

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 *TIERE*

Für die Versuche standen insgesamt 93 Tiere zur Verfügung. 32 Kälber erhielten das veterinärmedizinische Präparat Ventipulmin[®] Granulat, Hersteller: Boehringer, Ingelheim, D, und 37 Kälber erhielten in Wasser gelöstes Clenbuterol-Hydrochlorid (N-AB 365 CL), welches vom Hersteller (Boehringer, Ingelheim, D) als Reinsubstanz zur Verfügung gestellt wurde. Zwölf unbehandelte Kälber dienten als Kontrolltiere. Weitere 6 Kälber wurden zur Kontrolle des Herkunftsbestandes jeweils in den ersten Tagen nach der Übernahme geschlachtet. Die Versuche zur Feststellung der Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Clenbuterol wurden mit 6 Tieren durchgeführt. Alle Kälber wurden von demselben Kälbermäster (Firma Bahlmann, Lindern, D) gekauft, um eine einheitliche Haltung und Fütterung der Tiere vor Versuchsbeginn sicherzustellen. Die Tiere gehörten zur schwarzbunten Rasse (Typ: Holstein Friesian), waren 14-18 Wochen alt und, bis auf ein weibliches Tier, Bullenkälber. Als Dauerkennzeichnung dienten eindeutig nummerierte Ohrmarken. Die Tiere wogen bei der Ankunft zwischen 118 und 202 kg. Sie waren zu Beginn der Versuche klinisch gesund und befanden sich in einem guten Allgemeinzustand.

3.2 *HALTUNG UND FÜTTERUNG*

Die Haltung und Fütterung aller Tiere war während der gesamten Versuchsdauer gleich. Die Tiere waren in den zur Zentralen Versuchstierzucht gehörenden Großtierstallungen des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Buchten mit je drei Tieren in Anbindehaltung untergebracht. Jedem Tier stand eine Tränke in Form eines Troges zur Verfügung. Keines der Tiere konnte an die Tränke eines anderen heranreichen. Statt Einstreu wurden Gummimatten verwendet um zu verhindern, dass die Kälber zusätzlich Einstreu aufnehmen konnten. Damit wurde der gängigen Praxis der Fütterung von Kälbern in der Milchmast entsprochen, die verhindert, dass es bei den Kälbern zur Ausbildung des Pansens kommt.

Die Kälber wurden 2 x täglich um 7.00 Uhr und um 15.00 Uhr (1. Abschnitt um 6.30 und um 14.30 Uhr) mit dem Milchaustauschfuttermittel „BAMO Mast I 60 %“, einem Alleinfuttermittel für Mastkälber der Firma Bahlmann, Lindern, D gefüttert. Das Milchaustauschfuttermittel wurde als Tränke entsprechend den Anweisungen des Herstellers angerührt. Zusätzlich erhielten die Tiere im Anschluss an die Fütterung um 15.00 Uhr (bzw. 14.30 Uhr) als Ergänzungsfuttermittel BAMO Struktur-Cobs für Kälber und BAMO Kälbermüsli der Firma Bahlmann. Die verabreichten Mengen entsprachen dem Tränk- und Futterplan des Herstellers (s. Anhang, Tabelle I). Das Milchaustauschfuttermittel wurde von

den Kälbern regelmäßig in den ersten 15 Minuten der Fütterung aufgenommen. Danach wurde eventuelle Restmilch verworfen. Wasser stand jedem Tier in einem automatischen Spender über Nacht ad libitum zur Verfügung.

3.3 *VERSUCHSANSÄTZE*

3.3.1 Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Clenbuterol

3.3.1.1 **Versuchsplan**

Für die Versuche zur Bioverfügbarkeit von Clenbuterol standen 6 Kälber zur Verfügung die in 3 Stalleinheiten untergebracht waren. Haltung und Fütterung erfolgten wie unter 3.2 beschrieben. Die Tiere wurden am Tag vor jeder Behandlung gewogen. Temperatur und Herzfrequenz der Tiere wurden während der Versuche mindestens zweimal täglich kontrolliert.

Die Kälber wurden im „cross-over design“ behandelt. Bei dieser Versuchstechnik erhält jedes Tier jede zu untersuchende Dosis mit ausreichend langen Auswaschzeiten zwischen den einzelnen Versuchen. Damit wurden gemäß Derendorf & Garrett (1987) interindividuelle Schwankungen bei der Bestimmung der Bioverfügbarkeit ausgeschlossen. 4 Tiere (OM 22, 27, 32, 33) erhielten je 6 verschiedene Behandlungen entsprechend dem folgenden Schema:

Orale Behandlung:

Dosierungen: 2,5 µg, 5 µg und 10 µg Clenbuterol-Hydrochlorid pro kg Körpergewicht

Das Clenbuterol-Hydrochlorid erhielten die Tiere als Reinsubstanz (N-AB 365 CL-Hersteller: Boehringer, Ingelheim, D) in Wasser gelöst morgens zu Versuchsbeginn mit dem ersten Liter der Milchaustauscher-Tränke. Die Mischung wurde von allen Tieren innerhalb von 2 Minuten aufgenommen. Danach erhielten sie die restliche Milch.

Intravenöse Behandlung:

Dosierungen: 1 µg, 2 µg und 3µg Clenbuterol-Hydrochlorid pro kg Körpergewicht

Das Clenbuterol-Hydrochlorid wurde den Kälbern in Form der Ventipulmin[®]-Injektionslösung (Hersteller: Boehringer, Ingelheim, D) zu Versuchsbeginn innerhalb von einer Minute intravenös über die Vena jugularis externa verabreicht.

2 Tiere (OM 23 und 32) mussten aufgrund ihres schlechten Allgemeinbefindens vorzeitig aus dem Versuch herausgenommen werden. Bei diesen Kälbern fehlt die intravenöse Behandlung

mit 1 µg Clenbuterol pro kg Körpergewicht. Vom Kalb OM 23 fehlen außerdem die oralen Behandlungen mit 2,5 µg und 10 µg/kg Clenbuterol pro kg Körpergewicht.

Die Versuche wurden über einem Zeitraum von insgesamt 28 Tagen durchgeführt. Der Zeitraum zwischen den einzelnen Versuchsabschnitten betrug mindestens 72 Stunden.

3.3.1.2 Probenahme

Blutproben

Die Probenahmezeiten wurden so gewählt, dass genügend Messpunkte zur Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter von Clenbuterol vorhanden waren. Um den Verlauf der Plasmaspiegelkonzentration ausreichend genau charakterisieren zu können, wurden während der sich schnell ändernden Resorptionsphase nach oraler Applikation und der Verteilungsphase nach intravenöser Applikation die Blutproben in kürzeren Zeitabständen entnommen. Außerdem sollte zur Festlegung der Zeiten zur Blutentnahme unter 3.3.2.3 (Versuche zum Rückstandsverhalten von Clenbuterol) t_{\max} möglichst genau bestimmt werden. Die in allen Versuchsabschnitten beibehaltenen Blutabnahmezeitpunkte sind in Tabelle 11 am Ende dieses Abschnittes aufgeführt.

Blutentnahmetechnik:

Alle Blutentnahmen erfolgten über einen Venenkatheter (Cavatheder[®] C 855 für die Vena jugularis, Hersteller: MTS/St. Wendel, D), Länge 50 cm, Innendurchmesser 1,5 mm.

Zuerst wurde die Haut im Bereich der Drosselrinne auf einer Fläche von 25 x 25 cm rasiert, so dass genügend Platz vorhanden war, um den Katheter später im oberen Halsbereich fixieren zu können. Nach gründlicher Reinigung und Desinfektion der rasierten Fläche wurde der Katheter entsprechend der Gebrauchsanleitung in die Vena jugularis externa sinistra in caudoventraler Richtung eingeführt. Nach Prüfung der Durchgängigkeit des Katheters, durch Abnahme einer Blutprobe, wurde dieser mit einer Heparinlösung (Heparin-Natrium -250 000-ratiopharm[®], Ulm, D, in isotoner steriler Kochsalzlösung) mit 250 I.E./ml gespült. Die Menge entsprach dem 3-4fachen Volumen des Gesamtkatheterinhaltes. Im Anschluss wurde der Katheter mittels einer Hautnaht, mit Heftpflaster und einer elastischen Binde am Hals fixiert und vor Beschädigungen geschützt. Vor jeder Blutprobenentnahme wurde der Inhalt des Katheters verworfen. Nach jeder Entnahme erfolgte eine Spülung des Katheters mit isotoner steriler Kochsalzlösung, wobei mehrmals während eines Versuches und nach der letzten Entnahme mit der bereits beschriebenen Heparinlösung gespült wurde. Am Tag vor jeder neuen Behandlung erfolgte wiederum eine Prüfung auf Durchgängigkeit des Katheters. Nach 14 Tagen wurden neue Katheter jeweils in die Vena jugularis externa dextra gelegt um die erste Vene zu entlasten.

