45	0,39	5,20	4,94		5,07	0,18
P1 15	4,33	4,57	5,34	4,74	0,53					
P1 16	5,14	4,59	5,29	5,00	0,37	5,18		5,10	5,14	0,05
P1 17	4,88	4,79	5,26	4,98	0,25	5,12	4,90		5,01	0,16
P1 18	4,60	4,64	5,18	4,81	0,33	5,05	4,59		4,82	0,33
P1 19	4,70	5,37	5,11	5,06	0,34	4,25	4,66		4,46	0,29
P1 20	5,09	5,51	5,32	5,31	0,21	4,78	4,61		4,70	0,13
P1 21	4,53	5,03	5,86	5,14	0,67	4,40	4,51		4,46	0,07
P1 22	5,09	5,18	5,29	5,19	0,10	4,47	4,36		4,41	0,07
P1 23		4,72	4,82	4,77	0,07	3,37	3,66		3,52	0,20
P1 24		4,32	4,89	4,60	0,40	3,26	3,73		3,50	0,33
P1 25	4,18	4,17	4,62	4,32	0,26	3,77	4,07		3,92	0,21
P1 26	4,38	4,12	4,68	4,39	0,28	4,19	3,91		4,05	0,20
P1 27	3,60	4,05	4,47	4,04	0,44	3,91	4,21		4,06	0,21
P1 28	4,15	3,97	4,77	4,29	0,42	4,09	4,05		4,07	0,03
P1 29		4,13	4,66	4,40	0,37	4,10	4,21		4,15	0,07
P1 30		4,12	4,68	4,40	0,40	4,16	4,05		4,11	0,08
P1 31	4,08	4,06	4,70	4,28	0,36	4,46	4,17		4,31	0,21
P1 32		4,81	5,32	5,07	0,36	4,66	4,40		4,53	0,18
P1 33		4,70	5,11	4,91	0,29	3,60	4,38		3,99	0,55
P1 34		5,89	6,33	6,11	0,31	4,11	4,36		4,24	0,18
P1 35	4,52		5,08	4,80	0,39	4,78	4,51		4,64	0,20
P1 36		5,12	4,94	5,03	0,13	4,93	4,36		4,64	0,41
P1 37		4,40	4,50	4,45	0,07	4,35	4,29		4,32	0,04
P1 38	3,14		4,57	3,85	1,01	4,03	3,76		3,89	0,19
P1 39	3,90	3,70	4,43	4,01	0,38	4,31	3,91		4,11	0,28
P1 40	4,97		5,33	5,15	0,25	5,02	4,31		4,66	0,50
P1 41	6,78		6,44	6,61	0,25	3,78	4,04		3,91	0,19

**Tab. 36:** Experimentelle Daten Belastungsstudie Proband 2.

Probe	Datum	Uhrzeit	$\Delta t$	t	V	pH	Dichte	[GS-N]	[HS]	[Cn]	[NH <sub>4</sub> ]	[Prot]
Name	d/m/y	hh:mm	min	h	ml		g/ml	mg/l	mmol/l	mmol/l	$\mu$ mol/l	mg/l
P2 01	11/09/2006	19:45	985	-94,9	170	6,2	1,012	5,76	185	3,44	25200	50,0
P2 02	12/09/2006	12:30	1170	-78,5	150	5,6	1,006	3,49	98	2,02	10600	26,3
P2 03	13/09/2006	08:00	1485	-59,0	40	5,4	1,015	11,80	360	10,97	48600	57,5
P2 04	14/09/2006	08:45	1965	-34,3	50	5,9	1,024	15,75	479	12,15	40600	80,9
P2 05	15/09/2006	17:00	120	-1,5	450	6,9	1,003	1,73	54	1,33	6800	23,5
P2 06	15/09/2006	19:00	145	-0,5	200	6,7	1,009	3,75	128	3,19	10000	32,8
P2 07	15/09/2006	21:25	115	1,9	630	6,8	1,004	1,70	55	1,53	8400	68,1
P2 08	15/09/2006	23:20	85	3,8	320	5,8	1,010	4,80	169	4,33	27200	36,3
P2 09	16/09/2006	00:45	150	5,3	210	7,3	1,024	9,30	280	9,10	13600	81,1
P2 10	16/09/2006	03:15	125	7,8	650	7,0	1,003	1,57	49	1,10	4600	26,4
P2 11	16/09/2006	05:20	125	9,8	310	6,5	1,010		143	2,81	14400	42,6
P2 12	16/09/2006	07:25	110	11,9	400	6,4	1,009		134	2,39	11200	33,4
P2 13	16/09/2006	09:15	175	13,8	500	6,5	1,010	4,10	143	2,47	11000	39,3
P2 14	16/09/2006	12:10	200	16,7	350	5,6	1,016	7,92	266	4,64	24000	40,3
P2 15	16/09/2006	15:30	146	20,0	320	5,1	1,021	10,39	333	7,14	34800	43,8
P2 16	16/09/2006	17:56	74	22,4	380	5,6	1,010	7,10	200	3,85	15600	53,3
P2 17	16/09/2006	19:10	200	23,7	770	6,7	1,002	2,06	58	1,07	5000	28,2
P2 18	16/09/2006	22:30	840	27,0	220	5,2	1,016	12,21	371	8,33	39800	43,1
P2 19	17/09/2006	12:30	180	41,0	480	5,5	1,023	19,70	641	17,26	64400	74,6
P2 20	17/09/2006	15:30	45	44,0	80	5,6	1,029	25,04	754	21,37	80000	124,7
P2 21	17/09/2006	16:15	435	44,8	50	5,8	1,027	21,63	649	15,03	56800	102,3
P2 22	17/09/2006	23:30	510	52,0	300	5,7	1,030	23,47	708	13,86	79600	89,1
P2 23	18/09/2006	08:00	180	60,5	430	6,0	1,026	22,58	712	12,27	57200	76,8
P2 24	18/09/2006	11:00	1200	63,5	70	6,9	1,015	11,66	350	6,24	33200	70,3
P2 25	19/09/2006	07:00	360	83,5	500	6,2	1,020	12,54	416	9,53	49200	57,9
P2 26	19/09/2006	13:00	690	89,5	350	7,6	1,003	1,50	38	0,82	6400	29,3
P2 27	20/09/2006	00:30	420	101,0	450	6,2	1,020	11,63	365	6,21	28800	52,6
P2 28	20/09/2006	07:30	1050	108,0	760	5,6	1,015	9,49	315	5,15	31200	31,2
P2 29	21/09/2006	01:00	420	125,5	150	5,5	1,017	9,75	308	7,10	51800	58,7
P2 30	21/09/2006	08:00		132,5	580	5,8	1,014	9,54	292	7,55	34000	50,7

**Tab. 37:** Experimentelle  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte Belastungsstudie Proband 2, # bezeichnet die Einzelmessung, m den Mittelwert der Einzelmessung,  $1\sigma$  ist die Standardabweichung.

Probe	$\delta^{15}\text{N}$ (Gesamt-N)					$\delta^{15}\text{N}$ (Harnstoff)			
	#1	#2	#3	m	$1\sigma$	#1	#2	m	$1\sigma$
Name	‰								
P2 01	4,53		6,44	5,48	1,35	4,32	3,86	4,09	0,32
P2 02		6,00	4,76	5,38	0,88	4,61	3,86	4,24	0,53
P2 03	5,29		5,40	5,35	0,08	4,90	4,71	4,80	0,14
P2 04	5,05		5,27	5,16	0,15	3,79	3,50	3,65	0,21
P2 05		5,96	4,38	5,17	1,12	3,60	3,85	3,73	0,18
P2 06	3,73	4,06	4,24	4,01	0,26	4,08	3,75	3,91	0,23
P2 07		5,94	6,50	6,22	0,39				
P2 08	5,29	5,73	5,33	5,45	0,24				
P2 09	5,00	5,32	5,09	5,14	0,17	5,28	5,26	5,27	0,02
P2 10		6,47	6,10	6,29	0,26	4,78	4,76	4,77	0,01
P2 11	5,72	6,23	5,27	5,74	0,48				
P2 12	5,67	4,56	5,82	5,35	0,69	5,17	4,98	5,08	0,13
P2 13	5,24	5,56	5,38	5,39	0,16	5,07	4,63	4,85	0,31
P2 14	5,24	5,75	5,56	5,52	0,26	5,44	5,41	5,42	0,02
P2 15	5,79	6,47	5,78	6,01	0,39	5,57	5,50	5,53	0,04
P2 16	5,17	5,15	5,48	5,27	0,18	5,27	5,19	5,23	0,05
P2 17	5,98	5,11	5,11	5,40	0,51	5,21	5,19	5,20	0,02
P2 18	5,18	6,04	5,15	5,46	0,50	5,01	5,41	5,21	0,28
P2 19	5,67	5,85	5,20	5,57	0,34	4,43	3,97	4,20	0,33
P2 20	5,27	5,44	4,95	5,22	0,25	4,10	4,17	4,14	0,05
P2 21	5,05	4,92	4,78	4,92	0,13	2,75	2,92	2,83	0,12
P2 22	4,39	4,39	4,67	4,48	0,16	3,09	2,84	2,96	0,18
P2 23	4,90	4,73	4,61	4,74	0,15	3,59	3,58	3,58	0,00
P2 24	4,00	4,05	4,05	4,03	0,03	3,58	4,10	3,84	0,37
P2 25	4,47	4,47	4,79	4,58	0,19	4,34	4,37	4,36	0,02
P2 26	6,50		6,60	6,55	0,07	3,76	3,61	3,68	0,11
P2 27	5,38		5,12	5,25	0,18	4,75	5,16	4,96	0,29
P2 28		4,60	4,50	4,55	0,07	4,35	4,57	4,46	0,16
P2 29		5,03	4,94	4,98	0,06	4,46	4,74	4,60	0,20
P2 30		5,03	5,00	5,02	0,02	4,31	4,49	4,40	0,13

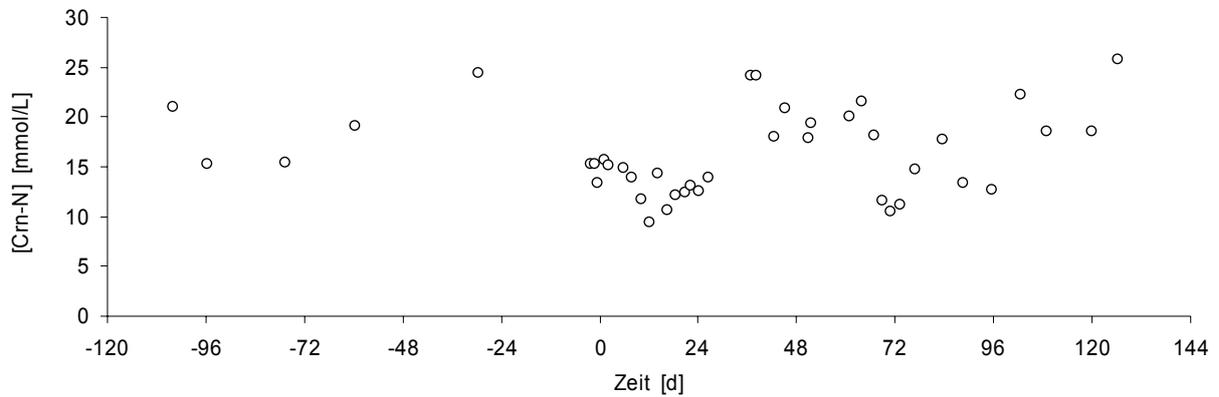
**Tab. 38:** Experimentelle Daten Belastungsstudie Proband 3.

Probe	Datum	Uhrzeit	$\Delta t$	t	V	pH	Dichte	[HS]	[Cn]	[NH <sub>4</sub> ]	[Prot]
Name	d/m/y	hh:mm	min	h	ml		g/L	mmol/L	mmol/L	$\mu\text{mol/L}$	mg/L
P3 01	11/09/2006	11:15	1575	-106,3	50	5,5	1,016	280	5,82	33600	82,8
P3 02	12/09/2006	13:30	1230	-80,0	100	5,5	1,016	220	4,56	31800	37,7
P3 03	13/09/2006	08:00	1690	-59,5	100	6,5	1,014	152	4,59	19800	39,5
P3 04	14/09/2006	12:10	1690	-31,3	150	7,5	1,012	143	4,01	3800	42,8
P3 05	15/09/2006	16:20	30	-3,2	200	7,0	1,007	70	2,17	4400	41,1
P3 06	15/09/2006	16:50	40	-2,7	200	7,0	1,008	73	2,53	3800	45,5
P3 07	15/09/2006	17:30	465	-2,0	700	7,0	1,006	57	1,70	4800	49,9
P3 09	16/09/2006	01:15	165	5,8	350	7,0	1,006	112	2,87	19600	38,1
P3 10	16/09/2006	04:00	120	8,5	270	7,0	1,024	276	5,99	8600	103,3
P3 11	16/09/2006	06:00	65	10,5	250	6,5	1,020	279	4,33	9600	69,4
P3 12	16/09/2006	07:05	130	11,6	250	7,0	1,018	249	3,44	9000	78,0
P3 13	16/09/2006	09:15	240	13,8	350	7,0	1,020	301	3,86	9400	44,2
P3 14	16/09/2006	13:15	145	17,8	150	6,5	1,024	388	6,62	16200	96,2
P3 15	16/09/2006	15:40	134	20,2	230	7,0	1,024	370	6,35	12400	58,3
P3 16	16/09/2006	17:54	111	22,4	200	7,0	1,024	392	6,77	12800	80,8
P3 17	16/09/2006	19:45	45	24,3	150	7,0	1,024	398	7,89	9600	94,2
P3 18	16/09/2006	20:30	630	25,0	25	8,0	1,023	427	8,09	14600	166,1
P3 19	17/09/2006	07:00	180	35,5	60	6,0	1,025	659	16,00	43800	83,5
P3 20	17/09/2006	10:00	210	38,5	100	7,5	1,016	287	8,08	4400	43,4
P3 21	17/09/2006	13:30	180	42,0	230	7,0	1,021	428	10,37	6000	46,5
P3 22	17/09/2006	16:30	135	45,0	75	7,5	1,026	396	9,81	18600	61,4
P3 23	17/09/2006	18:45	75	47,3	200	8,0	1,025	376	7,82	7400	43,6
P3 24	17/09/2006	20:00	30	48,5	200	7,0	1,015	168	3,34	123600	33,6
P3 25	17/09/2006	20:30	60	49,0	330	7,0	1,008	99	1,95	5400	59,9
P3 26	17/09/2006	21:30	30	50,0	150	7,5	1,008	67	1,31	7200	31,6
P3 27	17/09/2006	22:00	30	50,5	200	8,5	1,018	158	3,01	5600	32,4
P3 28	17/09/2006	22:30	270	51,0	100	8,0	1,020	240	4,48	6800	50,2
P3 29	18/09/2006	03:00	120	55,5	300	7,5	1,017	272	4,52	9800	53,5
P3 30	18/09/2006	05:00	60	57,5	280	7,5	1,020	283	5,11	15400	29,6
P3 31	18/09/2006	06:00	150	58,5	100	7,0	1,009	130	2,63	9800	37,2
P3 32	18/09/2006	08:30	150	61,0	680	6,0	1,003	30	0,81	8400	32,3
P3 33	18/09/2006	11:00	90	63,5	620	6,5	1,005	38	1,11	5200	31,1
P3 34	18/09/2006	12:30	90	65,0	400	7,0	1,011	113	2,47	19400	26,7
P3 35	18/09/2006	14:00	420	66,5	320	7,0	1,011	107	2,43	9600	38,8
P3 36	18/09/2006	21:00	540	73,5	150	7,5	1,013	147	3,51	6000	49,6
P3 37	19/09/2006	06:00	480	82,5	300	6,0	1,013	174	4,29	62600	25,2
P3 38	19/09/2006	14:00	1110	90,5	180		1,007	78	1,59	9200	38,4
P3 39	20/09/2006	08:30	330	109,0	220		1,016	216	5,94	31400	43,1
P3 40	20/09/2006	14:00	570	114,5	150		1,019	252	7,52	13800	77,5
P3 41	20/09/2006	23:30	570	124,0	230		1,006	104	3,03	14400	47,5
P3 42	21/09/2006	09:00	480	133,5	360		1,014	288	6,64	20400	55,3
P3 43	21/09/2006	17:00		141,5	200		1,008	118	1,97	14600	34,7

