

4 ERGEBNISSE

4.1 *NACHWEIS- UND BESTIMMUNGSGRENZEN DER VERWENDETEN METHODEN*

4.1.1 ELISA

Tabelle 13 zeigt die Mittelwerte von Probenleerwerten, die durch Messung unbelasteter Kontrollmatrices erhalten wurden, sowie deren Standardabweichung, Variationskoeffizient und die daraus errechnete Nachweisgrenze des für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten ELISAs.

Tabelle 13 Ergebnisse der Untersuchung unbelasteter Kontrollmatrices und Berechnung der Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs

	Leber	Muskel	Plasma	Urin
Probenzahl	59	39	72	21
MW	0,024 ng/g	0,014 ng/g	0,01 ng/ml	0,403 ng/ml
SD	0,03 ng/g	0,02 ng/g	0,01 ng/ml	0,22 ng/ml
VK (%)	124	133	146	55
NG (MW +3 x SD)	0,11 ng/g	0,07 ng/g	0,05 ng/ml	1,07 ng/ml

In den Ergebnisdarstellungen wurden alle messbaren Analysenwerte einbezogen und die NG für die jeweilige Matrix eingezeichnet. Die späteren Berechnungen erfolgten nur mit Analyseergebnissen, die über oder auf der Nachweisgrenze lagen.

4.1.2 GC-MS

Für alle Berechnungen wurden nur eindeutig quantifizierte Messwerte (\geq BG) herangezogen, d.h. Werte mit einem Signal/ Rauschverhältnis von $\geq 10:1$.

In den Abbildungen unter 4.2.2.2 und in Tabelle II im Anhang werden neben diesen Werten zusätzlich auch die Werte dargestellt, welche in dem Bereich unterhalb der BG und oberhalb der NG (Signal/ Rauschverhältnis von $< 10:1$ und $> 3:1$) lagen. Dieser in den Abbildungen gekennzeichnete Bereich liegt für Leber, Muskel und Niere zwischen 0,03-0,5 ng/g, für Galle zwischen 0,1-0,3 ng/ml und für Retina/Uvea zwischen 3-10 ng/g. Bei Retina/Uvea ist dieser Bereich damit relativ hoch. Dies ist auf die geringe Matrixmenge je Probe ($\frac{1}{10}$ der Retina/Uvea, d.h. im Mittel 0,17 g) zurückzuführen, die für die Aufarbeitung zur Quantifizierung mittels GC-MS zur Verfügung stand.

4.2 PHARMAKOKINETIK UND BIOVERFÜGBARKEIT VON CLENBUTEROL

Für die Berechnung pharmakokinetischer Parameter wurden ELISA-Ergebnisse nach Abzug der Probenleerwerte verwendet (s. auch 3.4.1.5).

4.2.1 t_{\max} und C_{\max}

In Tabelle 14 sind die gemessenen t_{\max} -Werte und in Tabelle 15 die C_{\max} -Werte für verschiedene oral verabreichte Dosen aufgeführt. Über eine Dosisabhängigkeit kann aufgrund der Variabilität zwischen den Tieren keine Aussage getroffen werden. Die maximale Plasmakonzentration wurde nach 1,5 bis 7 Stunden und im Mittel nach 3,8 Stunden erreicht. Daher erfolgte bei den Versuchen zum Rückstandsverhalten von Clenbuterol (s. unter 4.3) ab dem 3. Versuchsabschnitt die zweite Blutprobenentnahme am Tag 4 Stunden nach der Behandlung am Morgen.

Tabelle 14 Darstellung der gemessenen t_{\max} [h]-Werte aller Tiere und aller Dosen nach oraler Applikation

Dosis $\mu\text{g/kg KG}$	Kalb OM						MW	Gesamt		
	22	23	27	31	32	33		MW	SD	ME
2,5	4,0	Dosis fehlt	1,5	3,5	5,0	4,5	3,7			
5	3,5	4,0	1,5	2,0	2,0	6,0	3,2	3,9	1,64	3,8
10	7,0	Dosis fehlt	3,5	3,5	5,5	5,5	5,0			

Tabelle 15 Darstellung der gemessenen C_{\max} [ng/ml]-Werte aller Tiere und aller Dosen nach oraler Applikation