Zur Plasmagewinnung wurde das Blut in vom Hersteller (Sarstedt, Nümbrecht) bereits mit Lithium-Heparin (15 I.E. Heparin/ml Blut) vorbehandelten 10 ml Röhrchen aufgefangen. Nach mehrmaligem Schwenken zur gleichmäßigen Verteilung des Heparins und 20-minütiger Zenrifugation bei 3000 U/min konnte das Plasma abgegossen und bei -30° C gelagert werden.

Urinproben

Die Urinproben wurden durch Stimulation mittels kreisförmigen Reibens am Präputium mit der planen Handfläche und unter leichtem Druck gewonnen. Mit dieser Methode konnten je Probe zwischen 15 und 50 ml Urin gewonnen werden.

Die in jedem Versuchsabschnitt eingehaltenen Zeitpunkte für die Urinabnahmen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Die Lagerung der Urinproben erfolgte bei -30° C.

Tabelle 11 Zeitplan für die Entnahme der Blut- und Urinproben vor und nach einer Einmalapplikation [h:min]

Intravenöse Dosis		orale Dosis	
Plasma	Urin	Plasma	Urin
- 0:05	- 0:05	- 0:05	- 0:05
0:05	0:35	0:15	0:30
0:10	1:00	0:30	1:00
0:15	1:50	0:45	1:30
0:20	2:00	1:00	2:00
0:30	2:30	1:15	2:30
0:45	3:00	1:30	3:00
1:00	3:30	2:00	3:30
1:15	4:00	2:30	4:00
1:30	4:30	3:00	4:30
2:00	5:00	3:30	5:00
2:30	5:30	4:00	5:30
3:00	6:00	4:30	6:00
4:00	7:00	5:00	7:00
5:00	8:00	5:30	8:00
6:00	9:00	6:00	9:00
7:00	10:00	7:00	10:00
8:00	11:00	8:00	11:00
9:00	12:00	9:00	12:00
10:00	24:00	10:00	24:00
12:00	48:00	12:00	48:00
24:00	72:00	24:00	72:00
48:00		48:00	
72:00		72:00	

Probenahme erfolgte nur bei einem Teil der Tiere nach den ersten zwei Behandlungen

3.3.2 Rückstandsverhalten von Clenbuterol

3.3.2.1 Versuchsplan

Die Versuche wurden mit 81 Kälbern durchgeführt. Für die Unterbringung der Tiere standen nur 5-6 Stalleinheiten mit jeweils 3 Stellplätzen zur Verfügung, so dass der Versuch in 6 Abschnitte gegliedert werden musste. Jeder Abschnitt umfasste zwei Tiergruppen, die erste Gruppe wurde behandelt, die zweite Gruppe diente als Kontrolle. Je Abschnitt standen 2 Kontrolltiere zur Verfügung, wobei das erste Kontrolltier mit den ersten Tieren und das zweite mit den letzten Tieren des jeweiligen Versuchsabschnittes geschlachtet wurde. In jedem Versuchsabschnitt wurde zusätzlich ein Kalb zur Kontrolle des Herkunftsbestandes vor Versuchsbeginn geschlachtet. Haltung und Fütterung erfolgten wie unter 3.2 beschrieben.

Jeder Abschnitt beinhaltete drei Phasen:

- *Akklimatisationsphase*

Die Tiere wurden zur Akklimatisierung an die neue Umgebung mindestens 7 Tage vor Beginn der Behandlung in den für die Versuche vorgesehenen Stallungen untergebracht und bis zum Beginn der Behandlung regelmäßig gewogen.

- *Behandlungsphase*

In der Behandlungsphase erhielten die Tiere entweder Ventipulmin[®] Granulat oder eine Clenbuterol-Hydrochloridlösung entsprechend dem Versuchsplan in Tabelle 12 jeweils mit der Tränke um 7.00 Uhr und 15.00 Uhr (1. Abschnitt 6.30 und 14.30 Uhr). Um Kontaminationen zu vermeiden erfolgte die Unterbringung der Kontrolltiere, welche keine Behandlung erhielten, in einer gesonderten Stalleinheit. Alle Kälber wurden in den Abschnitten 1-5 täglich und im Abschnitt 6 alle zwei Tage gewogen.

- *Postbehandlungsphase*

Die Dauer dieser Phase betrug zwischen 0 und 35 Tagen. Die Länge der Wartezeit nach letzter Dosisgabe ist dem Versuchsplan in Tabelle 12 zu entnehmen. Die Tiere wurden während dieser Zeit ebenfalls regelmäßig gewogen.

Tabelle 12 **Versuchsplan**

Versuchs- bezeichnung	Behandlungsphase*			Postbehandlungsphase										
	Versuchs- tag	Zeitpunkt der Dosis- gabe	Dosis [μ g Clenbuterol- hydrochlorid pro kg LG]	Wartezeit nach letzter Dosisgabe (Tage)										
				(Angabe des Versuchsabschnittes I-VI und der Tieridentifikationsnummer: OM-Nr.)										
				0	1	2	3	4	7	14	21	28	35	
therapeutische Dosis	1.-10.	6.30 Uhr	0,8	}	I		I		I	I				
		14.30 Uhr	0,8		5		1		4	10				
	11.	6.30 Uhr	0,8	}										
					7		3		9	15				
	1.-10.	7.00 Uhr	0,8	}	III	V	V	V	V		II		II	
		15.00 Uhr	0,8		48	67	71	80	77		19		28	
11.		7.00 Uhr	0,8	}	IV									
			63		69	73	76	79		21		30		
Mastdosis	1.	15.00 Uhr	10	}	III		IV		III	IV	III	III	IV	IV
	2.-21.	7.00 Uhr	10		37		49		34	52	40	39	55	58
	22.	15.00 Uhr	10	}										
		7.00 Uhr	10		II		51		36	54	42	45	57	60
doppelte Mastdosis	1.	15.00 Uhr	20	}										
	2.	7.00 Uhr	20											
	3.	15.00 Uhr	10	}										
		7.00 Uhr	10		VI				VI	VI	VI			
	4.-6.	15.00 Uhr	15	}										
		7.00 Uhr	15		81				84	90	93			
	7.	15.00 Uhr	15	}										
		7.00 Uhr	15						85	91	94			
	8.-21.	15.00 Uhr	15	}										
		7.00 Uhr	15		82				86	92	95			
22.	15.00 Uhr	20	}											
	7.00 Uhr	20												
Tier aus einem Vorversuch zur doppelten Mastdosis	1.	15.00 Uhr	20	}	IV									
	2.-21.	7.00 Uhr	20		64	(einziges weibliches Tier)								
	22.	15.00 Uhr	20	}										
		7.00 Uhr	20											

*jeweils die mit einer Klammer zusammengefasste Behandlungsphase gilt für alle im gleichen Abschnitt der Postbehandlungsphase stehenden Tiere

3.3.2.2 Dosierung und Applikation

Behandlung mit Ventipulmin[®] Granulat

Zur Applikation wurde Ventipulmin[®] Granulat mit einem Gehalt von 0,016 mg Clenbuterol-Hydrochlorid pro 1 Gramm Granulat verwendet.

Die erforderliche Menge Ventipulmin[®] Granulat zur Erreichung der empfohlenen therapeutischen Dosis von 0,8 µg Clenbuterol-Hydrochlorid pro kg Körpergewicht wurde täglich für jedes Tier anhand des jeweiligen aktuellen Körpergewichtes berechnet.

Behandlung mit Clenbuterol-Hydrochloridlösung

Es wurde eine Ausgangslösung unter Verwendung von Clenbuterol-Hydrochlorid als Reinsubstanz und Wasser mit einem Clenbuterol-Hydrochloridgehalt von 1 mg bzw. 2 mg pro ml Wasser hergestellt. Die Ausgangslösung diente zur Herstellung der fertigen Gebrauchslösung mit einem Clenbuterol-Hydrochloridgehalt von 100 mg bzw. 200 mg pro 1L Wasser. Die Gebrauchslösung wurde den Tieren 2x täglich in der jeweiligen Dosis von 10 µg, 15 µg oder 20 µg Clenbuterol-Hydrochlorid pro kg Körpergewicht (immer bezogen auf das aktuelle Körpergewicht) verabreicht.

Die jeweilige Dosis wurde den Kälbern mit den ersten 1-2 Litern Milch verabreicht, um die Aufnahme der gesamten Dosis zu gewährleisten. Erst dann erhielten sie die restliche Milch.

3.3.2.3 Probenahme, Probenaufbereitung und Probenlagerung

Blutproben

Von allen Tieren wurde Blut (4 x 10 ml) mittels einer Einweg-Venenpunktionskanüle nach Strauss, Durchmesser 1,5 mm (Hersteller: B. Braun, Melsungen, D) aus der Vena jugularis externa entsprechend dem folgenden Zeitplan entnommen:

- *Akklimatisationsphase* (alle Abschnitte):
Entnahme von ein bis zwei Blutproben als Nullproben von allen Tieren vor Behandlungsbeginn
- *Behandlungsphase*:
Blutplasma:
1. Abschnitt
behandelte Tiere: täglich 6.30 Uhr; 7.30 Uhr; 14.30 Uhr und 15.30 Uhr
Kontrolltiere: täglich 6.30 Uhr

2. Abschnitt:

behandelte Tiere: täglich 7.00 Uhr; 10.00 Uhr und 15.00 Uhr

Kontrolltiere: täglich 7.00 Uhr

3.-6. Abschnitt

behandelte Tiere: täglich 7.00 Uhr und 11.00 Uhr

Kontrolltiere: täglich 7.00 Uhr

Blutserum:

3.-4. Abschnitt

behandelte Tiere und Kontrolltiere: täglich 7.00 Uhr

- *Postbehandlungsphase* (alle Abschnitte):
Entnahme einer Blutprobe einmal täglich jeweils zur gleichen Zeit bis zur Schlachtung und eine Probe während des Schlachtprozesses.