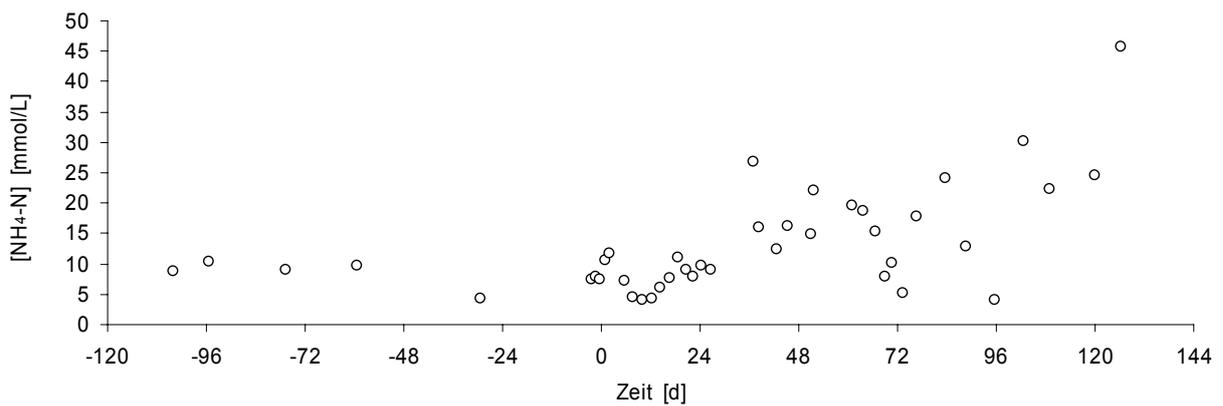
**Tab. 39:** Experimentelle  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte Belastungsstudie Proband 3, # bezeichnet die Einzelmessung, m den Mittelwert der Einzelmessung,  $1\sigma$  ist die Standardabweichung.

Probe Name	$\delta^{15}\text{N}$					$\delta^{15}\text{N}$				
	#1	#2	#3	m	SD	#1	#2	#3	m	SD
	‰									
P3 01	5,01	4,72		4,87	0,20	2,27		2,36	2,31	0,06
P3 02	4,98	5,33		5,15	0,25	3,66	4,55		4,11	0,63
P3 03	4,52	7,28		5,90	1,95	5,13	4,82	4,93	4,96	0,16
P3 04	5,00	5,46		5,23	0,33	4,44	5,18		4,81	0,52
P3 05		4,23	5,64	4,93	1,00	4,35	4,18		4,26	0,12
P3 06	5,90	4,22	4,21	4,78	0,97	4,58	5,01		4,80	0,31
P3 07	5,88		4,93	5,41	0,67	4,52	5,13		4,82	0,43
P3 09	5,55		5,23	5,39	0,23	5,12	5,79	5,47	5,46	0,34
P3 10	5,40	5,13	5,50	5,34	0,19	4,78		5,09	4,93	0,22
P3 11	4,80	5,01	5,21	5,01	0,21	5,24		5,17	5,20	0,05
P3 12		5,36	5,24	5,30	0,09	4,77		5,58	5,18	0,57
P3 13	5,25	5,08	5,35	5,23	0,14	4,90	5,59	5,46	5,32	0,37
P3 14	6,02	5,50	5,73	5,75	0,26	4,26	5,01		4,63	0,53
P3 15	5,40	5,39	5,17	5,32	0,13	4,56	5,00		4,78	0,31
P3 16	5,41	5,17		5,29	0,17	4,46	5,19		4,82	0,52
P3 17	5,58	5,34		5,46	0,17	4,98	4,68		4,83	0,22
P3 18	5,34	5,23	5,03	5,20	0,16	4,95	5,02		4,98	0,05
P3 19	5,60	5,53		5,57	0,05	4,27	4,21		4,24	0,04
P3 20	4,69	5,10	4,52	4,77	0,30	5,02		5,08	5,05	0,04
P3 21	5,10	5,07	4,82	5,00	0,15	4,56		4,67	4,62	0,08
P3 22	4,97	4,82	4,81	4,86	0,09	4,83		4,79	4,81	0,02
P3 23	5,00	4,74	5,32	5,02	0,29	4,87		4,82	4,85	0,03
P3 24	4,88	4,75		4,81	0,09	4,74		5,11	4,93	0,26
P3 25	5,63	6,07	5,20	5,63	0,44	5,16		5,26	5,21	0,07
P3 26	6,67	6,67	6,11	6,48	0,32	5,11		5,37	5,24	0,18
P3 27		6,02	6,06	6,04	0,03	4,91		4,98	4,95	0,04
P3 28	4,92		5,33	5,12	0,29	4,95		5,13	5,04	0,13
P3 29	4,68	4,47	5,04	4,73	0,29	4,93		5,42	5,18	0,35
P3 30	4,61	4,33		4,47	0,20		4,95	4,70	4,82	0,18
P3 31	4,80	5,25	5,03	5,02	0,22		5,05	5,18	5,11	0,09
P3 32		7,93	6,99	7,46	0,66		4,69	5,40	5,04	0,50
P3 33	3,58	3,51		3,55	0,05		5,26	5,06	5,16	0,14
P3 34	4,41	4,70		4,55	0,21		5,65	5,27	5,46	0,27
P3 35	4,45	4,55		4,50	0,08	5,11	5,46		5,29	0,25
P3 36	4,88			4,88		5,42	5,71		5,57	0,20
P3 37	4,76			4,76		5,11	5,20		5,16	0,06
P3 38	4,17			4,17		5,18	5,01		5,09	0,12
P3 39	4,67		5,04	4,86	0,26	4,41	4,29		4,35	0,09
P3 40	5,23		5,27	5,25	0,03	5,09	4,84		4,97	0,18
P3 41	5,28		6,02	5,65	0,52	5,29	5,09		5,19	0,14
P3 42	4,87		5,39	5,13	0,37	4,96	4,90		4,93	0,04
P3 43	4,58		4,92	4,75	0,24	4,77	4,45		4,61	0,22

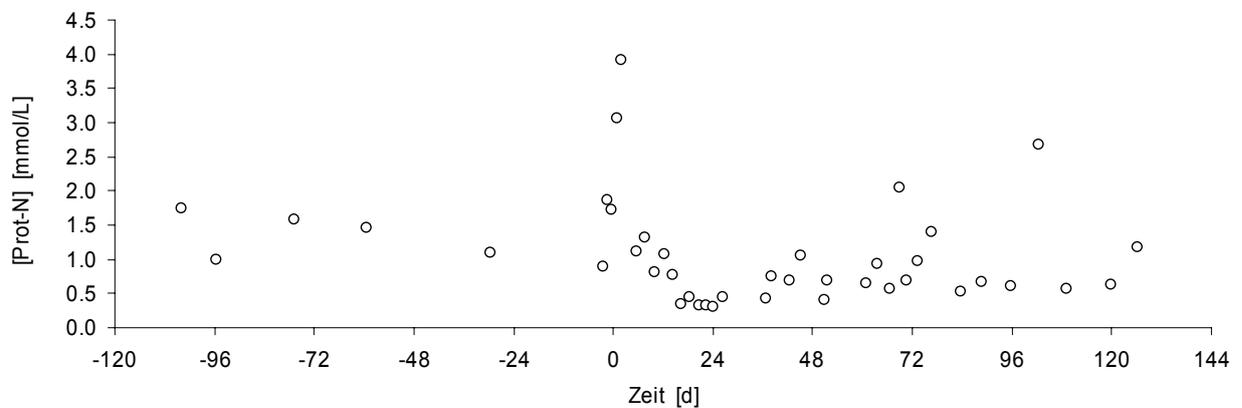
### Anhang 3 Verlauf der Konzentrationen stickstoffhaltiger Substanzen während der Belastungsstudie



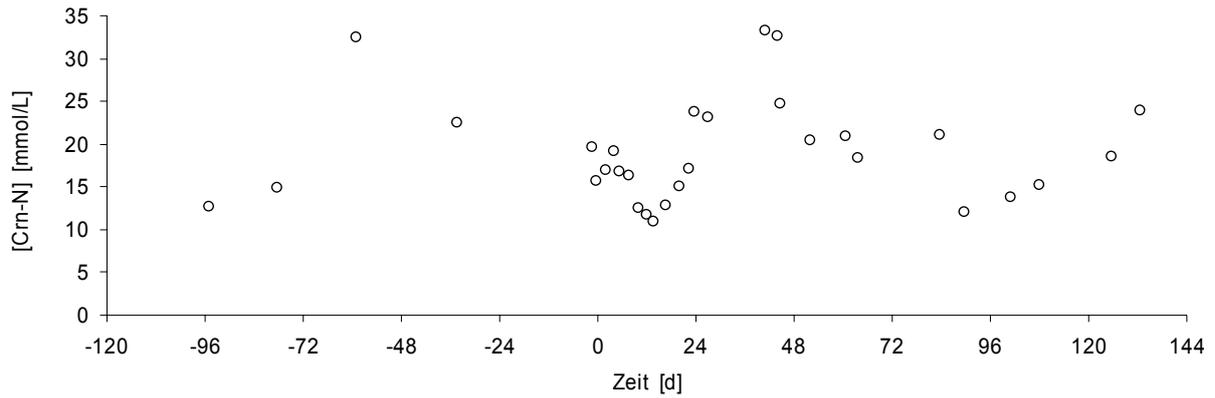
**Abb. 72:** Verlauf der Kreatininkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 1. Dargestellt sind die dichtekorrigierten, auf Stickstoff herunter gerechneten, Daten.



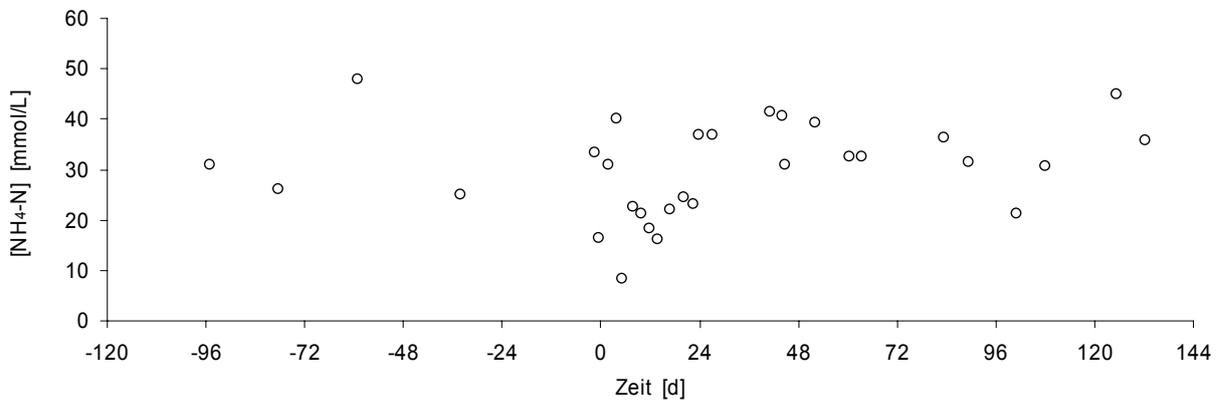
**Abb. 73:** Verlauf der Ammoniumkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 1. Dargestellt sind die dichtekorrigierten, auf Stickstoff herunter gerechneten, Daten.



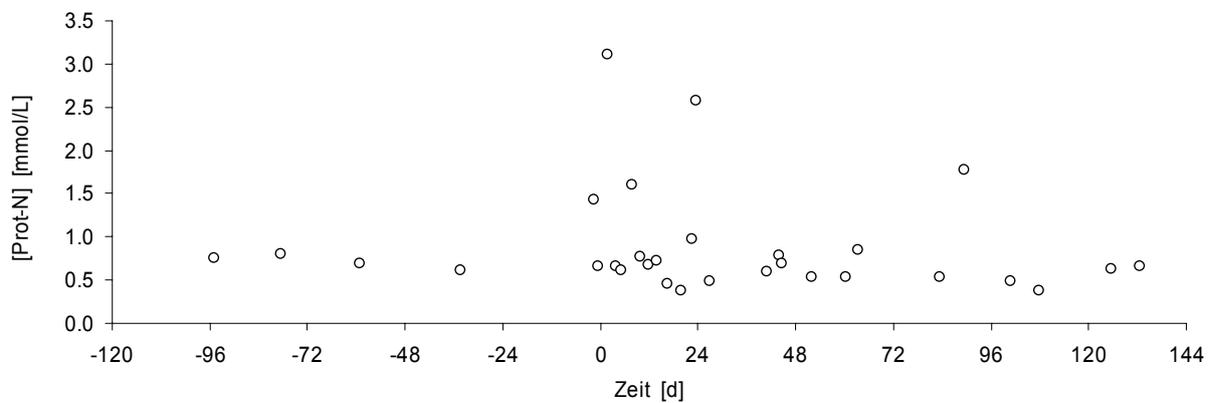
**Abb. 74:** Verlauf der Proteinkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 1. Dargestellt sind die dichtekorrigierten, auf Stickstoff herunter gerechneten, Daten.



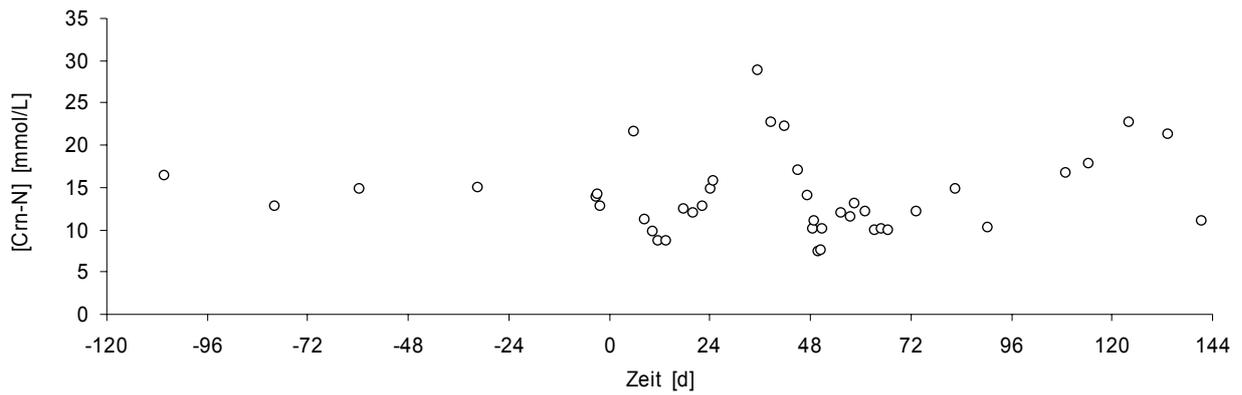
**Abb. 75:** Verlauf der Kreatininkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 2. Dargestellt sind die dichtekorrigierten, auf Stickstoff herunter gerechneten, Daten.