Dosis $\mu\text{g/kg KG}$	Kalb OM						MW	SD	ME
	22	23	27	31	32	33			
2,5	0,3	Dosis fehlt	0,4	0,2	1,7	0,5	0,6	0,60	0,4
5	0,3	0,8	0,7	0,4	0,2	1,1	0,6	0,35	0,5
10	1,1	Dosis fehlt	0,4	1,0	4,1	1,4	1,6	1,44	1,1

4.2.2 Ermittlung der Auswaschzeiten

Da Clenbuterol einem Tier wiederholt verabreicht wurde, die pharmakokinetischen Parameter aber im Sinne der Verabreichung einer „Einzeldosierung“ berechnet werden sollten, war es zur Vermeidung von Kumulationseffekten notwendig, zwischen den Versuchsabschnitten ausreichend Zeit einzuplanen. Daher wurden nach den ersten beiden Versuchsabschnitten von den Tieren, die eine hohe Dosis erhielten, zusätzliche Proben auch 48 und 72 Stunden nach der Dosisgabe entnommen und sofort untersucht. Nach 72 Stunden lagen alle gemessenen Werte im Bereich der bereits vorher ermittelten Probenleerwerte. Nach Pfeifer et al. (1995) sollte die Auswaschphase zwischen den Versuchen an gleichen Individuen mindestens den fünffachen Wert von MRT betragen, da in diesem Intervall $> 97\%$ des Arzneistoffes der vorhergehenden Applikation eliminiert werde. Koch & Ritschel (1986) sprechen von einer ausreichend langen Auswaschperiode zwischen den Applikationen von ca. 10 Eliminationshalbwertszeiten. Tabelle 16 vergleicht die theoretisch berechneten Auswaschzeiten anhand der Formeln von Pfeifer et al. (1995) und von Koch & Ritschel (1986) mit den tatsächlich eingehaltenen Wartezeiten zwischen den Versuchsabschnitten. Außerdem sind die vor jedem Versuchsabschnitt entnommenen „Kontrollwerte“ dargestellt. In den meisten Fällen war die tatsächliche Wartezeit erheblich länger als die theoretisch berechneten Auswaschzeiten. Nach beiden Formeln übereinstimmend wäre in einem Fall die Zeit zwischen den Versuchen erheblich zu kurz und in einem Fall geringfügig zu kurz gewählt worden. Da aber die Analysenwerte der vor dem nächsten Versuchsabschnitt entnommenen Kontrollproben im Bereich der Analysenwerte aller anderen Proben mit ausreichender Auswaschzeit lagen, wurden auch diese Ergebnisse bei den weiteren Berechnungen der pharmakokinetischen Parameter berücksichtigt.

Tabelle 16 Vergleich der theoretisch berechneten Auswaschphase mit den tatsächlich eingehaltenen Wartezeiten zwischen den einzelnen Versuchsabschnitten

Kalb OM	Versuchs- abschnitt	Dosis [µg/kg KG]	Auswaschphase			Werte der Kontroll-proben [ng/ml Plasma]
			5 x MRT [h]*	10 x Eliminations- halbwertszeit [h]**	tatsächliche Wartezeit [h]	
22	1	1 i.v.				0,06
	2	2,5 p.o.	11	20	96	0,07
	3	2 i.v.	55	61	96	0,05
	4	5 p.o.	24	43	120	0,06
	5	10 p.o.	78	105	72	0,09
	6	3 i.v.	114	141	120	0,07
23	1	2 i.v.				0,13
	2	3 i.v.	13	24	192	0,09
	3	5 p.o.	18	28	72	0,05
27	1	3 i.v.				0,04
	2	10 p.o.	54	64	96	0,29
	3	1 i.v.	39	35	96	0,03
	4	2,5 p.o.	14	22	120	0,05
	5	5 p.o.	37	47	72	0,06
	6	2 i.v.	77	110	120	0,12
31	1	1 i.v.				0,03
	2	2,5 p.o.	12	17	120	0,07
	3	2 i.v.	30	34	216	0,06
	4	5 p.o.	17	25	96	0,02
	5	10 p.o.	147	195	72	0,10
	6	3 i.v.	60	80	168	0,04
32	1	2 i.v.				0,07
	2	5 p.o.	21	32	120	0,06
	3	3 i.v.	54	71	216	0,10
	4	2,5 p.o.	37	69	96	0,14
	5	10 p.o.	70	88	120	0,10
33	1	3 i.v.				0,06
	2	10 p.o.	27	41	120	0,13
	3	1 i.v.	77	102	216	0,04
	4	2,5 p.o.	35	58	96	0,08
	5	5 p.o.	54	64	72	0,08
	6	2 i.v.	65	52	168	0,03