Die Plasmagewinnung und -lagerung erfolgte wie unter Punkt 3.3.1.2 „Blutproben“ beschrieben.

Zur Serumgewinnung wurde das Blut in vom Hersteller (Sarstedt, Nümbrecht, D) bereits vorbehandelten 10 ml Röhrchen aufgefangen. Nach 20-minütiger Wartezeit und 20-minütiger Zentrifugation bei 3000 U/min konnte das Serum abgegossen und bei -30° C gelagert werden.

Gewebe und Körperflüssigkeiten

Am letzten Tag der Wartezeit (s. Tabelle 12) wurden die Kälber in der Schlachthalle des BgVV von einem professionellen Schlachter vorschriftsmäßig getötet und zerlegt. Leber, Muskulatur, Niere, Galle und Auge wurden entnommen.

Da nicht alle Organe sofort untersucht werden konnten, sollte durch Vorversuche geklärt werden, ob Clenbuterol in den Organen während der Lagerung homogen verteilt bleibt. Daher wurden Leber, Muskel und Niere zum Teil bereits homogenisiert und zum Teil im Stück gelagert.

Leber:

Die Lebern von acht Tieren wurden sofort nach der Schlachtung zum Teil mit einem Kutter (Typ: MTK 561, Hersteller: Maschinenfabrik Dornhan, D) zerkleinert und zum Teil im Stück bei -30° C eingefroren. Fünf Lebern sind vor dem Einfrieren mit dem Kutter zerkleinert worden. Um die Verteilung von Clenbuterol in der Leber zu testen, wurden die Lebern von zwei Tieren sofort nach der Schlachtung und vor dem Einfrieren bei -30° C in folgende Teile zerlegt: Processus papillaris, Lobus sinistra dorsal und ventral, Lobus quadratus dorsal und

ventral und Lobus dexter dorsal und ventral. Die weitere Aufarbeitung aller anderen Lebern erfolgte in frischem Zustand, d.h. in den ersten vier Tagen (Lagerung bei +4° C) nach der Schlachtung.

Muskulatur:

Von der Muskulatur wurde der Musculus glutaeus entnommen. Die Muskelproben von drei Tieren wurden sofort nach der Schlachtung zum Teil mit dem Cutter zerkleinert und zum Teil im Stück bei -30° C eingefroren. Bei allen anderen Tieren erfolgte die Aufarbeitung der Muskulatur in frischem Zustand, d.h. in den ersten vier Tagen (Lagerung bei +4° C) nach der Schlachtung.

Niere:

Die Aufarbeitung und Lagerung der Nieren sofort nach der Schlachtung der Kälber erfolgte nach folgenden Schema:

Niere links ungekuttert und rechts gekuttert:	10 Tiere
Nieren beide gekuttert:	5 Tiere
Nieren beide ungekuttert:	12 Tiere
Niere links getrennt nach Cortex und Medulla:	20 Tiere
Niere links und rechts getrennt nach Cortex und Medulla:	19 Tiere

Um die Verteilung von Clenbuterol in der Niere zu testen, erfolgte eine Trennung mittels Skalpell und Pinzette in Cortex und Medulla.

Die jeweils linke Niere wurde in frischem Zustand innerhalb der ersten 4 Tage nach der Schlachtung analysiert (Lagerung bei +4° C). Die Analyse der jeweils rechten Niere erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt (Lagerung bei -30° C).

Galle:

Die Gallenflüssigkeit wurde bis zur Analyse in Röhrchen à 5 ml abgefüllt und bei -30° C gelagert.

Auge:

Die Arbeiten von Dürsch (1992), Sauer & Limer (1993), Sauer & Anderson (1994), Godfrey et al. (1996) und Gleixner et al. (1996) haben gezeigt, dass sich Clenbuterol in stark pigmentierten, melaninhaltigen Geweben wie dem Pigmentepithel der Retina und in dunklen Haarbereichen anreichert. Ziel war es daher, möglichst das gesamte pigmentierte Epithel des Auges zu isolieren. Weil sich durch den Einfrierungsprozess die Clenbuterolkonzentration in den pigmentierten Teilen des Auges deutlich verringert (Sauer & Limer, 1993) wurden die Augen noch am Schlachttag präpariert.

Zur Verdeutlichung der für die Untersuchungen verwendeten Teile des Auges ist in der folgenden Abbildung 7 der Aufbau des Auges dargestellt:

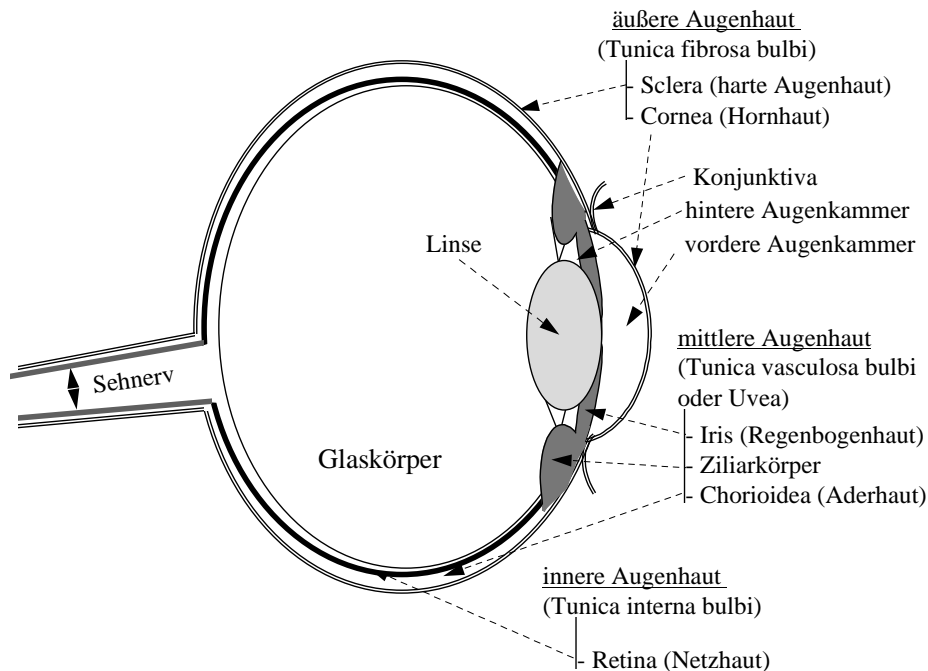


Abbildung 7 Aufbau des Auges (stark schematisiert)

Die Retina (Netzhaut) des Auges, besteht aus 10 Schichten (Koch, 1976):

1. Membrana limitans interna
2. Nervenfaserschicht
3. Nervenzellschicht
4. innere retikuläre (plexiforme) Schicht
5. innere Körnerschicht
6. äußere retikuläre (plexiforme) Schicht
7. äußere Körnerschicht
8. Membrana limitans externa
9. Schicht der Zapfen und Stäbchen
10. Pigmentepithelschicht

Für die Präparation war nur die Pigmentepithelschicht der Retina von Bedeutung. Da diese zum Teil fest mit der mittleren Augenhaut (Uvea) bestehend aus Iris, Chorioidea und Ciliarkörper verbunden ist, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nachdem das Auge sorgfältig von störenden Fettanteilen und Muskelfasern befreit worden war, konnte es mittels Pinzette und Schere nach einem Einstich durch die Cornea in zwei Hälften geteilt werden. Linse, Augenkammerwasser und Glaskörper wurden entfernt. Nach Ausstülpung der inneren Schichten von beiden Augenhälften nach außen war die Retina frei

zugänglich. Die ersten neun Schichten der Retina konnten jetzt problemlos von der Pigmentepithelschicht abgestreift werden. Danach wurde die Pigmentepithelschicht der Retina zusammen mit der Uvea abgezogen. Diese Teile wurden in ein vorgewogenes Probenröhrchen überführt und mit diesem zusammen gewogen. Erste Versuche (Gude et al., 1996) zur Aufarbeitung und Analyse der Retina und Uvea ließen erkennen, dass nach Teilung und grober Zerkleinerung der Retina und Uvea, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht gewährleistet werden konnte. Daher wurde das Gewebe nach langsamer Zugabe von insgesamt 10-12 ml Tris-HCl Puffer (Herstellung s. 3.4.1.1) 15-20 Minuten lang mittels eines Potters (Typ 853 202, Firma B. Braun, Melsungen, D) bei 1200 U/min homogenisiert. Nach genauer Rückwaage wurde vom Homogenat 10 Portionen mit je 1 g entnommen und bis zur Analyse bei -24° C eingefroren.