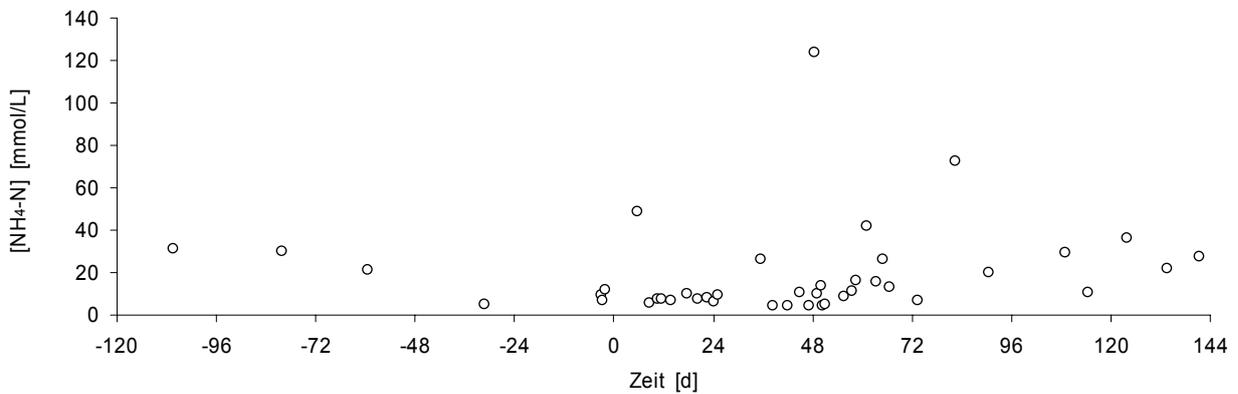
**Abb. 76:** Verlauf der Ammoniumkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 2. Dargestellt sind die dichtekorrigierten, auf Stickstoff herunter gerechneten, Daten.



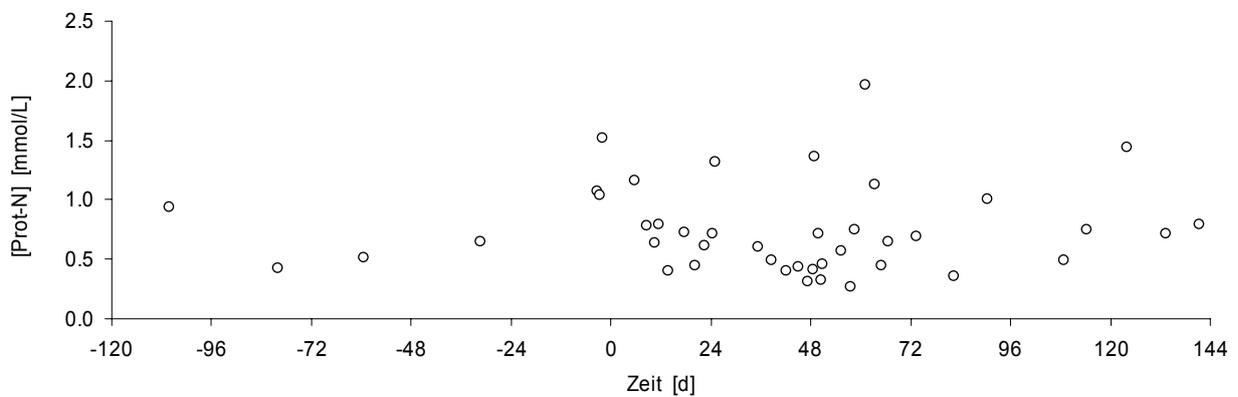
**Abb. 77:** Verlauf der Proteinkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 2. Dargestellt sind die dichtekorrigierten, auf Stickstoff herunter gerechneten, Daten.



**Abb. 78:** Verlauf der Kreatininkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 3. Dargestellt sind die dichtekorrigierten, auf Stickstoff herunter gerechneten, Daten.

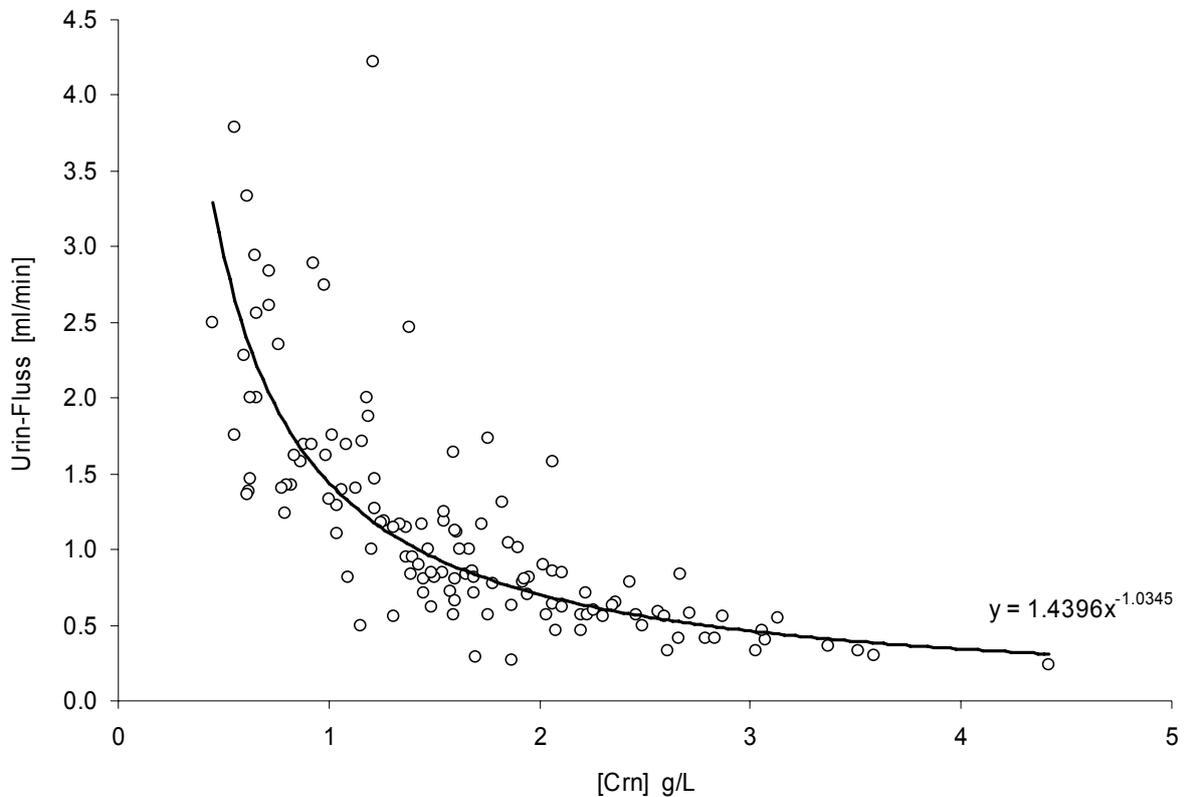


**Abb. 79:** Verlauf der Ammoniumkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 3. Dargestellt sind die dichtekorrigierten, auf Stickstoff herunter gerechneten, Daten.



**Abb. 80:** Verlauf der Proteinkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 3. Dargestellt sind die dichtekorrigierten, auf Stickstoff herunter gerechneten, Daten.

## Anhang 4 Bestimmung der Urinmenge über die Kreatinin- konzentrationen



**Abb. 81:** Bestimmung der Funktion zur Berechnung des Urinflusses über die Kreatininkonzentration ( $[Crn]$ ),  $R^2 = 0,67$ . Zu Grunde liegen experimentelle Daten [140].

## Anhang 5 Auswertung der Ernährungsprotokolle

Ernährung Proband 1, Tag: -5

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Weißbrot-Toastbrot	180 g	13,3 g	85,8 g
Salami	50 g	9,9 g	0,9 g
Schnittkäse	30 g	7,4 g	0,0 g
Joghurt entrahmt	300 g	12,9 g	12,6 g
Tee (Getränk)	600 g	0,6 g	0,0 g
Eis, Sorbet (R)	50 g	1,7 g	13,0 g
Colagetränke (koffeinhaltig)	1000 g	33,2 g	108,5 g
Apfelschorle (1:1)	750 g	1,2 g	39,8 g
Kaffee (Getränk)	200 g	0,4 g	0,6 g
Nudelgerichte mit Gemüse (R)	500 g	16,5 g	67,4 g
Gummibonbons	100 g	1,0 g	45,0 g

Malzbier	500 g	2,5 g	54,3 g
Kartoffelchips (verzehrfertig)	80 g	4,4 g	32,5 g
Weißwein / Rotwein	250 g	0,3 g	6,5 g
Joghurt entrahmt	150 g	6,5 g	6,3 g

Eiweiß: 111,6 g, Energie: 3477,1 kcal, Wasser: 3961,2 g

### Ernährung Proband 1, Tag: -4

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Toast mit Käse und Schinken (R)	200 g	32,6 g	24,6 g
Brötchen belegt (R)	50 g	6,1 g	10,9 g
Konfitüre/Marmelade mit Zucker und Süßstoff	15 g	0,0 g	2,7 g
Brötchen (allgemein)	35 g	2,6 g	17,7 g
Kaffee (Getränk)	400 g	0,8 g	1,2 g
Natürliches Mineralwasser still	1400 g	0,0 g	0,0 g
Königsberger Klopse (R)	200 g	18,0 g	11,5 g
Braune Sauce Grundrezept (Gh)	50 g	0,7 g	0,8 g
Kartoffelkroketten (R)	150 g	5,8 g	34,9 g
Salatbuffet (Gh)	125 g	3,6 g	6,3 g
Flammerie, Pudding (R)	100 g	2,9 g	17,4 g
Kaffee (Getränk)	400 g	0,8 g	1,2 g
Käsekuchen aus Mürbeteig	150 g	13,3 g	41,9 g
Natürliches Mineralwasser still	1000 g	0,0 g	0,0 g
Apfelschorle (1:1)	700 g	1,1 g	37,1 g
Nudelgerichte mit Gemüse (R)	300 g	9,9 g	40,4 g
Joghurt entrahmt	500 g	21,5 g	21,0 g
Baguette	80 g	5,9 g	40,5 g
Eisbergsalat frisch	10 g	0,1 g	0,2 g
Pute Brust frisch	35 g	8,4 g	0,0 g
Bier	1000 g	5,0 g	31,2 g

Eiweiß: 139,1 g, Energie: 3424,2 kcal, Wasser: 6175,5 g

### Ernährung Proband 1, Tag: -1

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Weißbrot-Toastbrot	80 g	5,9 g	38,1 g
Salami	50 g	9,9 g	0,9 g
Joghurt entrahmt	150 g	6,5 g	6,3 g
Tee (Getränk)	200 g	0,2 g	0,0 g
Creemeeis	100 g	6,6 g	19,8 g
Schokolade	20 g	1,8 g	10,8 g
Putenschnitzel (R)	150 g	36,0 g	0,0 g
Reis geschält gegart	180 g	3,6 g	36,9 g
Weißer Sauce Grundrezept (Gh)	50 g	1,4 g	2,6 g
Colagetränke (koffeinhaltig)	500 g	16,6 g	54,3 g
Waffeln	120 g	7,4 g	49,9 g
Creemeeis	100 g	6,6 g	19,8 g
Schlagsahne 30 % Fett	20 g	0,5 g	0,6 g
Kaffee (Getränk)	400 g	0,8 g	1,2 g

Brötchen (allgemein)	45 g	3,3 g	22,8 g
Salami	30 g	5,9 g	0,6 g
Nudelsuppe (R)	500 g	6,2 g	21,2 g
Natürliches Mineralwasser still	1000 g	0,0 g	0,0 g
Apfelschorle (1:1)	1000 g	1,6 g	53,1 g
Kartoffelchips (verzehrsfertig)	100 g	5,5 g	40,6 g

Eiweiß: 126,2 g, Energie: 3672,8 kcal, Wasser: 4056,1 g

### Ernährung Proband 1, Tag: 0, bis Rennen

<u>Lebensmittel</u>	<u>Menge</u>	<u>Eiweiß</u>	<u>Kohlenhy.</u>
Weißbrot-Toastbrot	80 g	5,9 g	38,1 g
Salami	50 g	9,9 g	0,9 g
Tee (Getränk)	250 g	0,3 g	0,0 g
Joghurt entrahmt	150 g	6,5 g	6,3 g
Kaffee (Getränk)	400 g	0,8 g	1,2 g
Frühlingsrolle (R)	200 g	8,3 g	31,0 g
Reis geschält gegart	180 g	3,6 g	36,9 g
Colagetränke (koffeinhaltig)	500 g	16,6 g	54,3 g
Natürliches Mineralwasser still	1000 g	0,0 g	0,0 g
Apfelschorle (1:1)	500 g	0,8 g	26,5 g
Nudeln, Spätzle (R)	300 g	13,2 g	73,3 g
Kuchen	150 g	8,9 g	81,5 g
Kaffee (Getränk)	200 g	0,4 g	0,6 g
Banane	100 g	1,1 g	21,4 g
Apfelschorle (1:1)	200 g	0,3 g	10,6 g
Natürliches Mineralwasser still	200 g	0,0 g	0,0 g

Eiweiß: 76,6 g, Energie: 2447,8 kcal, Wasser: 3895,3 g

### Ernährung Proband 1, Tag: 0, Rennen

<u>Lebensmittel</u>	<u>Menge</u>	<u>Eiweiß</u>	<u>Kohlenhy.</u>
Natürliches Mineralwasser still	3975 g	0,0 g	0,0 g
Power Bar Apfel-Zimt	130 g	19,5 g	85,8 g
Plätzchen Kekse	50 g	3,1 g	29,8 g
Power Bar Gel	410 g	0,4 g	262,8 g
Apfel frisch	550 g	1,9 g	62,9 g
Apfel Fruchtsaft	225 g	0,7 g	23,9 g
ULTRA Buffer (Getränk)	3650 g	69,3 g	230,0 g
Limonaden	800 g	0,0 g	80,0 g
Kefir	1800 g	61,2 g	73,8 g
Waffeln	175 g	10,8 g	72,7 g
Apfelmus (R)	30 g	0,1 g	4,2 g
Brötchen belegt (R)	400 g	48,7 g	87,3 g
Gummibonbons	200 g	2,0 g	90,0 g
Kaffee mit Milch und Zucker (Getränk)	500 g	1,5 g	11,6 g
Energydrink	1250 g	4,9 g	137,1 g

Nudelsuppe (R)	600 g	7,4 g	25,5 g
Kartoffelchips (verzehrfertig)	40 g	2,2 g	16,2 g
Malzbier	750 g	3,8 g	81,4 g
Bier alkoholfrei (<0,5Gew% Alkohol)	500 g	1,9 g	26,8 g
Milchspeiseeis	80 g	1,8 g	10,5 g
Trinkmilch mit Kakao/Schokolade	520 g	17,4 g	108,5 g
Kuchen	100 g	5,9 g	54,4 g