* nach Pfeifer et al. (1995)
 ** nach Koch & Ritschel (1986)

4.2.3 Intravenöse Applikation

Die pharmakokinetischen Parameter nach einmaliger intravenöser Applikation von 1, 2 und 3 µg Clenbuterol pro kg KG sind in den Tabellen 17-19 aufgeführt. Berechnet wurden die Parameter für jedes einzelne Tier sowie die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten aller Tiere zusammen. Die Plasmaspiegelkurven sind anhand der Einzelwerte jedes Tieres und für jede Dosis in den Abbildungen 13-15 in einem halblogarithmischen Koordinatensystem dargestellt.

Die Plasmaspiegelkurve zeigte nach intravenöser Applikation bei allen Tieren einen biexponentiellen Verlauf, der einem offenen Zwei-Kompartiment-Modell folgte. Entsprechend wurden die pharmakokinetischen Parameter berechnet. Bis auf zwei Ausnahmen lag die Verteilungsphase innerhalb der ersten Stunde mit Halbwertszeiten im Mittel zwischen 20 und 35 Minuten. Die terminale Halbwertszeit lag im Mittel zwischen 2,9 und 5 Stunden. Signifikante Dosisabhängigkeiten konnten nicht ermittelt werden.

Table 17 **Pharmakokinetische Parameter von Clenbuterol nach einmaliger intravenöser Dosis von 1 µg/kg**

Parameter	Kalb (OM)						MW	SD	ME	VK [%]
	22	23	27	31	32	33				
A ng/ml	0,16	Dosis	0,29	0,17	Dosis	0,29	0,23	0,074	0,23	33
B ng/ml	0,26	fehlt	0,20	0,16	fehlt	1,49	0,53	0,644	0,23	122
C _P (0) ng/ml	0,42		0,50	0,33		1,78	0,76	0,687	0,46	91
A' ng/ml	0,62		0,41	0,49		0,84	0,59	0,187	0,56	32
B' ng/ml	0,38		0,59	0,51		0,16	0,41	0,187	0,44	46
α h ⁻¹	3,92		0,74	3,35		5,40	3,35	1,943	3,63	58
β h ⁻¹	0,34		0,32	0,40		0,12	0,29	0,121	0,33	41
k _{el} h ⁻¹	0,78		0,41	0,70		0,66	0,64	0,159	0,68	25
t _{1/2α} h	0,18		0,93	0,21		0,13	0,36	0,383	0,19	106
t _{1/2β} h	2,04		2,18	1,75		5,80	2,94	1,916	2,11	65
k ₁₂ h ⁻¹	1,77		0,08	1,15		3,88	1,72	1,603	1,46	93
k ₂₁ h ⁻¹	1,70		0,57	1,89		0,97	1,28	0,618	1,34	48
V ₁ l/kg	2,38		2,01	3,06		0,56	2,00	1,055	2,20	53
V ₂ l/kg	2,49		0,27	1,86		2,24	1,72	0,998	2,05	58
V _{dss} l/kg	4,87		2,28	4,93		2,80	3,72	1,377	3,84	37
Cl _{tot} l/kg·h ⁻¹	1,87		0,83	2,15		0,37	1,31	0,840	1,35	64
AUC ng/ml·h	0,67		1,16	0,47		2,81	1,28	1,063	0,92	83
AUMC ng/ml·h ²	1,47		3,20	1,08		19,77	6,38	8,975	2,33	141
MRT h	2,18		2,79	2,31		7,03	3,58	2,315	2,55	65

Tabelle 18 Pharmakokinetische Parameter von Clenbuterol nach einmaliger intravenöser Dosis von 2 µg/kg