3.4 ANALYTIK VON CLENBUTEROL

Die Untersuchungen zum Nachweis von Clenbuterol wurden im BgVV in Zusammenarbeit mit dem „Nationalen und EU-Referenzlabor für Rückstände von pharmakologisch wirksamen Stoffen“ durchgeführt.

Plasma, Urin, Leber und Muskulatur wurden mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) untersucht. Die Bestätigung eines Teils der Plasmaproben erfolgte mittels GC-MS/EI (Gaschromatographie-Massenspektrometrie unter EI Bedingungen, wobei EI für Electron impact -Elektronenstoßionisation- steht). Außerdem wurden alle Proben von Leber, Muskel, Niere, Galle und Retina/Uvea mit GC-MS/EI untersucht.

3.4.1 Analysen mittels ELISA

3.4.1.1 Material/Chemikalien/Lösungen

Material:	- Corex tube	Du Pont, Bad Homburg, D
	- ELISA-Testkit (Katalog-Nr. 101210)	Hersteller: Neogen [®]
	„ELISA technologies-clenbuterol ELISA test“	Corporation, Lexington, USA
		Vertrieb: Biognost,
		Wevelgem, B
	- Mikrotiterplatten-Klebeband, 82 mm	NeoLab, Heidelberg, D
	- Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, D
	- pH-Indikatorstäbchen Alkalit [®] pH 7,5-14	Merck, Darmstadt, D
	- Stomacher-Beutel	Seward Medical, London, UK
	- Zentrifugengläser (15 und 23 ml) mit Glas-Stopfen	Crannich, Göttingen, D

Chemikalien: Alle aufgeführten Chemikalien wurden in der höchsten Reinheitsstufe von den folgenden Firmen bezogen:

- Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, D
- Clenbuterol-Hydrochlorid (N-AB 365CL)	Boehringer, Ingelheim, D
- H_2O für HPLC	Baker, Deventer, NL
- Isobutanol	Merck, Darmstadt, D
- konzentrierte Salzsäure (37 %)	Merck, Darmstadt, D
- NaOH	Merck, Darmstadt, D
- n-Hexan	Merck, Darmstadt, D
- Protease Typ XIV (Katalog-Nr. P 5147)	Sigma, Deisenhofen, D
- <i>tert.</i> Butylmethylether	Merck, Darmstadt, D
- Tris (hydroxymethyl)-aminomethan ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Merck, Darmstadt, D
Lösungen: - Clenbuterol-Standardlösungen	Clenbuterol-Hydrochlorid (in Testkit-Puffer gelöst) Konzentration der Standardlösungen: 10; 2; 0,8; 0,4; 0,1 und 0,05 ng/ml Testansatz
- NaOH	5 M in H_2O
- Proteaselösung	für die Aufarbeitung von 1 ml (4 ml) Plasma: ⇒ 1 (4) mg Protease pro 1 ml Tris-Puffer für Leber und Muskulatur: ⇒ 5 mg pro 1 ml Tris-Puffer
- Salzsäure	1 M in H_2O
- Tris-Puffer (Hydrolysepuffer)	0,2 M Tris, 0,1 M $\text{CaCl}_2 \times 2$ H_2O in H_2O , mit 1 M HCL auf pH 8,0 einstellen (Kontrolle mittels pH-Meter)

3.4.1.2 Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer „MR 5000“	Dynex Technologies (vormals Dynatech), Denkendorf, D
- Mikrotiterplatten-Schüttler „Varishaker-Incubator AM89A“	Dynex Technologies, Denkendorf, D
- pH-Meter „pH 325“	WTW, Weilheim, D

- Stomacher „80“/Laboraty Blender	Seward Medical, London,UK
- TCS-Trockentemperier-System „Vapotherm FN 185/253“	Labor Technik Barkey, Bielefeld, D
- Trockenschrank „ED 53“	WTB Binder, Tuttlingen, D
- Überkopfschüttler „RL AX 2“	Heidolph, Kelheim, D
- Vortex-Genie 2	Scientific Industries NR, NY, USA
- Zentrifuge „Varifuge 3. OR“	Heraeus, Sepatech, Hanau, D

3.4.1.3 Geräte-Software

MikroWIN Version 2.12 (1993) für ELISA-Standardkalibrierung, entwickelt von Mikrotek Laborsysteme, Overath, bezogen von Dynex Technologies, Denkendorf, D

3.4.1.4 Probenextraktion

Die Methoden zur Extraktion von clenbuterolhaltigen Plasma-, Urin-, Leber- und Muskelproben zur Vorbereitung auf das Screening mittels ELISA, wurden im EU-Referenzlabor für Tierarzneimittelrückstände im BgVV entwickelt.

Alle Proben wurden im Parallelansatz aufgearbeitet:

Plasmaproben

1. Plasma 10 min bei 3000 U/min zentrifugieren
2. Brutschrank auf 55 ° C vorheizen
3. 1 ml (4 ml) Probe in Zentrifugengläser pipettieren
4. 2 ml (11 ml) Tris-Puffer und 1 ml Proteaselösung zugeben, kurz schütteln
5. Gläser gut verschließen und 2 h bei 55 °C inkubieren (Hydrolyse), nach Abkühlen auf Raumtemperatur 5 min bei 3000 U/min und 4° C zentrifugieren (trübe Lösung, minimaler Niederschlag)
6. 3 ml (15 ml) der trüben Lösung in ein neues Zentrifugenglas pipettieren
7. mit 5 N NaOH auf pH ↓ 9,5 einstellen
8. erste Extraktion mit 3 ml (10 ml) *tert.* Butylmethylether, ca. 3 min auf dem Überkopfschüttler extrahieren
9. zur Phasentrennung 5 min bei 3000 U/min und 4° C zentrifugieren
10. Überstand mit Pasteurpipette in Corex tubes überführen
11. wässrige Phase ein zweites Mal mit 3 ml (10 ml) *tert.* Butylmethylether (wie unter 8. und 9. beschrieben) extrahieren und Überstände vereinigen
12. Evaporation der Etherphasen unter Stickstoff im Trockentemperier-System bis zur Trockne

Urinproben

1. 1 ml Probe in ein Zentrifugenglas pipettieren
2. pH mit einigen Tropfen 1M NaOH oder 0,1 M Essigsäure auf pH 9,0 einstellen, kurz schütteln
3. 1. Extraktion mit 1 ml Isobutanol (3 min Überkopfschüttler)
4. 5 min bei 3000 U/min und 4° C zentrifugieren (nur bei schlechter Phasentrennung)
5. 0,5 ml des Überstandes mit Pasteurpipette in Corex tubes überführen
6. Schritte 3.-5. zweimal wiederholen (2. und 3. Extraktion), wobei jeweils 1 ml des Überstandes überführt wird
7. Evaporation der gesammelten organischen Phasen (2,5 ml) unter Stickstoff im Trockentemperier-System bis zur Trockne

Leber- und Muskelproben

1. Brutschrank auf 56 ° C vorheizen
2. • 1 g - Proben mit Skalpell und Hakenpinzette homogenisieren und 3 ml Tris-Puffer hinzufügen
 - 5 g - Proben grob zerkleinern, in einen Stomacher-Beutel füllen, mit 8 ml Tris-Puffer versetzen und im Stomacher homogenisieren (2 min bei Einstellung „high“), danach den Beutel 2 mal mit je 2 ml Puffer ausspülen
3. 0,1 ml (0,5 ml) Proteaselösung hinzufügen
4. zur Hydrolyse Probe 2 h bei 56 ° C inkubieren
5. 10 min bei 3000 U/min und 4° C zentrifugieren
6. 2 ml (10 ml) des Überstands in Zentrifugenglas pipettieren
7. Überstand mit 2 ml (10 ml) n-Hexan reinigen, 30 Sek. mischen (Vortex)
8. Trennung der Phasen durch zentrifugieren (3 min bei 3000 U/min und 4 ° C)
9. n-Hexan mit Pasteurpipette abziehen und verwerfen
10. 1. Extraktion mit 4 ml (10 ml) *tert.* Butylmethylether (10 min Überkopfschüttler)
11. Trennung der Phasen durch Zentrifugation (3 min bei 3000 U/min und 4 ° C)
12. *tert.* Butylmethyletherphase überführen
13. für 2. Extraktion Schritte 10.-12. wiederholen, wobei die *tert.* Butylmethyletherphasen vereinigt werden
14. Evaporation der Etherphasen unter Stickstoff im Trockentemperier-System bis zur Trockne

Die getrockneten Extrakte sind in gut verschlossenem Zustand einige Tage bei 4° C lagerbar.