Eiweiß: 264,5 g, Energie: 10081,2 kcal, Wasser: 14291,8 g

### Ernährung Proband 1, Tag: 0, Rennen bis 24:00

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Bier alkoholfrei (<0,5Gew% Alkohol)	500 g	1,9 g	26,8 g
Nudelsuppe (R)	400 g	4,9 g	17,0 g
Curry-Bratwurst	150 g	18,3 g	0,5 g
Pommes Frites (R)	150 g	5,3 g	38,9 g
Natürliches Mineralwasser still	600 g	0,0 g	0,0 g
Apfelschorle (1:1)	500 g	0,8 g	26,5 g

Eiweiß: 31,2 g, Energie: 1206,6 kcal, Wasser: 2061,6 g

### Ernährung Proband 1, Tag: +1

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Kaffee (Getränk)	400 g	0,8 g	1,2 g
Brötchen	100 g	7,4 g	50,7 g
Rind/Schwein Hackfleisch gegart	30 g	8,0 g	0,1 g
Schwein Schinken roh geräuchert	30 g	5,5 g	0,3 g
Milchshake (Mc Donald's)	200 g	6,9 g	38,5 g
Natürliches Mineralwasser still	400 g	0,0 g	0,0 g
Käsekuchen aus Mürbeteig	200 g	17,7 g	55,8 g
Apfelschorle (1:1)	700 g	1,1 g	37,1 g
Croissant aus Blätterteig	140 g	9,9 g	62,8 g
Brötchen	80 g	5,9 g	40,5 g
Salami	80 g	15,8 g	1,5 g
Tee (Getränk)	100 g	0,1 g	0,0 g
Joghurt entrahmt	150 g	6,5 g	6,3 g
Gummibonbons	50 g	0,5 g	22,5 g
Brausen	100 g	0,0 g	10,0 g
Kefir	1000 g	34,0 g	41,0 g
Kaffee (Getränk)	300 g	0,6 g	0,9 g
Pizza (R)	420 g	46,2 g	144,1 g
Rind/Schwein Hackfleisch gegart	100 g	26,7 g	0,4 g
Bier	1000 g	5,0 g	31,2 g

Eiweiß: 198,6 g Energie: 5125,0 kcal, Wasser: 4507,4 g

## Ernährung Proband 2, Tag: -3

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Bagels, egg	104 g	11,0 g	55,1 g
Brie Rahmstufe	30 g	6,3 g	0,0 g
Vegetarische Pasteten	25 g	2,9 g	4,0 g
Nuß-Nougat-Creme süß	30 g	1,3 g	17,9 g
Plätzchen Kekse	20 g	1,2 g	11,9 g
Joghurt vollfett	250 g	8,3 g	10,0 g
Müsli	80 g	8,3 g	48,0 g
Apfel frisch	250 g	0,9 g	28,6 g
Banane frisch	100 g	1,1 g	21,4 g
Bier	2500 g	12,5 g	78,0 g
Nudelgerichte mit Gemüse (R)	400 g	13,2 g	53,9 g

Eiweiß: 67,1 g, Energie: 2908,8 kcal, Wasser: 8659,0 g

## Ernährung Proband 2, Tag: -2

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Brötchen (allgemein)	90 g	6,7 g	45,6 g
Hartkäse Magerstufe	60 g	22,7 g	0,0 g
Obstmischung Fruchtsaft	480 g	4,5 g	60,8 g
Zucker	20 g	0,0 g	20,0 g
Kaffee (Getränk)	300 g	0,6 g	0,9 g
Apfel frisch	250 g	0,9 g	28,6 g
Natürliches Mineralwasser mit Kohlensäure	3600 g	0,0 g	0,0 g
Vollkornbrot	250 g	16,2 g	93,9 g
Hartkäse Magerstufe	120 g	45,5 g	0,0 g
Getreidesprossen (Getreide gekeimt)	30 g	1,0 g	3,9 g
Nuß-Nougat-Creme süß	30 g	1,3 g	17,9 g
Plätzchen Kekse	30 g	1,9 g	17,9 g
Tortellini (Gh)	250 g	14,5 g	64,1 g
Blattsalat mit Dressing (R)	150 g	2,4 g	2,5 g

Zwischenanalyse: Eiweiß 118,1 g Energie 2387,7 kcal, Wasser 5051,3 g

## Ernährung Proband 2, Tag: -1

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Brötchen (allgemein)	90 g	6,7 g	45,6 g
Hartkäse Magerstufe	60 g	22,7 g	0,0 g
Apfel frisch	250 g	0,9 g	28,6 g
Natürliches Mineralwasser mit Kohlensäure	3200 g	0,0 g	0,0 g
Tortellini (Gh)	300 g	17,4 g	76,9 g
Gemüsemischung gegart	150 g	4,0 g	7,1 g
Schoko-Butterkeks	125 g	11,9 g	71,4 g
Joghurt vollfett	250 g	8,3 g	10,0 g
Müsli	100 g	10,4 g	60,0 g

Pizza (Grundrezept)	300 g	26,7 g	95,8 g
Bier	1000 g	5,0 g	31,2 g

Eiweiß: 114,0 g, Energie: 3340,8 kcal, Wasser: 5076,9 g

### Ernährung Proband 2, Tag: 0, bis Rennen

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Brötchen (allgemein)	90 g	6,7 g	45,6 g
Hartkäse Magerstufe	60 g	22,7 g	0,0 g
Natürliches Mineralwasser mit Kohlensäure	4500 g	0,0 g	0,0 g
Teigwaren eifrei gegart	500 g	26,9 g	151,6 g
Olivenöl	15 g	0,0 g	0,0 g
Banane	375 g	4,3 g	80,2 g

Eiweiß: 60,6 g, Energie: 1560,7 kcal, Wasser: 5135,7 g

### Ernährung Proband 2, Tag: 0, Rennen

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Natürliches Mineralwasser still	12375 g	0,0 g	0,0 g
Maltodextrin 19 (SHS)	200 g	0,0 g	192,0 g
Limonaden	4037 g	0,0 g	403,7 g
Energy drink	1000 g	3,9 g	109,7 g
Power Bar Gel	451 g	0,5 g	289,1 g
Power Bar Apfel-Zimt	455 g	68,3 g	300,3 g
Banane frisch	400 g	4,6 g	85,6 g
Schokolade gefüllt mit Sonstigem	480 g	7,0 g	331,0 g
Nudelsuppe (R)	250 g	3,1 g	10,6 g
Gemüsebrühe (R)	2150 g	35,3 g	28,3 g
Tofu frisch	100 g	8,1 g	0,5 g
Gemüsemischung frisch gegart	20 g	0,5 g	1,0 g
Nudelgerichte mit Gemüse (R)	400 g	13,2 g	53,9 g
Cashewnuß geröstet	75 g	12,1 g	19,0 g
Kartoffelbreipulver	180 g	15,5 g	127,8 g
Natürliches Mineralwasser still	300 g	0,0 g	0,0 g
Plätzchen Kekse	75 g	4,7 g	44,7 g
Schokolade	75 g	6,9 g	40,6 g
Früchte Riegel Aprikose (Viba)	25 g	1,2 g	15,5 g
Bier alkoholfrei (<0,5Gew% Alkohol)	500 g	1,9 g	26,8 g

Eiweiß: 186,6 g, Energie: 10735,8 kcal, Wasser: 20642,3 g

### Ernährung Proband 2, Tag: +1, Rennen bis 24:00

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Bier alkoholfrei (<0,5Gew% Alkohol)	500 g	1,9 g	26,8 g
Cashewnuß geröstet	50 g	8,1 g	12,6 g

Sojabratlinge (naß)	250 g	59,0 g	18,0 g
Brötchen (allgemein)	50 g	3,7 g	25,3 g
Reiscrispies	80 g	4,9 g	67,9 g
Schokolade	20 g	1,8 g	10,8 g

Eiweiß: 79,4 g, Energie: 1826,8 kcal, Wasser: 582,1 g

### Ernährung Proband 2, Tag: +2

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Vollkornbrot	200 g	13,0 g	75,1 g
Hartkäse Magerstufe	120 g	45,5 g	0,0 g
Schoko-Butterkeks	150 g	14,3 g	85,7 g
Natürliches Mineralwasser mit Kohlensäure	1550 g	0,0 g	0,0 g
Colagetränke kalorienarm	400 g	0,0 g	0,4 g
Apfelstrudel	150 g	3,3 g	39,1 g
Sojabratlinge (nass)	200 g	47,2 g	14,4 g
Kaffee (Getränk)	600 g	1,2 g	1,8 g
Banane	125 g	1,4 g	26,7 g
Cashewnuß geröstet	150 g	24,2 g	37,9 g
Pizza (Grundrezept)	200 g	17,8 g	63,8 g
Puffreis	80 g	6,0 g	66,8 g
Schokolade	0 g	0,0 g	0,0 g

Eiweiß: 173,9 g, Energie: 4134,1 kcal, Wasser: 3052,4 g

### Ernährung Proband 3, Tag: -4

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Brötchen belegt (R)	80 g	9,7 g	17,5 g
Kaffee mit Milch (Getränk)	500 g	1,5 g	2,2 g
Nußhörnchen aus Hefeteig fettreich	60 g	4,1 g	23,9 g
Natürliches Mineralwasser still	750 g	0,0 g	0,0 g
Apfelschorle (1:1)	1500 g	2,4 g	79,6 g
Salatbuffet (Gh)	250 g	7,2 g	12,6 g
Käsesalat (R)	120 g	22,0 g	0,9 g
Krabbe klein (Shrimps) gegart	250 g	47,2 g	1,9 g
Kartoffeln ungeschält frisch gekocht	300 g	5,9 g	42,7 g
Weißbrot-Toastbrot	60 g	4,4 g	28,6 g
Bier alkoholfrei (<0,5Gew% Alkohol)	2500 g	9,5 g	133,8 g
Hartkäse	40 g	12,8 g	0,0 g

Eiweiß: 126,6 g, Energie: 2703,1 kcal, Wasser: 5795,1 g

### Ernährung Proband 3, Tag: -3

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Banane frisch	100 g	1,1 g	21,4 g

Nußhörnchen aus Hefeteig fettreich	60 g	4,1 g	23,9 g
Kaffee mit Milch (Getränk)	600 g	1,8 g	2,7 g
Nudelgerichte mit Gemüse (R)	1000 g	32,9 g	134,8 g
Hartkäse	20 g	6,4 g	0,0 g
Orange Fruchtsaft	1000 g	9,3 g	87,9 g
Apfelschorle (1:1)	1000 g	1,6 g	53,1 g
Bier alkoholfrei (<0,5Gew% Alkohol)	2000 g	7,6 g	107,0 g

Eiweiß: 64,7 g, Energie: 2826,4 kcal, Wasser: 5114,8 g

### Ernährung Proband 3, Tag: -2

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Brötchen belegt (R)	80 g	9,7 g	17,5 g
Kaffee mit Milch (Getränk)	500 g	1,5 g	2,2 g
Nußhörnchen aus Hefeteig fettreich	60 g	4,1 g	23,9 g
Molke	750 g	6,2 g	35,3 g
Molke mit Früchten	250 g	2,0 g	36,5 g
Trinkmilch mit Kakao/Schokolade	500 g	16,8 g	104,3 g
Apfelschorle (1:1)	300 g	0,5 g	15,9 g
Malzbier	500 g	2,5 g	54,3 g
Käsesalat (R)	60 g	11,0 g	0,4 g
Salatbuffet (Gh)	125 g	3,6 g	6,3 g
Pommes Frites (R)	150 g	5,3 g	38,9 g
Nudelgerichte mit Gemüse (R)	400 g	13,2 g	53,9 g
Hartkäse	50 g	15,9 g	0,0 g
Müsli-Riegel	150 g	10,3 g	65,9 g

Eiweiß: 102,5 g, Energie: 3708,5 kcal, Wasser: 3081,9 g

### Ernährung Proband 3, Tag: -1

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Banane frisch	100 g	1,1 g	21,4 g
Kaffee mit Milch (Getränk)	600 g	1,8 g	2,7 g
Nudelgerichte mit Gemüse (R)	1600 g	52,7 g	215,7 g
Kakaogetränkpulver löslich	50 g	2,8 g	38,7 g
Kuhmilch gekocht	700 g	23,5 g	33,9 g
Molke mit Früchten	750 g	6,0 g	109,6 g
Molke	750 g	6,2 g	35,3 g
Müsli-Riegel	75 g	5,2 g	32,9 g
Natürliches Mineralwasser still	700 g	0,0 g	0,0 g

Eiweiß 99,2 g, Energie: 3656,3 kcal, Wasser: 4483,2 g

### Ernährung Proband 3, Tag: 0 bis Rennen

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Molke	500 g	4,1 g	23,5 g

Molke mit Früchten	500 g	4,0 g	73,1 g
Kaffee mit Milch (Getränk)	300 g	0,9 g	1,3 g
Müsli-Riegel	50 g	3,4 g	22,0 g
Kakaogetränkpulver löslich	50 g	2,8 g	38,7 g
Kuhmilch gekocht	500 g	16,8 g	24,2 g
Obstmischung Fruchtsaft	900 g	8,5 g	114,1 g
Frühlingsrolle (R)	200 g	8,3 g	31,0 g
Fischfrikadelle (R)	180 g	30,9 g	7,6 g
Reis ungeschält gegart	180 g	4,6 g	42,0 g
Apfelschorle (1:1)	1500 g	2,4 g	79,6 g
Banane frisch	100 g	1,1 g	21,4 g
Nudeln, Spätzle (R)	150 g	6,6 g	36,6 g
ULTRA Buffer (Getränk)	200 g	3,8 g	12,6 g

Eiweiß: 98,2 g, Energie: 3171,9 kcal, Wasser: 4545,2 g

### Ernährung Proband 3, Tag: 0/+1, Rennen

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Power Bar Apfel-Zimt	260 g	39,0 g	171,6 g
ULTRA Buffer (Getränk)	5750 g	109,3 g	362,3 g
Limonaden	2600 g	0,0 g	260,0 g
Energy drink	1500 g	5,8 g	164,6 g
Power Bar Gel	492 g	0,5 g	315,4 g
Molke mit Kakao/Schokolade	1000 g	13,7 g	208,1 g
Malzbier	330 g	1,6 g	35,8 g
Banane frisch	200 g	2,3 g	42,8 g
Kaffee mit Milch und Zucker (Getränk)	1650 g	4,9 g	38,4 g
Nudelsalat mit Mayonaise (R)	180 g	12,3 g	21,4 g
Gemüsepasteten, Gemüsebratlinge (0)	150 g	15,3 g	12,5 g
Nudelsuppe (R)	300 g	3,7 g	12,7 g
Fruchtschnitten	50 g	2,1 g	22,2 g
Tee schwarz mit Zucker (Getränk)	1100 g	1,1 g	21,5 g
Obstmischung Fruchtsaft	250 g	2,4 g	31,7 g
Waffeln	50 g	3,1 g	20,8 g
Apfelmus (R)	25 g	0,1 g	3,5 g
Brötchen belegt (R)	160 g	19,5 g	34,9 g
Malzbier	660 g	3,3 g	71,6 g
Kartoffelsuppe (R)	350 g	6,9 g	28,8 g
Apfelschorle (1:1)	200 g	0,3 g	10,6 g

Eiweiß: 247,1 g, Energie: 10358,4 kcal, Wasser: 14585,2 g

### Ernährung Proband 3, Tag: +1: Rennen bis 24:00

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Bier alkoholfrei (<0,5Gew% Alkohol)	500 g	1,9 g	26,8 g
Kartoffelchips (verzehrfertig)	50 g	2,7 g	20,3 g
Tofu frisch	60 g	4,8 g	0,3 g

Gemüsepasteten, Gemüsebratlinge	40 g	4,1 g	3,3 g
Erbsensuppe	800 g	23,3 g	33,4 g
Energydrink	330 g	1,3 g	36,2 g
Molke	250 g	2,0 g	11,8 g
Molke mit Früchten	250 g	2,0 g	36,5 g
Bier Starkbier	300 g	2,1 g	13,8 g
Krabbe klein (Shrimps) gegart	100 g	18,9 g	0,8 g

Eiweiß: 63,2 g, Energie: 1675,1 kcal, Wasser: 2315,7 g

### Ernährung Proband 3, Tag: +2

Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Kaffee mit Milch (Getränk)	500 g	1,5 g	2,2 g
Krabbe klein (Shrimps) gegart	100 g	18,9 g	0,8 g
Erbsensuppe	400 g	11,7 g	16,7 g
Nudelsuppe (R)	1000 g	12,3 g	42,5 g
Molke	250 g	2,0 g	11,8 g
Molke mit Früchten	250 g	2,0 g	36,5 g
Studentenfutter mit Erdnüssen	175 g	26,6 g	53,2 g
Apfelschorle (1:1)	500 g	0,8 g	26,5 g
Weißbrot-Toastbrot	60 g	4,4 g	28,6 g
Schnittkäse	60 g	14,9 g	0,0 g
Malzbier	300 g	1,5 g	32,6 g
Tomaten Gemüsesaft	1000 g	8,2 g	21,0 g
Fast foods, taco	350 g	42,3 g	54,7 g
Salatbuffet	400 g	11,5 g	20,2 g

Eiweiß: 158,5 g, Energie: 3543,4 kcal, Wasser: 4562,1 g

### Ernährung Proband 3, Tag: +3

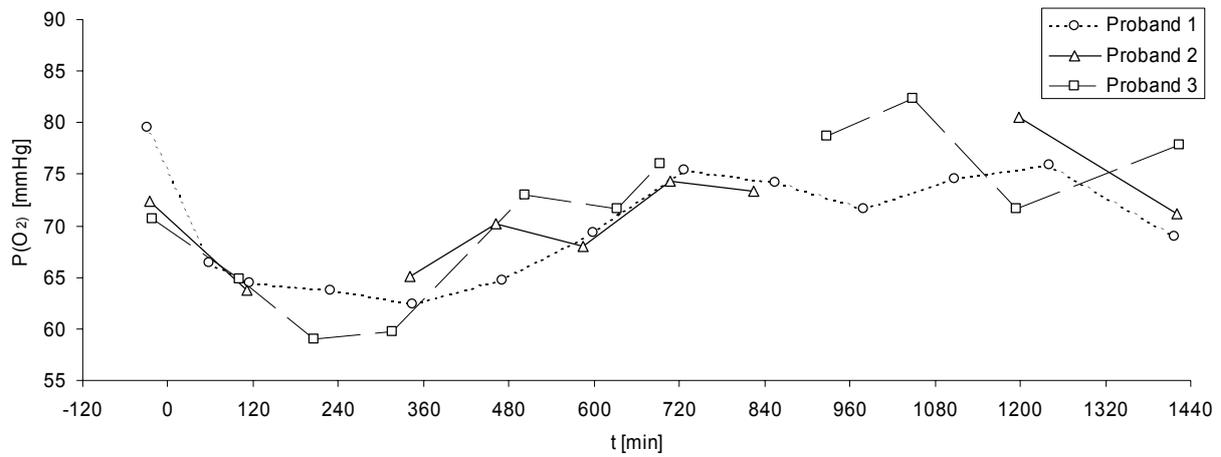
Lebensmittel	Menge	Eiweiß	Kohlenhy.
Molke	500 g	4,1 g	23,5 g
Molke mit Früchten	500 g	4,0 g	73,1 g
Energydrink	250 g	1,0 g	27,4 g
Kaffee mit Milch (Getränk)	1000 g	3,0 g	4,4 g
Flammerie, Pudding (R)	1000 g	29,4 g	174,0 g
Salatbuffet	250 g	7,2 g	12,6 g
Fast foods, taco	350 g	42,3 g	54,7 g
Banane frisch	200 g	2,3 g	42,8 g
Weißbrot-Toastbrot	60 g	4,4 g	28,6 g
Schnittkäse	60 g	14,9 g	0,0 g
Natürliches Mineralwasser still	2000 g	0,0 g	0,0 g

Eiweiß: 112,5 g, Energie: 3160,9 kcal Wasser, 5457,0 g

## Anhang 6 Untersuchte Nahrungsmittel

**Tab. 40:** Im Rahmen der Belastungsstudie untersuchte Nahrungsmittel zur Abschätzung der Stickstoffisotopenverhältnisse der zugeführten Nahrung.

Index	Kategorie	Lebensmittel	Quelle	$\delta^{15}\text{N}$				
				#1	#2	#3	m	SD
				‰				
NR-01	Geflügel	Putenbrust	Bäcker Junkersdorf	3,03	2,75	2,78	2,85	0,15
NR-03	Milchprodukte	Müllermilch	Müller	4,61	4,91	5,01	4,84	0,21
NR-04	Milchprodukte	Milch	Extra Markt, Köln	6,30	6,36	6,44	6,37	0,07
NR-05	Milchprodukte	Ayran	Extra Markt, Köln	4,56	4,70	5,24	4,83	0,36
NR-06	Schweinefleisch	Salami	Extra Markt, Köln	5,44	5,20	5,15	5,26	0,16
NR-07	Getreide	Vollkornbrot	Bäcker, Köln	2,27	2,58	1,94	2,26	0,32
NR-08	NEM	Ultra Buffer	Ultra Sports	5,27	4,94	4,65	4,95	0,31
NR-09	Milchprodukte	Molketrunke	Extra Markt, Köln	5,24	4,62	4,72	4,86	0,33
NR-10	Milchprodukte	franz, Weichkäse	Extra Markt, Köln	5,15	5,40	4,82	5,12	0,29
NR-11	Milchprodukte	Mozarella	Extra Markt, Köln	5,87	5,74	5,56	5,72	0,16
NR-12	Milchprodukte	Hartkäse	Extra Markt, Köln	6,85	6,97	6,46	6,76	0,26
NR-13	Fisch	Krabbe	Nordsee	11,08	11,00	11,45	11,18	0,24
NR-14	Getreide	Weizenmehl	Extra Markt, Köln	3,58	2,95	2,94	3,16	0,37
NR-16	Reis	Reis	Extra Markt, Köln	4,56	4,72		4,64	0,11
NR-17	Getreide	Nudeln	Extra Markt, Köln	3,15	2,95	2,96	3,02	0,11
NR-18	Gemüse	Salat	Mensa DSHS	4,88	4,67	4,32	4,62	0,28
NR-19	Gemüse	Zwiebel	Extra Markt, Köln	0,04		0,50	0,27	0,33
NR-20	Schweinefleisch	Fleisch	Extra Markt, Köln	4,24	4,28	4,21	4,24	0,03
NR-21	Gemüse	grüne Paprika	Extra Markt, Köln	2,34			2,34	
NR-22	Gemüse	rote Paprika	Extra Markt, Köln	-0,55	-0,51	-0,87	-0,64	0,20
NR-23	Gemüse	Lauch	Extra Markt, Köln	1,28	0,95	1,66	1,30	0,36
NR-24	Fisch	Sepia	Mittelmeer	10,83	11,21		11,02	0,27
NR-25	Gemüse	Möhre	Mensa DSHS	5,08	4,42	4,90	4,80	0,34
NR-26	Gemüse	Brokkoli	Mensa DSHS	3,49	3,21	3,52	3,41	0,17
NR-28	Geflügel	Hühnerfleisch	Mensa DSHS	1,26	1,05		1,16	0,15
NR-29	Gemüse	Blumenkohl	Mensa DSHS					
NR-30	Geflügel	Putenfleisch	Mensa DSHS	2,92	3,02		2,97	0,07
NR-31	Nüsse	Erdnuss	Farmer	3,28	3,03		3,15	0,18
NR-33	Nüsse	Kürbiskerne	Bäcker, Köln	0,50	1,15	0,37	0,68	0,42
NR-34	Obst	Multivitaminsaft	Hohes C	2,50	2,41		2,45	0,06
NR-35	Nüsse	Cashew-Kerne	Aldi Köln	0,28	0,87	0,82	0,66	0,33
NR-38	Rindfleisch	Rindfleisch	Mensa DSHS	5,40	5,37	5,51	5,43	0,08
NR-44	Gemüse	Mais	Küpper Feinkost /	2,95	3,07	2,72	2,91	0,18
NR-45	Kakao	Kakao	Bendorp	4,05	4,46	4,78	4,43	0,37
NR-52	Gemüse	Soja	Extra Markt, Köln	2,39	2,572		2,48	0,13
NR-56	Gemüse	Gemüsemais	P144 (C4)	1,04	1,18		1,11	0,10

**Anhang 7 Sauerstoffdruck des Blutes bei der Belastungsstudie**

**Abb. 82:** Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes im Kapillarblut für alle drei Probanden über den Zeitraum des Rennens.

## Anhang 8 Daten Modellrechnung

**Tab. 41:** Berechnete Fraktionierungsfaktoren  $\varepsilon$  für Proband 1 für die vor dem Wettkampf gesammelten Urinproben. 'exp' sind experimentelle Daten, 'theo' sind Literaturdaten, 'calc' sind durch das Modell berechnete Werte.

t	$\varphi_1$	$\varphi_4$	$\delta_D$	$\delta_P$	$\varphi_2$	$\varphi_3$	$\delta_{HS}$	$\delta_U$	$\varepsilon$
h	g/h	g/h	‰	‰	g/h	g/h	‰	‰	‰
exp	exp	exp	exp	exp	theo	theo	exp	exp	calc
-76,8	0,69	0,75	4,07	10,08	1,97	1,97	4,32	4,62	5,54
-59,5	0,69	0,70	4,07	10,08	1,97	1,97	4,45	4,83	5,46
-29,5	0,69	0,73	4,07	10,08	1,97	1,97	4,82	4,67	4,91
-2,3	0,69	0,41	4,07	10,08	1,97	1,97	4,67	4,26	5,87
-1,3	0,69	0,81	4,07	10,12	1,97	1,97	4,12	4,38	5,73
-0,5	0,69	0,87	4,07	10,12	1,97	1,97	4,07	4,52	5,68

**Tab. 42:** Berechnete Fraktionierungsfaktoren  $\varepsilon$  für Proband 2 für die vor dem Wettkampf gesammelten Urinproben. 'exp' sind experimentelle Daten, 'theo' sind Literaturdaten, 'calc' sind durch das Modell berechnete Werte.

t	$\varphi_1$	$\varphi_4$	$\delta_D$	$\delta_P$	$\varphi_2$	$\varphi_3$	$\delta_{HS}$	$\delta_U$	$\varepsilon$
h	g/h	g/h	‰	‰	g/h	g/h	‰	‰	‰
exp	exp	exp	exp	exp	theo	theo	exp	exp	calc
-94,9	0,67	1,19	3,98	10,60	1,91	1,91	4,09	5,48	5,37
-78,5	0,67	1,09	3,98	10,60	1,91	1,91	4,24	5,38	5,34
-59,0	0,67	0,70	3,98	10,93	1,91	1,91	4,80	5,35	5,77
-34,3	0,67	0,83	3,98	10,93	1,91	1,91	3,65	5,16	7,09
-1,5	0,67	0,93	3,98	10,50	1,91	1,91	3,73	5,17	6,36
-0,5	0,67	0,89	3,98	10,50	1,91	1,91	3,91	4,01	6,16

**Tab. 43:** Berechnete Fraktionierungsfaktoren  $\varepsilon$  für Proband 3 für die vor dem Wettkampf gesammelten Urinproben. 'exp' sind experimentelle Daten, 'theo' sind Literaturdaten, 'calc' sind durch das Modell berechnete Werte.

t	$\varphi_1$	$\varphi_4$	$\delta_D$	$\delta_P$	$\varphi_2$	$\varphi_3$	$\delta_{HS}$	$\delta_U$	$\varepsilon_4$
h	g/h	g/h	‰	‰	g/h	g/h	‰	‰	‰
exp	exp	exp	exp	exp	theo	theo	exp	exp	calc
-80,0	0,73	1,06	4,97	10,34	2,07	2,07	4,11	5,15	5,88
-59,5	0,73	0,72	4,97	10,60	2,07	2,07	4,96	5,90	5,64
-31,3	0,73	0,78	4,97	10,60	2,07	2,07	4,81	5,23	5,71
-3,2	0,73	0,72	4,97	10,63	2,07	2,07	4,26	4,93	6,62
-2,7	0,73	0,64	4,97	10,63	2,07	2,07	4,80	4,78	6,08
-2,0	0,73	0,76	4,97	10,63	2,07	2,07	4,82	5,41	5,78

**Tab. 44:** In das Modell eingehende Daten und durch numerische Iteration berechnete Werte, den experimentellen Daten (\*) gegenüber gestellt für alle Urinproben zwischen  $t = -2,3$  bis  $73,3$  Stunden für Proband 1. 'exp' sind experimentelle Daten, 'theo' sind Literaturdaten, 'calc' sind durch das Modell berechnete Werte, 'mod' sind die durch numerische Iteration bestimmten Werte.