3.4.1.5 Probenscreening

Allgemeines

Zur Anwendung kam ein Clenbuterol-ELISA-Testkit der Firma Neogen[®] Corporation. Der Testkit wurde anhand definierter Qualitätskriterien aus neun kommerziell erhältlichen Clenbuterol-ELISA-Testkits ausgewählt, welche in einer Studie des EU-Referenzlabores für Tierarzneimittelrückstände im BgVV vergleichend geprüft worden waren (Hahnau & Jülicher, 1996).

Bei dem verwendeten ELISA-Testkit handelte es sich um einen kompetitiven ELISA. Die Quantifizierung des Analyten basiert auf der Konkurrenzreaktion zwischen enzymmarkiertem (Meerrettich-Peroxidase) und freiem Antigen (Analyt) um die Bindungsstelle am Antikörper, der an die Mikrotiterplatte gebunden ist. Überschüssige Antigene (Analyt und/oder enzymmarkiertes Antigen) werden ausgewaschen. Die Menge des gebundenen enzymmarkierten Antigens, die sich in der Intensität der sich anschließenden photometrisch messbaren Farbreaktion manifestiert, gibt Aufschluss über die Menge des an den Antikörper gebundenen freien Antigens (= Analyt).

Qualitätsparameter

In der den Versuchen vorgeschalteten o.g. Studie zeichnete sich der verwendete Testkit durch gute Qualitätseigenschaften aus (u.a. gute Inter- und Intraassayvariationen, geringe Störanfälligkeit sowie gute Handhabbarkeit). Die Standardlösungen waren nicht im Kit enthalten und mussten selbst hergestellt werden. Die gemessenen Probenwerte waren gut reproduzierbar. Die Intraassay- und Interassayvariationen lagen in der Größenordnung von jeweils 3 % und 10 %.

Der Test zeigte eine hohe Empfindlichkeit: Als untere Messbereichsgrenze wurde der B/B₀-80 % -Wert definiert, der zwischen 0,1 und 0,2 ng/ml Testansatz lag. Die obere Messbereichsgrenze wurde durch den B/B₀-20 % -Wert festgelegt, der in der Größenordnung von 1-1,5 ng/ml Testansatz lag. Der Messbereich umfasst somit etwa eine Dekade. Die Standardkurve zeigte in diesem Bereich einen nahezu linearen Verlauf mit einem Mittelwert (B/B₀-50 % -Wert) von ca. 0,4 ng/ml. Die B/B₀-80 % - und B/B₀-20 % -Werte wurden mittels Gerätesoftware für jede Standardkurve individuell ermittelt.

Kreuzreaktionen zeigte der verwendete Kit in der Studie bei 4 von 13 getesteten β_2 -Agonisten (Mabuterol 42,3 %, Clenpenterol 34,9 %, Mapenterol 32,7 % und Hydroxymethylclenbuterol 44,6 %), wobei Clenbuterol mit 100 % in die Berechnung einging. Natürliche, im Organismus vorkommende Phenylethanolamine, wie Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin,

Homovanillinsäure, Vanillinmandelsäure und 3-Methoxy-4-hydrophenylglycol (MOPEG) zeigten keine Kreuzreaktivitäten mit dem verwendeten Kit.

Durchführung des ELISAs

Die Durchführung des ELISAs erfolgte mit geringer Modifikation entsprechend der beiliegenden Beschreibung in folgenden Schritten:

1. Aufnahme des getrockneten Probenrückstandes in 500 µl Testkit-Puffer, 30 Sek. mischen (Vortex)
2. Herstellung der Clenbuterol-Standardlösungen (s. unter 3.4.1.1)
3. Verdünnung des Enzymkonjugates 1:180 (100 µl konzentriertes Enzymkonjugat mit 17,9 ml Testkit-Puffer mischen)
4. Belegung der Mikrotiterplatte (max. 96 Kavitäten), nach dem folgenden Schema in Duplikaten:

Anzahl der Kavitäten:

- | | |
|--|----|
| • 170 µl Testpuffer für die UB
(UB = unspezifische Bindung des Enzymkonjugates) | 2 |
| • 20 µl Testpuffer für B ₀
(B ₀ = vollständige Bindung des Enzymkonjugates in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen) | 2 |
| • 20 µl der Standardlösungen (s. oben Ziffer 2.) | 12 |
| • 20 µl von jeder Probe (maximal 40 in Doppelbestimmung) max. | 80 |
5. 150 µl des zuvor verdünnten Enzymkonjugates (s. oben Ziffer 3.) in jede Kavität mit Ausnahme der UB Kavitäten geben
 6. Platte mit Mikrotiter-Klebeband abdecken, 30 Sek. im Mikrotiterplatten-Schüttler schütteln und 60 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubieren
 7. inzwischen 20 ml des Waschpuffer-Konzentrates mit 180 ml H₂O verdünnen
 8. nach der Inkubation werden die Kavitäten der Platte durch Ausschlagen auf mit Filterpapier versehener weicher Unterlage möglichst vollständig entleert
 9. 250 µl Waschpuffer in jede Kavität geben, Platte 30 Sek. im Mikrotiterplatten-Schüttler schütteln und Kavitäten wie unter 12. beschrieben entleeren
 10. Schritt 9. zweimal wiederholen
 11. 150 µl gebrauchsfertige „K-Blue“-Lösung in jede Kavität geben und Platte 7-8 min mit Mikrotiter-Klebeband abgedeckt bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubieren lassen
 12. als Stopp-Lösung werden 50 µl 1 N HCl nach der Inkubation in jede Kavität gegeben, Platte 30 Sek. im Mikrotiterplatten-Schüttler schütteln

Messung

Die Mikrotiterplatten wurden sofort nach Zugabe der Stopp-Lösung und dem anschließenden Schütteln im Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen.

Auswertung

Die photometrischen Messdaten wurden von einem Computerprogramm (MikroWIN Version 2.12) übernommen, welches anhand der Berechnung einer mitgeführten Standardkurve die Konzentrationen der gemessenen Proben ermittelte. In Abbildung 8 ist exemplarisch eine Standardkurve des verwendeten Kits dargestellt. Außerdem ist der Variationskoeffizient zwischen den Duplikaten angegeben. Proben mit einem VK von >20 % wurden wiederholt gemessen, ebenso Proben, bei denen der VK der Parallelansätze über 15 % (Plasma, Leber, Muskel) bzw. 20 % (Urin) lag. Weiterhin wurden solche Proben wiederholt, deren Messwerte außerhalb des linearen Messbereiches der Standardkurve lagen (s. unter Qualitätsparameter), d.h. unter der berechneten B/B_0 -80 % - bzw. über der B/B_0 -20 % - Grenze. Die Proben, die unterhalb des Messbereiches lagen, wurden mit der unter 3.4.1.4 angegebenen größeren Matrixmenge erneut aufgearbeitet. Bei Proben, die oberhalb des Messbereiches lagen, erfolgte eine zweite Messung nach entsprechender Verdünnung.

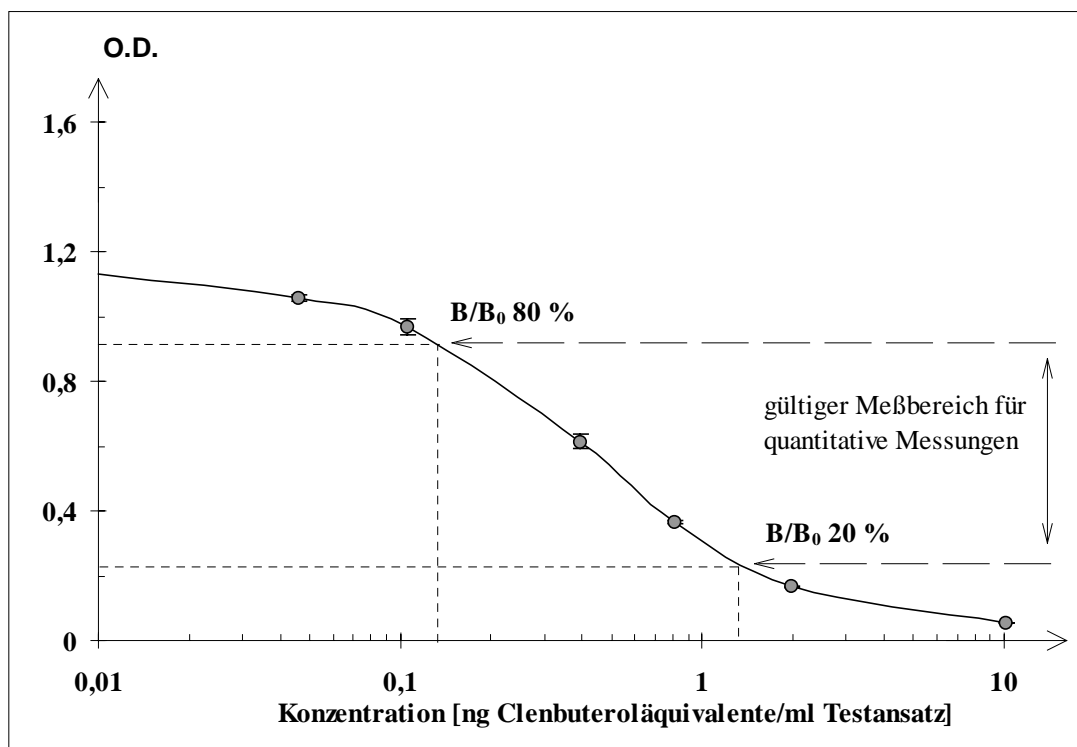


Abbildung 8 ELISA-Eichkurve (unter Verwendung des „Clenbuterol“-Testkits von

Biognost): B/B_0 -20 %: 1,308

B/B_0 -50 %: 0,429

B/B_0 -80 %: 0,136

Wiederfindung

Bei laborinternen Vorversuchen lagen die Wiederfindungen der mit Clenbuterol gespikten Urin-, Plasma-, Muskel- und Leberproben zwischen 80 % und 120 %.