t	$\varphi_1$	$\varphi_4$	$\delta_D$	$\delta_P$	$\varphi_2$	$\varphi_3$	$\varepsilon_4$	$\varphi_7$	$\delta_{HS}$	$\delta_{HS}$	$\delta_U$	$\delta_U$	$\Delta\varphi_P$	$\Delta\varphi_P$
h	g/h	g/h	‰	‰	g/h	g/h	‰	g/h	‰	‰	‰	‰	g/h	%
exp	exp	exp	exp	exp	mod	theo	calc	mod	calc	exp*	calc	exp*	calc	calc
-2,3	0,69	0,81	4,07	10,08	1,94	1,97	5,61	0,05	4,11	4,12	4,45	4,38	-0,03	-2,3
-1,3	0,69	0,87	4,07	10,12	1,89	1,97	5,61	0,10	4,05	4,07	4,67	4,52	-0,08	-6,3
-0,5	0,69	0,72	4,07	10,12	2,10	1,97	5,61	0,15	3,41	3,42	4,57	4,38	0,13	10,2
2,0	1,88	0,65	4,98	10,12	2,55	1,97	5,61	0,00	4,68	4,68	4,68	4,52	0,58	45,3
5,8	1,88	0,68	4,98	10,12	2,38	1,97	5,61	0,05	5,04	5,07	5,39	5,38	0,41	32,0
7,7	1,88	0,78	4,98	10,12	2,35	1,97	5,61	0,00	5,15	5,16	5,15	5,13	0,38	29,7
10,0	1,88	0,93	4,98	10,12	2,28	1,97	5,61	0,05	4,97	4,97	5,24	5,22	0,31	24,2
12,3	1,88	1,18	4,98	10,12	2,08	1,97	5,61	0,10	5,08	5,07	5,48	5,45	0,11	8,6
16,5	1,88	1,39	4,98	10,12	2,05	1,97	5,61	0,00	5,17	5,14	5,17	5,00	0,08	6,2
18,5	1,88	1,33	4,98	10,12	2,13	1,97	5,61	0,00	5,02	5,01	5,02	4,98	0,16	12,5
20,8	1,88	1,30	4,98	10,12	2,21	1,97	5,61	0,00	4,82	4,82	4,82	4,81	0,24	18,8
22,3	1,88	1,28	4,98	10,12	2,19	1,97	5,61	0,15	4,47	4,46	5,06	5,06	0,22	17,2
24,2	1,88	1,69	4,98	10,12	1,90	1,97	5,61	0,15	4,76	4,70	5,31	5,31	-0,07	-5,5
26,5	1,88	1,35	4,98	10,01	2,14	1,97	5,61	0,15	4,46	4,46	5,04	5,14	0,17	13,3
36,8	1,40	1,03	4,29	10,01	1,85	1,97	5,61	0,25	4,46	4,41	5,17	5,19	-0,12	-9,4
38,3	1,40	0,95	4,29	10,01	2,15	1,97	5,61	0,30	3,53	3,52	4,71	4,77	0,18	14,1
42,5	1,40	1,16	4,29	10,01	2,17	1,97	5,61	0,21	3,49	3,50	4,60	4,60	0,20	15,6
45,3	1,40	1,09	4,29	10,01	2,18	1,97	5,61	0,07	3,92	3,92	4,34	4,32	0,21	16,4
51,0	1,40	1,11	4,29	10,01	2,13	1,97	5,61	0,07	4,05	4,05	4,39	4,39	0,16	12,5
51,7	1,40	1,11	4,29	10,01	2,20	1,97	5,61	0,00	4,04	4,06	4,04	4,04	0,23	18,0
61,0	1,40	0,99	4,29	10,01	2,19	1,97	5,61	0,05	4,07	4,07	4,33	4,29	0,22	17,2
63,8	1,40	0,92	4,29	10,01	2,19	1,97	5,61	0,05	4,17	4,15	4,42	4,40	0,22	17,2
66,8	1,40	0,95	4,29	10,01	2,19	1,97	5,61	0,05	4,12	4,11	4,40	4,40	0,22	17,2
69,0	1,40	1,09	4,29	10,01	2,12	1,97	5,61	0,00	4,32	4,31	4,32	4,28	0,15	11,7
70,8	1,40	1,33	4,29	10,01	1,85	1,97	5,61	0,10	4,51	4,53	5,04	5,07	-0,12	-9,4
73,3	1,40	1,30	4,29	10,01	1,95	1,97	5,61	0,19	3,99	3,99	4,89	4,91	-0,02	-1,6

**Tab. 45:** In das Modell eingehende Daten und durch numerische Iteration berechnete Werte, den experimentellen Daten (\*) gegenüber gestellt für alle Urinproben zwischen  $t = -1,5$  bis 63,5 Stunden für Proband 2. 'exp' sind experimentelle Daten, 'theo' sind Literaturdaten, 'calc' sind durch das Modell berechnete Werte, 'mod' sind die durch numerische Iteration bestimmten Werte.

t	$\varphi_1$	$\varphi_4$	$\delta_D$	$\delta_P$	$\varphi_2$	$\varphi_3$	$\varepsilon$	$\varphi_?$	$\delta_{HS}$	$\delta_{HS}$	$\delta_U$	$\delta_U$	$\Delta\varphi_P$	$\Delta\varphi_P$
h	g/h	g/h	‰	‰	g/h	g/h	‰	g/h	‰	‰	‰	‰	g/h	%
exp	exp	exp	exp	exp	mod	theo	theo	mod	calc	exp*	calc	exp*	calc	calc
-1,5	0,67	0,93	3,98	10,50	1,74	1,91	5,97	0,25	3,72	3,73	5,16	5,17	-0,17	-13,3
-0,5	0,67	0,89	3,98	10,50	1,95	1,91	5,97	0,00	3,90	3,91	3,90	4,01	0,04	3,1
5,3	1,32	0,66	3,61	10,50	1,90	1,91	5,97	0,00	5,27	5,27	5,27	5,14	-0,01	-0,8
7,8	1,32	1,02	3,61	10,50	1,51	1,91	5,97	0,35	4,76	4,77	6,22	6,29	-0,40	-31,3
11,9	1,32	1,25	3,61	10,50	1,62	1,91	5,97	0,05	5,08	5,08	5,29	5,35	-0,29	-22,7
13,8	1,32	1,29	3,61	10,50	1,58	1,91	5,97	0,13	4,86	4,85	5,38	5,39	-0,33	-25,8
16,7	1,32	1,25	3,61	10,50	1,56	1,91	5,97	0,02	5,43	5,42	5,51	5,52	-0,35	-27,3
20,0	1,32	1,00	3,61	10,50	1,57	1,91	5,97	0,10	5,55	5,53	6,00	6,01	-0,34	-26,6
22,4	1,32	1,14	3,61	10,50	1,68	1,91	5,97	0,00	5,24	5,23	5,24	5,27	-0,23	-18,0
23,7	1,32	1,25	3,61	10,50	1,59	1,91	5,97	0,05	5,21	5,20	5,46	5,40	-0,32	-25,0
27,0	1,51	0,95	3,06	10,63	1,74	1,91	5,97	0,05	5,19	5,21	5,42	5,46	-0,17	-13,3
41,0	1,51	0,78	3,06	10,63	1,78	1,91	5,97	0,35	4,20	4,20	5,61	5,57	-0,13	-10,2
44,0	1,51	0,73	3,06	10,63	1,97	1,91	5,97	0,20	4,12	4,14	5,25	5,22	0,06	4,7
44,8	1,51	0,91	3,06	10,63	2,24	1,91	5,97	0,30	2,83	2,83	5,01	4,92	0,33	25,8
52,0	1,51	1,08	3,06	10,63	2,26	1,91	5,97	0,18	2,95	2,96	4,46	4,48	0,35	27,3
60,5	1,51	1,23	3,06	10,63	1,98	1,91	5,97	0,17	3,58	3,58	4,69	4,74	0,07	5,5
63,5	1,51	1,21	3,06	10,63	2,03	1,91	5,97	0,03	3,86	3,84	4,04	4,03	0,12	9,4

**Tab. 46:** In das Modell eingehende Daten und durch numerische Iteration berechnete Werte, den experimentellen Daten (\*) gegenüber gestellt für alle Urinproben zwischen  $t = -3,2$  bis  $73,5$  Stunden für Proband 3. 'exp' sind experimentelle Daten, 'theo' sind Literaturdaten, 'calc' sind durch das Modell berechnete Werte, 'mod' sind die durch numerische Iteration bestimmten Werte.

t	$\varphi_1$	$\varphi_4$	$\delta_D$	$\delta_P$	$\varphi_2$	$\varphi_3$	$\varepsilon$	$\varphi_?$	$\delta_{HS}$	$\delta_{HS}$	$\delta_U$	$\delta_U$	$\Delta\varphi_P$	$\Delta\varphi_P$
h	g/h	g/h	‰	‰	g/h	g/h	‰	g/h	‰	‰	‰	‰	g/h	%
exp	exp	exp	exp	exp	mod	theo	theo	mod	calc	exp*	calc	exp*	calc	calc
-3,2	0,73	0,72	4,97	10,63	2,15	2,07	5,83	0,08	4,27	4,26	4,90	4,93	0,08	3,9
-2,7	0,73	0,64	4,97	10,63	2,12	2,07	5,83	0,00	4,79	4,80	4,79	4,78	0,05	2,4
-2,0	0,73	0,76	4,97	10,63	1,97	2,07	5,83	0,09	4,82	4,82	5,44	5,41	-0,10	-4,8
5,8	1,75	0,87	4,89	10,63	2,29	2,07	5,83	0,00	5,45	5,46	5,45	5,39	0,22	10,6
8,5	1,75	1,00	4,89	10,63	2,30	2,07	5,83	0,08	4,94	4,93	5,36	5,34	0,23	11,1
10,5	1,75	1,41	4,89	10,63	2,10	2,07	5,83	0,00	5,22	5,20	5,22	5,01	0,03	1,4
11,6	1,75	1,60	4,89	10,63	2,00	2,07	5,83	0,03	5,16	5,18	5,26	5,30	-0,07	-3,4
13,8	1,75	1,72	4,89	10,63	1,92	2,07	5,83	0,00	5,33	5,32	5,33	5,23	-0,15	-7,2
17,8	1,75	1,27	4,89	10,63	2,06	2,07	5,83	0,30	4,63	4,63	5,78	5,75	-0,01	-0,5
20,2	1,75	1,26	4,89	10,63	2,12	2,07	5,83	0,20	4,76	4,78	5,37	5,32	0,05	2,4
22,4	1,75	1,25	4,89	10,63	2,20	2,07	5,83	0,10	4,83	4,82	5,26	5,29	0,13	6,3
24,3	1,75	1,08	4,89	10,63	2,22	2,07	5,83	0,15	4,85	4,83	5,46	5,46	0,15	7,2
25,0	1,08	1,13	4,43	10,63	1,91	2,07	5,83	0,05	4,97	4,98	5,19	5,20	-0,16	-7,7
35,5	1,08	0,86	4,43	10,54	2,02	2,07	5,83	0,25	4,27	4,24	5,44	5,57	-0,05	-2,4
38,5	1,08	0,76	4,43	10,54	2,09	2,07	5,83	0,00	5,06	5,05	5,06	4,77	0,02	1,0
42,0	1,08	0,88	4,43	10,54	2,11	2,07	5,83	0,05	4,61	4,62	4,94	5,00	0,04	1,9
45,0	1,08	0,86	4,43	10,54	2,11	2,07	5,83	0,00	4,82	4,81	4,82	4,86	0,04	1,9
47,3	1,08	1,03	4,43	10,54	1,99	2,07	5,83	0,04	4,82	4,85	5,07	5,02	-0,08	-3,9
48,5	1,08	1,11	4,43	10,54	1,97	2,07	5,83	0,00	4,90	4,93	4,90	4,81	-0,10	-4,8
49,0	1,08	1,14	4,43	10,54	1,77	2,07	5,83	0,10	5,21	5,21	5,68	5,63	-0,30	-14,5
50,0	1,08	1,17	4,43	10,54	1,50	2,07	5,83	0,35	5,24	5,24	6,51	6,48	-0,57	-27,5
50,5	1,08	1,16	4,43	10,54	1,64	2,07	5,83	0,30	4,93	4,95	6,09	6,04	-0,43	-20,8
51,0	1,08	1,17	4,43	10,54	1,88	2,07	5,83	0,02	5,05	5,04	5,15	5,12	-0,19	-9,2
55,5	1,08	1,32	4,43	10,54	1,80	2,07	5,83	0,00	5,17	5,18	5,17	4,73	-0,27	-13,0
57,5	1,08	1,21	4,43	10,54	1,95	2,07	5,83	0,00	4,83	4,82	4,83	4,47	-0,12	-5,8
58,5	1,08	1,10	4,43	10,54	1,92	2,07	5,83	0,00	5,10	5,11	5,10	5,02	-0,15	-7,2
61,0	1,08	0,86	4,43	10,54	1,45	2,07	5,83	0,60	5,03	5,04	6,86	7,46	-0,62	-30,0
63,5	1,08	0,79	4,43	10,54	2,05	2,07	5,83	0,00	5,17	5,16	5,17	3,55	-0,02	-1,0
65,0	1,08	1,02	4,43	10,54	1,86	2,07	5,83	0,00	5,47	5,46	5,47	4,55	-0,21	-10,1
66,5	1,08	0,98	4,43	10,54	1,93	2,07	5,83	0,00	5,27	5,29	5,27	4,50	-0,14	-6,8
73,5	1,08	0,92	4,43	10,54	1,88	2,07	5,83	0,00	5,58	5,57	5,58	4,88	-0,19	-9,2

## Anhang 9 Liste der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel

**Tab. 47:** *Labornummer, Handelsname, Hersteller (Vertrieb) und angegebenes Herkunftsland der untersuchten Kreatin-Monohydrate.*

Lab.Nr.	Handelsname	Hersteller	Land
CH-027	Kreatin	Sponsor Food	CH
IOC-NEM 006	Kreatin	Sports one Inc.	USA
IOC-NEM 041	Kreatin-Monohydrat	General Nutrition Corporation	USA
IOC-NEM 129	Kreatin-Monohydrat	Dymatize Enterprises Inc.	USA
IOC-NEM 178	Max Kreatin	Max Muscle	USA
IOC-NEM 239	Kreatin-Monohydrat	Phytochem Handels GmbH	D
IOC-NEM 271	Kreatin Capsules	Ultimate Nutrition	USA
IOC-NEM 274	Kreatin Powder	Ultimate Nutrition	USA
IOC-NEM 311	Explode	Eiselt Research	NL
IOC-NEM 323	Kreatin Coated Pearls	K + V Verlag & Metabolic Nutrition GmbH	D
IOC-NEM 339	Kreatin 3000	SciFit	USA
IOC-NEM 357	Kreatin Pure	Performance	B
IOC-NEM 376	Kreatin-Monohydrat	Peeroton Warenhandelsgesellschaft	A
IOC-NEM 405	Kreatin	Nutrica NV	B
IOC-NEM 413	Kreatin Supreme	Ultimate Nutrition	USA
IOC-NEM 465	Muscle Kreatin	MyoTeK Sports Nutrition	USA
IOC-NEM 474	Professional Kreatin	HNT Laboratories	USA
IOC-NEM 484	creapure	Ultimate Nutrition	USA
IOC-NEM 491	Phosphagen Kreatin	EAS germany GmbH	D
IOC-NEM 505	Kreatina Monoplus	Eudinamis, Rimini	I
IOC-NEM 527	Kreatin-Monohydrat	Olympus Sport Nutrition	F
IOC-NEM 532	plus Kreatin	elite sport nutrition	ESP
IOC-NEM 546	Kreatin-Monohydrat	Fitnes Pharma Body Nutrition	N
IOC-NEM 547	Kreatin	Natumin Pharma Norge AS	N
IOC-NEM 577	X-treme Kreatin	Inko international Handelskontor gmbh	D
IOC-NEM 603	Pro-Kreatin	Chemical Nutritional Products LTD	UK
IOC-NEM 620	Micronized Kreatin	Met-Rx	USA

**Tab. 48:** *Labornummer, Darreichungsform, LOT-Nummer und per HPLC bestimmter Kreatingehalt für verschiedene Kreatin-Monohydrate.*

Lab,-Nr,	Darreichungsform	LOT	Kreatingehalt [%]
CH-027	Pulver		102,1
IOC-NEM 006	Pulver	5831	97,2
IOC-NEM 041	Pulver	V19768	101,4
IOC-NEM 129	Kapseln	063049	96,2
IOC-NEM 178	Pulver	103014	97,1
IOC-NEM 239	Pulver	L0100040	99,8
IOC-NEM 271	Gelatinekapseln		99,5
IOC-NEM 274	Pulver	70700,8	100,9
IOC-NEM 311	Pulver		103,5
IOC-NEM 323	Kapseln	2590	100,7
IOC-NEM 339	Gelatinekapseln	6110	104,7
IOC-NEM 357	Gelatinekapseln	0111,80	103,3
IOC-NEM 376	kristallines Pulver	4521039049	103,0
IOC-NEM 405	Pulver	01/05610	101,3
IOC-NEM 413	kristallines Pulver		100,7
IOC-NEM 465	Pulver		100,2
IOC-NEM 474	Pulver	10433	101,4
IOC-NEM 484	Pulver	SKW112900	98,6
IOC-NEM 491	Pulver	10093	95,2
IOC-NEM 505	Gelatinekapseln	100239	103,5
IOC-NEM 527	Pulver		99,2
IOC-NEM 532	Pulver	4-05-01	98,8
IOC-NEM 546	Pulver	0008	98,9
IOC-NEM 547	Pulver	20000116	97,5
IOC-NEM 577	Pulver		103,5
IOC-NEM 603	Pulver	20010324	101,7
IOC-NEM 620	Pulver	K0121A	103,1

**Tab. 49:** Labornummer,  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für die einzelnen Kreatin-Monohydrate. Jede Probe wurde dreifach bestimmt,  $m$  stellt den Mittelwert mit der Standardabweichung ( $SD$ ,  $1\sigma$ ) dar.

Lab,-Nr,	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]				$\delta^{15}\text{N}$ [‰]			
	#1	#2	#3	$m \pm SD$	#1	#2	#3	$m \pm SD$
CH-027	-33,34	-32,97	-33,34	-33,22 $\pm$ 0,18	0,24	-0,05	0,06	0,08 $\pm$ 0,12
IOC-NEM 006	-44,11	-44,20		-44,16 $\pm$ 0,04	-0,66	-0,67	-0,60	-0,64 $\pm$ 0,03
IOC-NEM 041	-37,49	-37,47	-37,24	-37,40 $\pm$ 0,12	0,11	-0,24	-0,55	-0,23 $\pm$ 0,27
IOC-NEM 129	-28,15	-27,84	-27,82	-27,94 $\pm$ 0,15	-3,40	-3,33	-3,67	-3,47 $\pm$ 0,15
IOC-NEM 178	-29,54	-29,59	-29,77	-29,63 $\pm$ 0,10	-4,02	-3,92	-4,03	-3,99 $\pm$ 0,05
IOC-NEM 239	-37,54	-37,44	-37,58	-37,52 $\pm$ 0,06	0,01	0,46	0,15	0,20 $\pm$ 0,19
IOC-NEM 271	-42,24	-42,51	-42,24	-42,33 $\pm$ 0,13	-0,93	-1,02	-0,79	-0,91 $\pm$ 0,09
IOC-NEM 274	-42,91	-42,37	-43,02	-42,77 $\pm$ 0,28	-1,24	-0,95	-1,07	-1,09 $\pm$ 0,12
IOC-NEM 311	-35,10	-35,17	-35,10	-35,13 $\pm$ 0,03	-0,58	-0,56	-0,53	-0,55 $\pm$ 0,02
IOC-NEM 323	-30,35	-30,61	-30,53	-30,50 $\pm$ 0,11	0,94	1,13	1,41	1,16 $\pm$ 0,19
IOC-NEM 339	-38,28	-38,28	-38,26	-38,28 $\pm$ 0,01	-2,16	-2,10	-2,34	-2,20 $\pm$ 0,10
IOC-NEM 357	-33,69	-33,81	-34,06	-33,85 $\pm$ 0,15	-2,50	-2,19	-2,47	-2,39 $\pm$ 0,14
IOC-NEM 376	-36,51	-36,56	-36,45	-36,50 $\pm$ 0,04	-0,80	-0,51	-0,18	-0,50 $\pm$ 0,25
IOC-NEM 405	-29,37	-29,37	-29,41	-29,39 $\pm$ 0,02	-1,83	-1,75	-2,05	-1,88 $\pm$ 0,13
IOC-NEM 413	-29,93	-30,06	-29,30	-29,76 $\pm$ 0,33	-4,386	-4,13	-4,232	-4,25 $\pm$ 0,11
IOC-NEM 465	-35,09	-35,00	-35,07	-35,05 $\pm$ 0,04	-0,24	-0,13	-0,16	-0,18 $\pm$ 0,05
IOC-NEM 474	-34,44	-34,56	-34,66	-34,55 $\pm$ 0,09	-0,76	-0,56	-0,94	-0,76 $\pm$ 0,15
IOC-NEM 484	-35,55	-35,53		-35,54 $\pm$ 0,01	-0,54	-0,28	-0,62	-0,48 $\pm$ 0,14
IOC-NEM 491	-35,24	-35,08	-35,14	-35,15 $\pm$ 0,07	-0,55	-0,93	-0,45	-0,65 $\pm$ 0,21
IOC-NEM 505	-38,26	-37,99	-38,29	-38,18 $\pm$ 0,14	0,86	1,14	0,90	0,97 $\pm$ 0,13
IOC-NEM 527	-28,32	-28,15	-28,38	-28,28 $\pm$ 0,09	-3,55	-3,58	-3,62	-3,59 $\pm$ 0,03
IOC-NEM 532	-34,77	-34,95	-34,66	-34,79 $\pm$ 0,12	-0,37	-0,52	-0,45	-0,45 $\pm$ 0,06
IOC-NEM 546	-38,48	-38,34	-38,26	-38,36 $\pm$ 0,09	0,49	0,75	0,50	0,58 $\pm$ 0,12
IOC-NEM 547	-29,77	-29,68	-29,72	-29,72 $\pm$ 0,04	1,97	1,69	2,00	1,89 $\pm$ 0,14
IOC-NEM 577	-37,35	-37,28	-37,32	-37,32 $\pm$ 0,03	-0,36	-0,39	-0,45	-0,40 $\pm$ 0,04
IOC-NEM 603	-28,57	-28,56	-28,53	-28,55 $\pm$ 0,02	-2,60	-2,76	-2,61	-2,66 $\pm$ 0,07
IOC-NEM 620	-30,25	-30,22	-30,12	-30,20 $\pm$ 0,06	-0,56	-0,65	-0,58	-0,60 $\pm$ 0,04



## Anhang 11 Liste der untersuchten Pferdeurine

**Tab. 51:** Labornummer, Geschlecht, pH-Wert, Abnahme und Aufarbeitungsdatum sowie die bestimmten experimentellen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für die untersuchten Pferdeurine.

Index				Datum		Datum	$\delta^{13}\text{C}$ (gesamt-C)				$\delta^{13}\text{C}$ ( $\text{TCO}_2$ )
							#1	#2	m	SD	#1
							‰	‰	‰	‰	‰
CB-01			blk	13.11.05	119	12.03.06	-28,21	-28,20	-28,20	0,01	-30,86
CB-02			blk	13.11.05	119	12.03.06	-27,57	-28,13	-27,85	0,40	-30,17
CB-03			blk	13.11.05	119	12.03.06	-27,92	-28,48	-28,20	0,39	-29,99
CB-04			blk	13.11.05	119	12.03.06	-28,34	-28,80	-28,57	0,32	-29,66
CB-05			blk	13.11.05	119	12.03.06	-27,87	-28,43	-28,15	0,40	-28,42
CB-06			blk	13.11.05	119	12.03.06	-27,58	-27,54	-27,56	0,03	-27,37
CB-07			blk	13.11.05	119	12.03.06	-27,85	-28,06	-27,95	0,15	-27,38
CB-08			blk	13.11.05	119	12.03.06	-30,08	-30,19	-30,13	0,08	-26,52
CB-09	w	9,0	TK	10.05.06	16	26.05.06	-23,53		-23,53		-25,84
CB-10	m	5,5	TK	27.03.06	3	30.03.06	-28,56		-28,56		-26,68
CB-11	m	8,0	WK	14.02.06	21	07.03.06	-22,83		-22,83		-29,93
CB-12	m	5,5	WK	14.03.06	6	20.03.06	-24,45		-24,45		-25,30
CB-13	m	5,5	WK	27.03.06	3	30.03.06	-24,47		-24,47		-24,75
CB-14	m	6,0	WK	02.03.06	5	07.03.06	-22,94		-22,94		-23,11
CB-15	m	6,5	WK	19.02.06	16	07.03.06	-23,96		-23,96		-24,10
CB-16	m	7,5	WK	14.02.06	21	07.03.06	-24,14		-24,14		-24,09
CB-17	v	6,5	WK	06.03.06	1	07.03.06	-23,89		-23,89		-23,46
CB-18	w		WK	15.03.06	15	30.03.06	-24,45		-24,45		-23,87
CB-19	w	6,5	WK	20.03.06	10	30.03.06	-24,77		-24,77		-24,19
CB-20	w	6,0	WK	20.03.06	10	30.03.06	-28,50		-28,50		-27,75
CB-21	m	6,0	WK	27.03.06	3	30.03.06	-24,44		-24,44		-23,62
CB-22	m	5,0	WK	20.03.06	10	30.03.06	-25,11		-25,11		-24,06
CB-23	w		WK	19.03.06	11	30.03.06	-23,44		-23,44		-22,38
CB-24	m		WK	30.04.06	26	26.05.06	-24,95		-24,95		-23,83
CB-25	m	7,5	WK	27.03.06	3	30.03.06	-25,38		-25,38		-23,90
CB-26	v	6,0	WK	06.03.06	1	07.03.06	-24,86		-24,86		-23,31
CB-27	m	8,5	WK	27.03.06	3	30.03.06	-25,59		-25,59		-22,95
CB-28	w		WK	12.03.06	8	20.03.06	-24,72		-24,72		-21,82
CB-29	m	8,0	WK	14.02.06	21	07.03.06	-26,01		-26,01		-23,02
CB-30	m	8,5	WK	20.03.06	10	30.03.06	-26,02		-26,02		-22,75
CB-31	w		WK	19.03.06	11	30.03.06	-23,84		-23,84		-20,55
CB-32	m	8,0	WK	02.03.06	5	07.03.06	-25,73	-25,97	-25,85	0,17	-22,14
CB-33	m		WK	12.03.06	8	20.03.06	-25,58		-25,58		-21,55
CB-34	m	9,0	WK	27.03.06	3	30.03.06	-24,62		-24,62		-20,50
CB-35	m	8,0	WK	19.02.06	16	07.03.06	-25,84	-25,68	-25,76	0,11	-20,86
CB-36			WK	19.03.06	11	30.03.06	-26,93		-26,93		-21,75
CB-37	m	8,5	WK	27.03.06	3	30.03.06	-28,61		-28,61		-23,34
CB-38	w		WK	19.03.06	11	30.03.06	-25,63		-25,63		-19,19
CB-39	m		WK	26.03.06	4	30.03.06	-28,96		-28,96		-20,20
CB-40				19.04.06	32	21.05.06	-24,92		-24,92		-26,36

CB-41				03.04.06	18	21.04.06	-26,75		-26,75		-28,10
CB-42				10.04.06	11	21.04.06	-24,97		-24,97		-25,83
CB-43				03.04.06	18	21.04.06	-28,14		-28,14		-27,43
CB-44				10.04.06	11	21.04.06	-27,25		-27,25		-26,33
CB-45				28.03.06	2	30.03.06	-25,93		-25,93		-23,46
CB-46				04.04.06	17	21.04.06	-28,76		-28,76		-21,80
CB-47	mf	8,5	WK	09.05.06	21	30.05.06	-25,20		-25,20		-31,50
CB-48	v	7,5	WK	02.05.06	28	30.05.06	-21,85		-21,85		-26,59
CB-49	mf	8,5	WK	02.05.06	28	30.05.06	-25,58		-25,58		-28,97
CB-50	v	7,5	WK	02.05.06	28	30.05.06	-26,33		-26,33		-28,42
CB-51	mf	7,5	WK	12.05.06	18	30.05.06	-25,58		-25,58		-26,59
CB-52	v	7,0	WK	02.05.06	28	30.05.06	-24,93		-24,93		-25,77
CB-53	v	8,0	WK	09.05.06	21	30.05.06	-25,61		-25,61		-26,00
CB-54	v	7,5	WK	02.05.06	28	30.05.06	-25,00		-25,00		-25,35
CB-55	v	5,0	WK	09.05.06	21	30.05.06	-26,79		-26,79		-26,90
CB-56	v	8,5	WK	02.05.06	28	30.05.06	-25,28		-25,28		-23,82
CB-57	v	9,0	WK	09.05.06	21	30.05.06	-24,85		-24,85		-23,37
CB-58	mf	9,0	WK	12.05.06	18	30.05.06	-24,51		-24,51		-22,94
CB-59	mf	8,5	WK	09.05.06	21	30.05.06	-24,63		-24,63		-22,95
CB-60	mf	8,5	WK	09.05.06	21	30.05.06	-25,57		-25,57		-23,77
CB-61	v	8,0	WK	09.05.06	21	30.05.06	-25,91		-25,91		-24,08
CB-62	mf	5,0	WK	12.05.06	18	30.05.06	-27,21		-27,21		-24,73

## Anhang 12 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Harnstoffzyklusses .....	16
Abb. 2:	Strukturformel Kreatin .....	17
Abb. 3:	Schematische Darstellung der nicht-enzymatischen Umwandlung von Kreatin in Kreatinin .....	18
Abb. 4:	Die letzten Schritte der Biosynthese von Kreatin im menschlichen Körper .....	19
Abb. 5:	Umwandlung des Kreatins in das energiereiche Kreatinphosphat durch Kreatin-Kinase .....	20
Abb. 6:	Letzter Schritt der industriellen Synthese von Kreatin-Monohydrat .....	24
Abb. 7:	Vereinfachte schematische Darstellung der Pufferfunktion von Bicarbonat im menschlichen Körper .....	27
Abb. 8:	Schematischer Aufbau eines Elementaranalysators .....	30
Abb. 9:	Schematischer Aufbau eines Isotopenmassenspektrometers in CO <sub>2</sub> -Konfiguration .....	31
Abb. 10:	Schematische Darstellung der Nullpunktsenergien und benötigten Aktivierungsenergien bei einer chemischen Reaktion für verschiedene Isotope .....	35
Abb. 11:	Schematische Darstellung der $\delta^{13}\text{C}$ -Bereiche für C3-,C4-, und CAM-Pflanzen, sowie für aquatische Organismen .....	37
Abb. 12:	Schematische Darstellung der trophischen Verschiebung entlang der Nahrungskette .....	38
Abb. 13:	Flussschema für die Aufarbeitung von Urin für die Bestimmung der Stickstoffisotopenverhältnisse von Kreatin und Kreatinin für die EA-IRMS .....	45
Abb. 14:	Beispiel eines HPLC-Chromatogramms einer Urinprobe .....	47
Abb. 15:	HPLC-Kalibriergerade für Kreatin .....	48
Abb. 16:	HPLC-Kalibriergerade für Kreatinin .....	48
Abb. 17:	Schematischer Aufbau des EA-IRMS-Systems .....	52
Abb. 18:	Beispiel für eine Kohlenstoffisotopenanalyse per EA-IRMS .....	54
Abb. 19:	Beispiel für eine Stickstoffisotopenanalyse per EA-IRMS .....	55
Abb. 20:	Abhängigkeit der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für einen Standard von Geräte- parametern des Elementaranalysators .....	58