Nachweisgrenze (NG)

Die Berechnung der Nachweisgrenze für die vorliegenden Analysenergebnisse erfolgte unter Berücksichtigung der Entscheidung 93/256/EWG vom 14. April 1993 nach einer Methode, die das Committee on Environmental Improvement in seinen „Guidlines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry“ (1980) beschrieben hat. Um den Einfluss der Matrix auf die Messwerte zu bestimmen, wurde unbelastete Kontrollmatrix analysiert. Die so erhaltenen Probenleerwerte (Blankwerte) gingen in die Berechnung der NG ein, die nach folgender Formel ermittelt wurde:

$$NG = MW_{BI} + 3\sigma_{BI}$$

MW_{BI} = Mittelwerte der gemessenen Blankwerte

σ_{BI} = Standardabweichung der gemessenen Blankwerte

Ein Analysenwert (S_t) musste daher folgende Bedingung erfüllen, um als nachgewiesen zu galten:

$$S_t \geq NG$$

Die ermittelten Werte für die NG gelten speziell für die Arbeits- und Gerätebedingungen, mit denen diese Ergebnisse erzielt wurden und haben keine Allgemeingültigkeit.

Da es sich bei dem ELISA um eine halbquantitative Methode handelt, wurde eine Bestimmungsgrenze nicht ermittelt.

Probenleerwerte

* *Versuche zum Rückstandsverhalten von Clenbuterol*

Zur Bestimmung der Probenleerwerte standen Proben von Kontrolltieren sowie von Tieren vor Behandlungsbeginn zur Verfügung. Insgesamt wurden 72 Plasmaproben von 26 Tieren, 59 Leberproben von 10 Tieren und 39 Muskelproben von 6 Tieren untersucht.

* *Versuche zur Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Clenbuterol*

An jedem Versuchstag wurde von jedem Tier vor Behandlungsbeginn eine Plasma- und, wenn möglich, eine Urinprobe entnommen. Die Analyse der Proben erfolgte mittels ELISA zusammen mit den anderen während des Versuches entnommenen Proben. Die so erhaltenen Probenleerwerte wurden, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, vor Berechnung der pharmakokinetischen Parameter abgezogen. Dabei wurde der von einem Tier an einem Versuchstag erhaltene Probenleerwert von jedem weiteren an dem Versuchstag von diesem Tier erhaltenen Probenwert abgezogen.

3.4.2 Analysen mittels GC-MS

Nach Vorbereitung der Proben (Präparation der Retina und Uvea sowie Teilung der Nieren in Cortex und Medulla, s. 3.3.2.3), führte das GC-MS Labor des Fachgebietes Rückstandskontrolle, Referenzlabor im BgVV die Untersuchungen mittels Massenspektrometrie durch.

3.4.2.1 Material/Chemikalien/Lösungen

Material:	- GC- Säule „DB-5ms“	J & W Scientific Incorporated
	Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0,25 mm,	Folsom, USA
	Film: Methylsilikon mit 5 % Phenyl, 0,25 µm	
	bzw. 0,1 µm dick	
	- Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, D
	- Stomacher-Beutel	Seward Medical, London, UK
Chemikalien:	Alle aufgeführten Chemikalien wurden in der höchsten Reinheitsstufe von den folgenden Firmen bezogen:	
	- aqua dest.	deionisiert, BgVV, Berlin, D
	- Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, D
	- Clenbuterol-Hydrochlorid (N-AB 365CL)	Boehringer, Ingelheim, D
	- d ₆ -Clenbuterol	RIVM, Bilthoven, NL
	- Ethylacetat	Merck, Darmstadt, D
	- Helium (99,999 %)	Linde, Berlin, D
	- konzentrierte Salzsäure (37 %)	Merck, Darmstadt, D
	- Methylboronsäure (MBA 97 %)	Sigma, Deisenhofen, D
	- Molekularsieb, 0,3 nm	Merck, Darmstadt, D
	- NaOH	Merck, Darmstadt, D
	- n-Hexan	Merck, Darmstadt, D
	- Protease Typ XIV (Katalog-Nr. P 5147)	Sigma, Deisenhofen, D
	- Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, D
	- Stickstoff (99,999 %)	Linde, Berlin, D
	- tert. Butylmethylether	Merck, Darmstadt, D
	- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Lösungen:	- d ₆ -Clenbuterol-Standardlösungen	d ₆ -Clenbuterol in Ethanol
	- Schwefelsäure	0,2 M in aqua dest.
	- Methylboronsäurelösung (MBA-Lösung)	1 mg/ml Methylboronsäure wird in getrocknetem

- Proteaselösung	Ethylacetat (Molekularsieb, 0,3 nm) gelöst 50 mg/ml Protease in aqua dest. gelöst
- Salzsäure	1 M in aqua. dest.
- Tris-Puffer (Hydrolysepuffer)	0,2 M Tris; 0,1 M CaCl ₂ x 2 H ₂ O in aqua dest., mit 1 M HCl auf pH 8,0 einstellen (Kontrolle mittels pH-Meter)

3.4.2.2 Geräte

- Gaschromatograph mit Massenspektrometer und automatischem Probengeber „HP 6890“ und Gaschromatograph „HP 5890 II“ mit Massenspektrometer „HP 5972“ und automatischem Probengeber „HP 7673“	Hewlett Packard, Palo Alto, USA
- pH-Meter „pH 325“	WTW, Weilheim, D
- Speed Vac Concentrator	Savant, USA
- Stomacher 80/Laboratory Blender	Seward Medical, London, UK
- TCS-Trockentemperier-System „Vapotherm FN 185/253“	Labor Technik Barkey, Bielefeld, D
- Trockenschrank „UE 400“	Memmert, Schwabach, D
- Ultraschallbad „Super RK 103“	Bandelin Electronic, Berlin, D
- Vortex	Heidolph, Kelheim, D
- Zentrifuge „Sorval Super T 21“	Du Pont de Nemours, Bad Homburg, D

3.4.2.3 Geräte-Software

Steuerung und Erfassung der Daten erfolgten durch die MS ChemStation (MS-DOS und MS-Windows) HP Vectra 486/66U bzw. HP Vectra VL2 4/50 von Hewlett Packard, Palo Alto, USA.

3.4.2.4 Probenvorbereitung

Vor der Bearbeitung wurde allen Proben ein interner Standard (d₆-Clenbuterol) in der Größenordnung des zu erwartenden Wertes des Analyten zugesetzt. Alle Proben wurden mindestens doppelt aufgearbeitet. Die Anzahl der Bestimmungen je Probe sind der Tabelle II im Anhang zu entnehmen.

Die Extraktion der Proben von Leber, Muskel, Retina/Uvea erfolgte nach einer modifizierten Methode von Blanchflower et al. (1993). Zusätzlich kam die Methode auch bei der Aufbereitung von Niere, Plasma und Galle zur Anwendung.

Folgende Änderungen wurden vorgenommen: Die Extraktion erfolgte mit *tert.* Butylmethylether statt mit Diethylether. Das zur Aufreinigung verwendete Natriumdihydrogenphosphat wurde durch 0,2 M Schwefelsäure ersetzt. Zusätzlich ist ein Entfettungsschritt mit 3 ml Hexan für die Aufarbeitung von Leber, Muskel und Niere nach dem Reinigungsschritt eingeführt worden.

3.4.2.5 Derivatisierung

Der trockene Probenextrakt wurde mit 100 µl der MBA-Lösung versetzt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur derivatisiert. 2 µl bzw. 1 µl (splitless) des derivatisierten Probenextraktes wurde in das GC-MS System injiziert.

3.4.2.6 GC-MS Messung

Die Messung erfolgte mit einem der beiden genannten Gaschromatographen und genannter Säule. Die Trennung auf der Kapillarsäule erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm: Anfangstemperatur 120° C für 0,1 Minute, dann Anstieg mit 15° C/min bis 300° C, die 5 min lang gehalten wurde. Die Injektortemperatur betrug 280° C. Als Trägergas diente Helium mit einer Durchflussrate von 1 ml/min. Die MBA-Derivate des Clenbuterols wurden mit vier Diagnose-Ionen (i.d.R.: m/z 243, 245, 285, 300) und der interne Standard (d₆-Clenbuterol) mit einem Diagnose-Ion (m/z 246) gemessen.

3.4.2.7 Auswertung

Identifizierung von Clenbuterol

Für die Auswertung mussten mindestens Signale von drei Diagnose-Ionen vorhanden sein. Das Spektrum von Clenbuterol-MBA zeigt die Abbildung 9.

Die Identifizierung des Analyten erfolgte in Anlehnung an die Entscheidung 93/256/EWG vom 14. April 1993. Berücksichtigt wurde das Verhältnis der vorhandenen Signale der Diagnose-Ionen zueinander. Weiterhin wurde die relative Retentionszeit zwischen Clenbuterol und dem internen Standard (d₆-Clenbuterol) überprüft.

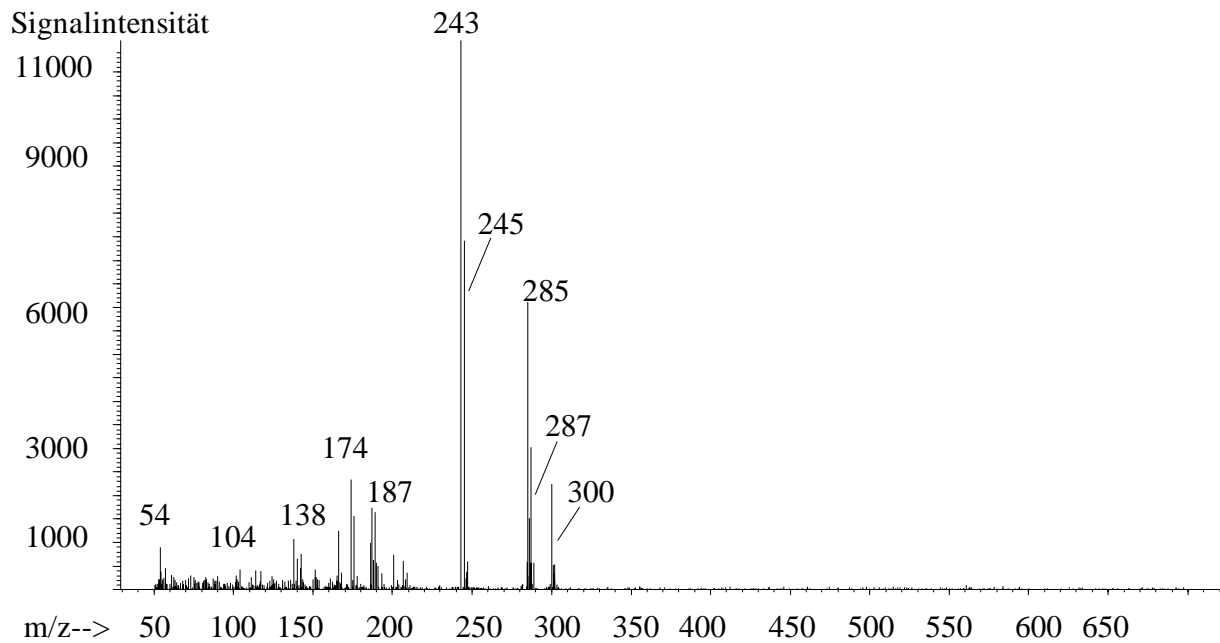


Abbildung 9 EI-Massenspektrum eines Clenbuterol-MBA-Standards

Quantifizierung von Clenbuterol

Die Quantifizierung erfolgte über die Integration der Peakflächen. Zur Berechnung des Clenbuterolgehaltes wurde der Quotient aus der Fläche des jeweils intensivsten Signals (m/z 243) und der Fläche des Signals vom internen Standard d_6 -Clenbuterol (m/z 246) gebildet. Mittels einer aus 10 Standardkonzentrationen resultierenden Standardkurve, welche für jede Messreihe erstellt wurde, konnte der Clenbuterolgehalt ermittelt werden.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Das intensivste Diagnose-Ion (m/z 243) diente zur Festlegung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze, wobei für die NG ein Signal/Rauschverhältnis von 3:1 und für die BG ein Signal/Rauschverhältnis von 10:1 der Berechnung zugrunde lag (ACS Committee on Environmental Improvement 1980). Da die Messwerte von der Leistungsfähigkeit des Gerätes abhängig waren, konnten NG und BG von Messreihe zu Messreihe verschieden sein, so dass beide für jede Messreihe neu ermittelt wurden.

Beispiele für ein typisches Gaschromatogramm einer clenbuterolhaltigen und einer clenbuterolfreien Leberprobe vor Trennung der einzelnen Ionenspuren zeigen die Abbildungen 10 und 11. In Abbildung 12 ist die Aufspaltung der Totalionenspur aus Abbildung 11 in die für die Identifizierung und Quantifizierung verwendeten Einzelionenspuren dargestellt.

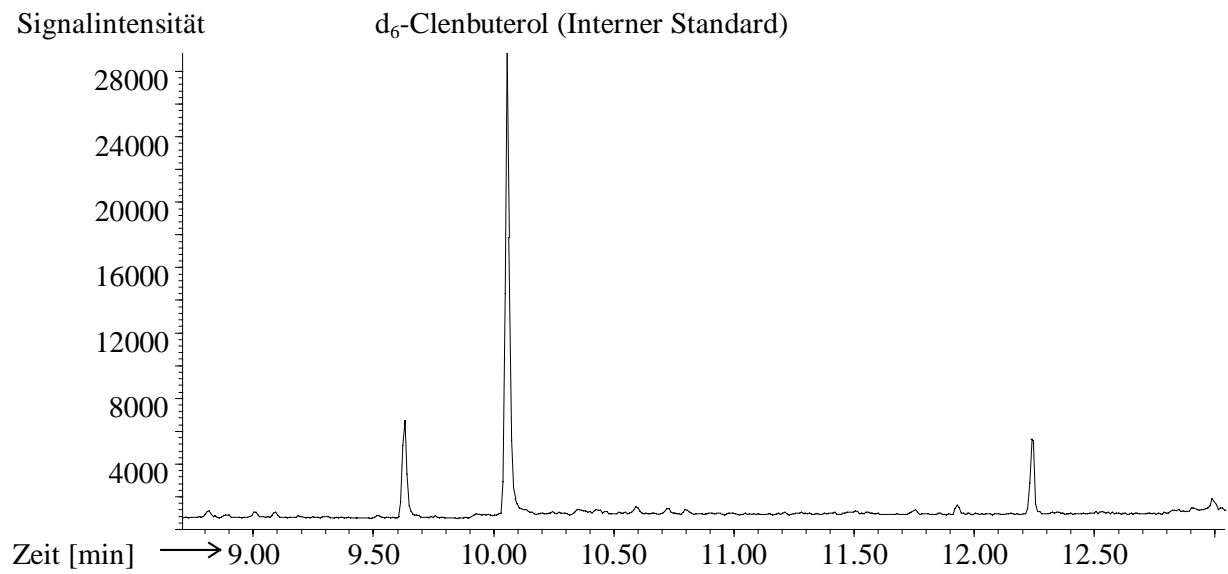


Abbildung 10 Totalionenchromatogramm einer clenbuterolfreien Leberprobe, der 10 µg/kg d₆-Clenbuterol als Interner Standard zugegeben wurden

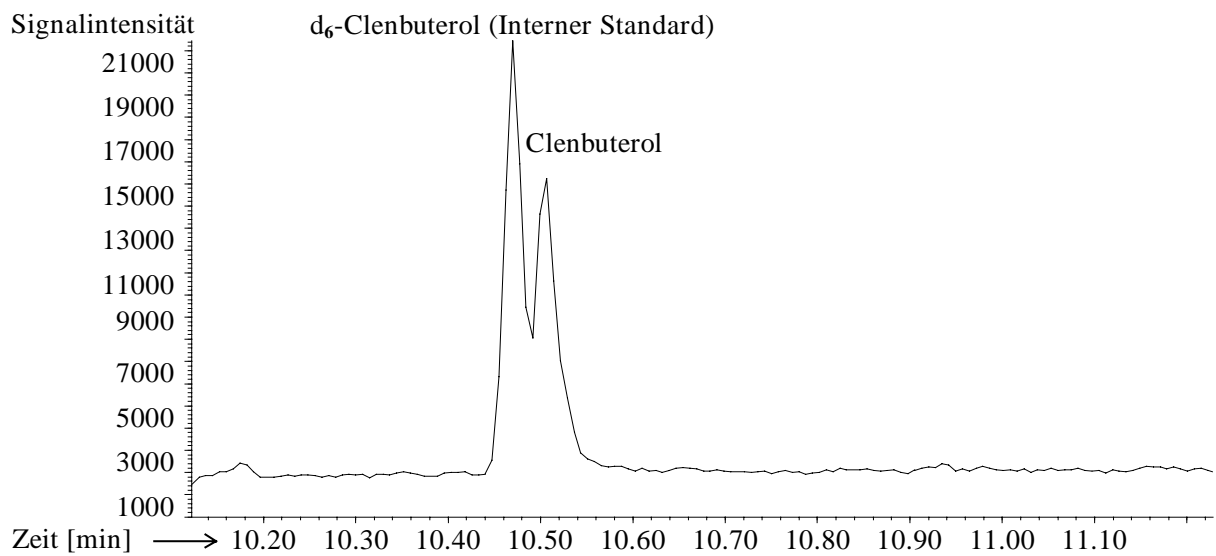


Abbildung 11 Totalionenchromatogramm einer Leberprobe, welche 0,6 µg/kg Clenbuterol und 1 µg/kg d₆-Clenbuterol als Internen Standard enthält