---

Abb. 21: Abhängigkeit der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für einen Standard von Geräteparametern des Elementaranalysators .....	58
Abb. 22: $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Laborstandards <i>creapure</i> <sup>TM</sup> 2003 bis 2006 .....	59
Abb. 23: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Laborstandards <i>creapure</i> <sup>TM</sup> 2003 bis 2006 .....	60
Abb. 24: Schematischer Aufbau des EA-IRMS-Systems, modifiziert für Gasanalysen .....	61
Abb. 25: Die Xanthidrol-Fällung .....	67
Abb. 26: Keeling-Plot für die Bestimmung des $\delta^{15}\text{N}$ von urinärem Harnstoff .....	69
Abb. 27: Veränderung der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Harnstoff von vier Urinen in einem Zeitraum von 61 Tagen .....	72
Abb. 28: Differenz der Harnstoffkonzentrationen und Differenz der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Harnstoffes zum Zeitpunkt t in Bezug auf die Basiswerte .....	73
Abb. 29: Verteilung der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für urinären Harnstoff vor, während und nach dem 24-Stunden-Radrennen .....	77
Abb. 30: Verlauf der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff über einen Zeitraum von 144 Stunden .....	79
Abb. 31: Verlauf der Harnstoffkonzentrationen in Urin über einen Zeitraum von 144 Stunden .....	82
Abb. 32: Vergleich der dichtekorrigierten Harnstoff-Stickstoff-Konzentration und zugehörige $\delta^{15}\text{N}$ -Werte .....	83
Abb. 33: Verlauf der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff-Stickstoff und Gesamtstickstoff des Urins über den Untersuchungszeitraum .....	85
Abb. 34: Abhängigkeit der Differenz in den $\delta^{15}\text{N}$ Werten zwischen Harnstoff und Gesamtstickstoff von dem Anteil an Rest-Stickstoff .....	87
Abb. 35: Keeling-Plot für die Bestimmung des $\delta^{15}\text{N}$ von Serumalbumin und Serumglobulin .....	89
Abb. 36: $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Serumalbumin und Serumglobuline der drei Probanden über den Untersuchungszeitraum .....	90
Abb. 37: $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Barthaars für einen Probanden .....	92
Abb. 38: Vergleich der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Bart- und Kopfhair für einen Probanden .....	94
Abb. 39: $\delta^{15}\text{N}$ -Werte verschiedener Nahrungsmittelgruppen, die von den Probanden während des Untersuchungszeitraumes verzehrt wurden .	97

Abb. 40: Vergleich der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte der Nahrung mit denen des Harnstoffes .....	98
Abb. 41: Vergleich der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff mit dem Sauerstoffpartialdruck des Blutes .....	101
Abb. 42: Schematische Darstellung des Protein- bzw. Aminosäurestoffwechsels im menschlichen Körper .....	102
Abb. 43: Abhängigkeit der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Harnstoff von der Differenz zwischen Proteinaufbau und Proteinabbau .....	104
Abb. 44: Erweiterte schematische Darstellung des Protein- bzw. Aminosäurestoffwechsels .....	108
Abb. 45: Nach dem Modell berechnete Differenz $\Delta\phi_P$ für Proband 1 .....	109
Abb. 46: Nach dem Modell berechnete Differenz $\Delta\phi_P$ für Proband 2 .....	109
Abb. 47: Nach dem Modell berechnete Differenz $\Delta\phi_P$ für Proband 3 .....	110
Abb. 48: Abhängigkeit der Adsorption von Kreatinin an den Kationenaustauscher vom pH-Wert .....	115
Abb. 49: Abhängigkeit der Adsorption von Kreatin an den Kationenaustauscher vom pH-Wert .....	116
Abb. 50: Übereinandergelegte HPLC-Chromatogramme vor und nach der CEC eines Kreatin- und Kreatinin-Standards .....	117
Abb. 51: Prozentuale Anteile von Kreatin und Kreatinin im Durchlauf nach der Kationenaustauschchromatographie bei verschiedenen pH-Werte .....	119
Abb. 52: Prozentuale Differenz zwischen der Menge an Kreatin und Kreatinin im Durchlauf nach der Kationenaustauschchromatographie für verschiedene pH-Werte .....	120
Abb. 53: Mengen an Kreatin für einzelne 10-ml-Fraktionen des Durchlaufes und des Waschwassers beim ersten Schritt der CEC .....	121
Abb. 54: Mengen an Kreatinin für einzelne 10-ml-Fraktionen des Eluats .....	122
Abb. 55: Prozentuale Anteile der Gesamt-Kreatin-Desorption für nacheinander folgenden Fraktionen .....	124
Abb. 56: Umwandlung von Kreatin zu Kreatinin im Reagenzglas bei 80°C im Heizblock für verschiedene Säurekonzentrationen .....	127
Abb. 57: Keeling-Plot für $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Kreatinin .....	128
Abb. 58: Keeling-Plot für $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Kreatinin .....	129
Abb. 59: Prozentualer Anteil der Herkunftsangaben der untersuchten Kreatin-Monohydrate .....	130

---

Abb. 60: $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für 27 synthetische Kreatin-Monohydrate .....	131
Abb. 61: $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für 27 synthetische Kreatin-Monohydrate (NEM) und neun Kreatin-Monohydrate mit bekannter Herkunft .....	133
Abb. 62: Verteilung der $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Kreatin-Monohydrat ( <i>creapure<sup>TM</sup></i> ) für den Standort <i>Degussa</i> , Deutschland in den Jahren 2001 und 2003 .....	134
Abb. 63: Verlauf der Konzentrationen für Kreatin und Kreatinin im Urin für einen ausgewählten Probanden .....	136
Abb. 64: $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Kreatinin und berechnete Werte für Kreatin .....	138
Abb. 65: Anteil des Kreatins am Gesamtkreatinin der Urinproben und $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des zugehörigen Kreatinins .....	140
Abb. 66: Auftragung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Bicarbonat isoliert aus Pferdeurin und Mischungen von Pferdeurin/ $\text{NaHCO}_3$ -Lösung in verschiedenen Verhältnissen .....	143
Abb. 67: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für $\text{TCO}_2$ und Gesamtkohlenstoff von Humanurin .....	145
Abb. 68: Zeitliche Veränderung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von $\text{TCO}_2$ und Gesamtkohlenstoff.....	146
Abb. 69: Abhängigkeit von $\delta^{13}\text{C}$ von $\text{TCO}_2$ von dem pH-Wert des Urins .....	147
Abb. 70: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von $\text{TCO}_2$ und Gesamt-Kohlenstoff für verschiedene Populationen von Pferdeurinproben .....	148
Abb. 71: Differenz zwischen $\delta^{13}\text{C}$ von $\text{TCO}_2$ und Gesamt-Kohlenstoff, für Urinproben analysiert in der jeweiligen Woche nach Probenahme .....	149
Abb. 72: Verlauf der Kreatininkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 1 .....	173
Abb. 73: Verlauf der Ammoniumkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 1 .....	173
Abb. 74: Verlauf der Proteinkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 1 .....	173
Abb. 75: Verlauf der Kreatininkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 2 .....	174
Abb. 76: Verlauf der Ammoniumkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 2 .....	174
Abb. 77: Verlauf der Proteinkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 2 .....	174

Abb. 78: Verlauf der Kreatininkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 3 .....	175
Abb. 79: Verlauf der Ammoniumkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 3 .....	175
Abb. 80: Verlauf der Proteinkonzentrationen über den Untersuchungszeitraum für Proband 3 .....	175
Abb. 81: Bestimmung der Funktion zur Berechnung des Urinflusses über die Kreatininkonzentration .....	176
Abb. 82: Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes im Kapillarblut für alle drei Probanden über den Zeitraum des Rennens .....	187

### Anhang 13 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Minimale und maximale Anteile der organischen Hauptbestandteile des menschlichen Urins (Harnstoff, Kreatinin/Kreatin und Bicarbonat) am Gesamt-Kohlenstoff bzw. Gesamt-Stickstoff des Urins .....	13
Tab. 2: Ungefährer Kreatin-Anteil in verschiedenen Nahrungsmitteln .....	22
Tab. 3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete IAEA-Vergleichsmaterialien für die Bestimmung von Kohlenstoff- und Stickstoffisotopenverhältnissen .	33
Tab. 4: Segmentlänge, abgedeckte Zeitspanne und benötigte Anzahl an Haaren für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Haar .....	51
Tab. 5: Systemkonfiguration EA-IRMS .....	52
Tab. 6: $\delta^{15}\text{N}$ - und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für <i>creapure</i> <sup>TM</sup> mit und ohne Verdünnung des Analyten .....	53
Tab. 7: Übersicht über die verschiedenen verwendeten EA-IRMS-Methoden .	53
Tab. 8: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für das CO <sub>2</sub> -Referenzgas mit Kalibrierungszeitpunkt .....	56
Tab. 9: $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für das N <sub>2</sub> -Referenzgas mit Kalibrierungszeitpunkt .....	56
Tab. 10: Übersicht über die Probanden des 24-Stunden-Rennens, biometrische Daten und Ergebnisse der Leistungsdiagnostik vor dem Rennen .....	64
Tab. 11: Zeiträume und Anzahl von Urinproben, die vor, während und nach dem 24-Stunden-Radrennen gesammelt wurden .....	64
Tab. 12: Versuchsreihe zur Überprüfung der Xanthidrol-Methode für humanen Urin .....	68

Tab. 13: Geräte- und Aufarbeitungspräzision der Xanthidrol-Methode zur Isolierung von Harnstoff aus humanem Urin .....	70
Tab. 14: $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Dixanthylurea für vier zufällig ausgesuchte Proben der Stabilitätsstudie aus dem Jahr 2006 .....	74
Tab. 15: Übersicht über die Probanden des 24-Stunden-Radrennens, Rennergebnisse, Energieumsätze und -zuführung .....	76
Tab. 16: Mittlere $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von urinärem Harnstoff vor, während und nach dem Wettkampf .....	78
Tab. 17: Zeitpunkte der maximalen und minimalen $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des urinären Harnstoffes und Zeitspanne zwischen den ersten Maxima und Minima sowie die dazu gehörenden $\delta^{15}\text{N}$ -Werte .....	80
Tab. 18: Prozentualer Anteil von Urinproben, deren $\delta^{15}\text{N}$ -Werte von Harnstoff entweder gleich, signifikant kleiner oder größer als die $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Gesamt-Urins sind .....	86
Tab. 19: Mittlere $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff und Albumin über den gesamten Untersuchungszeitraum für jeden Probanden und die Differenz der Stickstoffisotopenverhältnisse .....	91
Tab. 20: Mittlere $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Harnstoff, Albumin, Globuline und Keratin über den gesamten Untersuchungszeitraum für Proband 1 .....	95
Tab. 21: Ermittlung der Stickstoffbilanz der einzelnen Probanden für die drei Phasen der Untersuchung .....	96
Tab. 22: In das Modell eingehende Stoffflüsse, Isotopenverhältnisse und Fraktionierungsfaktor, Beschreibung und Herkunft der Daten .....	105
Tab. 23: Bestimmung des Fraktionierungsfaktors $\epsilon$ für die Isotopenfraktionierung des Stickstoffes bei der Harnstoffsynthese .....	106
Tab. 24: Ausgeschiedene Mengen und abgeschätzte Ionenstärken ausgewählter Salze und Harnstoff von menschlichem Urin .....	114
Tab. 25: Für Kreatinin und Kreatin per HPLC bestimmte prozentuale Anteile im Durchlauf nach CEC im Bezug zur eingesetzten Probe .....	118
Tab. 26: Vergleich verschiedener untersuchter Elutions-Möglichkeiten hinsichtlich Vorteilen und Nachteilen für die Isotopenanalyse der entsprechenden Eluate .....	123
Tab. 27: Eingesetzte und wieder gefundene Menge bei der CEC eines Kreatin-/ Kreatinin-Standards .....	125

Tab. 28:	Geschwindigkeitskonstanten mit Standardabweichungen für die Umsetzung von Kreatin zu Kreatinin bei 80° C im Heizblock bei verschiedenen Säurekonzentrationen .....	126
Tab. 29:	Hersteller, Herkunft und Name verschiedener synthetischer Kreatin-Monohydrate .....	132
Tab. 30:	$\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für verschieden Lots des Produktes <i>creapure<sup>TM</sup></i> der Firma <i>Degussa</i> aus den Jahren 2001 bis 2003 .....	135
Tab. 31:	Volumenverhältnisse Urin zu Standard, $\text{TCO}_2$ -Konzentrationen und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Pferdeurin .....	142
Tab. 32:	Präzision verschiedener Proben und Standards für die Bicarbonat-Methode .....	144
Tab. 33:	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien .....	166
Tab. 34:	Experimentelle Daten Belastungsstudie Proband 1 .....	167
Tab. 35:	Experimentelle $\delta^{15}\text{N}$ -Werte Belastungsstudie Proband 1 .....	168
Tab. 36:	Experimentelle Daten Belastungsstudie Proband 2 .....	169
Tab. 37:	Experimentelle $\delta^{15}\text{N}$ -Werte Belastungsstudie Proband 2 .....	170
Tab. 38:	Experimentelle Daten Belastungsstudie Proband 3 .....	171
Tab. 39:	Experimentelle $\delta^{15}\text{N}$ -Werte Belastungsstudie Proband 3 .....	172
Tab. 40:	Im Rahmen der Belastungsstudie untersuchte Nahrungsmittel .....	186
Tab. 41:	Berechnete Fraktionierungsfaktoren $\varepsilon$ für Proband 1 .....	188
Tab. 42:	Berechnete Fraktionierungsfaktoren $\varepsilon$ für Proband 2 .....	188
Tab. 43:	Berechnete Fraktionierungsfaktoren $\varepsilon$ für Proband 3 .....	188
Tab. 44:	In das Modell eingehende Daten und durch numerische Iteration berechnete Werte für Proband 1 .....	189
Tab. 45:	In das Modell eingehende Daten und durch numerische Iteration berechnete Werte für Proband 2 .....	190
Tab. 46:	In das Modell eingehende Daten und durch numerische Iteration berechnete Werte Proband 3 .....	191
Tab. 47:	Labornummer, Handelsname, Hersteller (Vertrieb) und angegebenes Herkunftsland der untersuchten Kreatin-Monohydrate .....	192
Tab. 48:	Labornummer, Darreichungsform, LOT-Nummer und per HPLC bestimmter Kreatingehalt für verschiedene Kreatin-Monohydrate .....	193
Tab. 49:	Labornummer, $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für die einzelnen Kreatin-Monohydrate .....	194

---

Tab. 50: Konzentrationen an Kreatinin (Crn), Kreatin (Cr), bestimmt per HPLC und $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Kreatinin und Gesamtkreatinin (TCrn) sowie die daraus berechneten $\delta^{15}\text{N}$ -Werte für Kreatin .....	195
Tab. 51: Labornummer, Geschlecht des Pferdes, pH-Wert, Abnahme und Aufarbeitungsdatum sowie die bestimmten experimentellen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für die untersuchten Pferdeurine .....	196

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. W. Schänzer betreut worden.

Köln, 01.05.2007

## Lebenslauf

Name: Frank Hülsemann  
Adresse: Kornblumenweg 5, 50858 Köln  
Geburtsdatum: 08.02.1972  
Geburtsort: Duisburg-Homberg  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

Ausbildung: 1978-1982 Besuch der Grundschule Kirchstraße, Duisburg-Homberg  
1982-1991 Besuch des Franz Haniel Gymnasiums, Duisburg-Homberg, Abschluss Abitur  
1991-2000 Studium der Chemie, Universität zu Köln, Abschluss Diplom Chemie  
2001-2007 Promotionsstudium, Universität zu Köln; Anfertigung der Dissertation am Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln

Berufstätigkeit: 1999 studentische Hilfskraft, Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre: Angewandte Physikalische Chemie, Forschungszentrum Jülich  
1999-2000 studentische Hilfskraft, Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre: Atmosphärische Chemie, Forschungszentrum Jülich  
2000-2003 wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln  
2003-2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln  
seit 2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter, Manfred Donike Institut für Dopinganalytik e.V., Deutsche Sporthochschule Köln