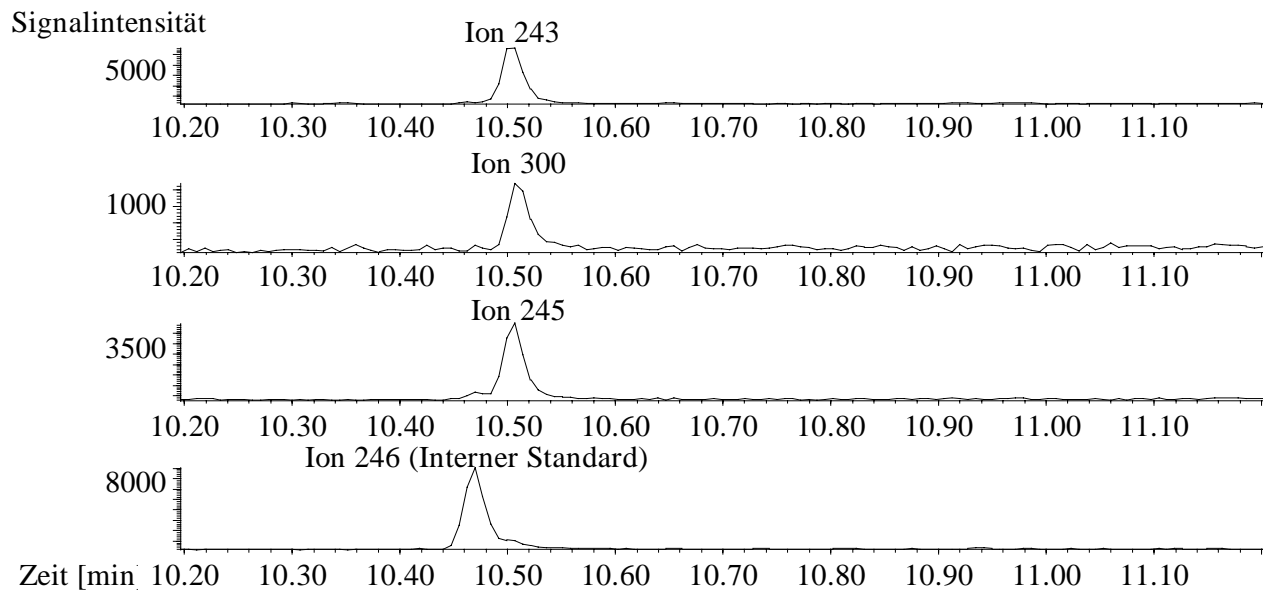


Abbildung 12 Einzelchromatogramme (Ionenspuren) der bereits in Abbildung 11 beschriebenen Leberprobe, welche 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Clenbuterol und 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d_6 -Clenbuterol als Internen Standard enthielt

3.4.3 Statistik

Die Verarbeitung der Rohdaten sowie deren statistische und pharmakokinetische Auswertung erfolgte über einen Personal Computer unter Verwendung des Programms Microsoft Excel für Windows 95, Version 7.0 (1995). Die Berechnung von arithmetischen Mittelwerten, Medianwerten und Standardabweichungen von Werten mit Normalverteilung erfolgte anhand der programmintern angebotenen Formeln. Das Prognoseintervall wurde anhand der Formel von Sachs (1992) berechnet.

3.4.4 Ermittlung pharmakokinetischer Parameter

Der Verlauf der Plasmakonzentration folgte nach der intravenösen Behandlung einem offenen Zwei-Kompartiment-Modell. Für die Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter wurden daraufhin folgende Gleichungen verwendet:

$$C_p(0) = A + B$$

$$A' = \frac{A}{C_p(0)}$$

$$B' = \frac{B}{C_p(0)}$$

$$\alpha = \frac{\ln C_{p1} - \ln C_{p2}}{t_2 - t_1}$$

$$\beta = \frac{\ln C_{p1} - \ln C_{p2}}{t_2 - t_1}$$

$$k_{el} = \frac{\beta \cdot \alpha}{k_{21}}$$

$$t_{1/2 \alpha} = \frac{\ln 2}{\alpha}$$

$$t_{1/2 \beta} = \frac{\ln 2}{\beta}$$

$$k_{21} = A' \cdot \beta + B' \cdot \alpha$$

$$k_{12} = \frac{A' \cdot B' (\beta - \alpha)^2}{k_{21}}$$

$$V_1 = \frac{D}{C_p(0)}$$

$$V_2 = \frac{k_{12}}{k_{21}} \cdot V_1$$

$$V_{dss} = \frac{k_{12} + k_{21}}{k_{21}} \cdot V_1$$

$$Cl_{tot} = k_{el} \cdot V_1$$

$$AUC = \int_0^{\infty} C_p(t) dt$$

$$AUMC = \int_0^{\infty} t \cdot C_p(t) dt$$

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

Erläuterung und Maßeinheiten der verwendeten pharmakokinetischen Symbole:

Symbol	Maßeinheit	Erläuterung
$C_p(0)$	ng/ml	fiktive Anfangsplasmakonzentration
A, B	ng/ml	Ordinatenschnittpunkt der Dispositionsfunktion der Verteilungsphase bzw. der Eliminationsphase (ergibt die Anfangskonzentration der jeweiligen Phase)
A', B'	ng/ml	Hilfsgrößen
α	h^{-1}	Geschwindigkeitskonstante für die Verteilungsphase
β	h^{-1}	Geschwindigkeitskonstante für die Eliminationsphase
k_{el}	h^{-1}	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante aus dem zentralen Kompartiment
$t_{1/2\alpha}$	h	Halbwertszeit der Verteilungsphase
$t_{1/2\beta}$	h	Halbwertszeit der Eliminationsphase
k_{21}	h^{-1}	Geschwindigkeitskonstante für den Transfer vom peripheren in das zentrale Kompartiment
k_{12}	h^{-1}	Geschwindigkeitskonstante für den Transfer vom zentralen in das periphere Kompartiment
D	$\mu g/kg$	Dosis
V_1	l/kg	Verteilungsvolumen des zentralen Kompartiments
V_2	l/kg	Verteilungsvolumen des peripheren Kompartiments
V_{dss}	l/kg	gesamtes Verteilungsvolumen im Fließgleichgewicht (Steady state)
Cl_{tot}	$l/kg \cdot h^{-1}$	totale Clearance (Gesamtkörperclearance)
AUC	$ng/ml \cdot h$	Gesamtfläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve
AUMC	$ng/ml \cdot h^2$	Fläche unter der Momentkurve
MRT	h	mittlere Verweilzeit

Nach oraler Gabe folgte die Plasmakonzentrationskurve einem offenen Ein-Kompartiment-Modell. Die Parameter wurden nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$K_a = \frac{\ln C_{p1} - \ln C_{p2}}{t_2 - t_1} \quad K_{el} = \frac{\ln C_{p1} - \ln C_{p2}}{t_2 - t_1}$$

$$V_d = \frac{D}{C_p(0)}$$

$$\Delta' = \frac{V_d}{\text{kg KG}}$$

$$Cl_{tot} = K_{el} \cdot V_d$$

$$t_{1/2\text{ abs}} = \frac{\ln 2}{K_a} \quad t_{1/2\text{ el}} = \frac{\ln 2}{K_{el}}$$

Erläuterung und Maßeinheiten der verwendeten pharmakokinetischen Symbole:

Symbol	Maßeinheit	Erläuterung
K_a	h^{-1}	Absorptionsgeschwindigkeitskonstante
K_{el}	h^{-1}	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
V_d	l/kg	Verteilungsvolumen
Δ'	l/kg	Distributionskoeffizient
Cl_{tot}	$l/kg \cdot h^{-1}$	totale Clearance (Gesamtkörperclearance)
$t_{1/2\text{ abs}}$	h	Absorptionshalbwertszeit
$t_{1/2\text{ el}}$	h	Eliminationshalbwertszeit

Die Gleichungen und Erläuterungen für die Parameter AUC, AUMC, MRT und V_{ss} entsprechen denen, die bereits für die Berechnung der Parameter des Zwei-Kompartiment-Modells verwendet wurden.

Ermittlung der Halbwertszeiten von Clenbuterol in verschiedenen Matrices

Zur Ermittlung der Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von Retina, Leber, Niere, Galle, Muskel und Plasma (Versuche unter 4.3) wurden die linearen Regressionsgeraden einbezogen, um die Streuung der Einzelmesswerte zu berücksichtigen (Pfeifer et al., 1995), und deren Steigung (b) berechnet. Folgende Gleichungen wurden verwendet:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{b} \quad \text{und} \quad b = \frac{n \sum xy - (\sum x) \cdot (\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$