Parameter	Kalb (OM)						MW	SD	ME	VK [%]
	22	23	27	31	32	33				
A ng/ml	0,62	0,19	0,23	0,22	0,43	0,63	0,39	0,202	0,33	52
B ng/ml	0,51	0,62	3,02	0,28	0,84	1,22	1,08	1,000	0,73	92
C _P (0) ng/ml	1,13	0,81	3,25	0,50	1,27	1,85	1,47	0,984	1,20	67
A' ng/ml	0,45	0,77	0,93	0,56	0,66	0,66	0,67	0,164	0,66	24
B' ng/ml	0,55	0,23	0,07	0,44	0,34	0,34	0,33	0,164	0,34	50
α h ⁻¹	0,43	1,96	9,90	3,75	0,89	3,39	3,38	3,451	2,67	102
β h ⁻¹	0,16	0,29	0,26	0,27	0,22	0,13	0,22	0,064	0,24	29
k _{el} h ⁻¹	0,23	0,84	2,69	0,57	0,44	0,36	0,86	0,923	0,50	108
t _{½α} h	1,62	0,35	0,07	0,19	0,78	0,20	0,54	0,586	0,28	109
t _{½β} h	4,26	2,35	2,68	2,54	3,18	5,20	3,37	1,131	2,93	34
k ₁₂ h ⁻¹	0,06	0,72	6,51	1,66	0,23	1,92	1,85	2,405	1,19	130
k ₂₁ h ⁻¹	0,31	0,68	0,95	1,78	0,44	1,24	0,90	0,549	0,82	61
V ₁ l/kg	1,76	2,46	0,61	3,96	1,57	1,08	1,91	1,185	1,67	62
V ₂ l/kg	0,32	2,61	4,21	3,69	0,80	1,67	2,22	1,560	2,14	70
V _{dss} l/kg	2,09	5,07	4,82	7,65	2,37	2,76	4,13	2,140	3,79	52
Cl _{tot} l/kg·h ⁻¹	0,40	2,08	1,65	2,27	0,69	0,39	1,25	0,856	1,17	69
AUC ng/ml·h	5,49	0,93	1,44	0,88	1,97	5,07	2,63	2,098	1,70	80
AUMC ng/ml·h ²	26,30	2,34	4,10	3,01	8,17	26,64	11,76	11,57	6,14	98
MRT h	4,78	2,52	2,85	3,44	4,15	5,25	3,83	1,082	3,79	28

Tabelle 19 Pharmakokinetische Parameter von Clenbuterol nach einmaliger intravenöser Dosis von 3 µg/kg

Parameter	Kalb (OM)						MW	SD	ME	VK [%]
	22	23	27	31	32	33				
A ng/ml	0,94	0,94	0,12	0,41	0,76	0,99	0,69	0,350	0,85	51
B ng/ml	2,17	1,74	0,63	1,43	1,90	1,33	1,53	0,538	1,59	35
C _P (0) ng/ml	3,10	2,67	0,75	1,85	2,66	2,33	2,23	0,834	2,49	37
A' ng/ml	0,70	0,65	0,83	0,78	0,71	0,57	0,71	0,092	0,71	13
B' ng/ml	0,30	0,35	0,17	0,22	0,29	0,43	0,29	0,092	0,29	32
α h ⁻¹	2,72	3,23	1,19	0,92	1,34	2,78	2,03	0,987	2,03	49
β h ⁻¹	0,13	0,24	0,11	0,15	0,10	0,17	0,15	0,052	0,14	35
k _{el} h ⁻¹	0,39	0,61	0,45	0,43	0,30	0,37	0,42	0,106	0,41	25
t _{½α} h	0,26	0,21	0,58	0,75	0,52	0,25	0,43	0,221	0,39	51
t _{½β} h	5,38	2,85	6,36	4,67	6,87	4,06	5,03	1,490	5,03	30
k ₁₂ h ⁻¹	1,55	1,57	0,56	0,33	0,69	1,29	1,00	0,542	0,99	54
k ₂₁ h ⁻¹	0,91	1,29	0,29	0,32	0,45	1,29	0,76	0,466	0,68	61
V ₁ l/kg	0,97	1,12	3,98	1,62	1,13	1,29	1,69	1,147	1,21	68
V ₂ l/kg	1,65	1,37	7,72	1,64	1,71	1,30	2,57	2,533	1,65	99
V _{dss} l/kg	2,62	2,49	11,71	3,27	2,84	2,59	4,25	3,663	2,73	86
Cl _{tot} l/kg·h ⁻¹	0,37	0,68	1,79	0,69	0,34	0,48	0,72	0,543	0,58	75
AUC ng/ml·h	8,73	4,68	1,84	3,94	10,66	6,25	6,01	3,240	5,46	54
AUMC ng/ml·h ²	57,79	16,43	19,76	20,00	78,84	33,50	37,72	25,30	26,75	67
MRT h	6,62	3,51	10,73	5,07	7,40	5,37	6,45	2,487	6,00	39

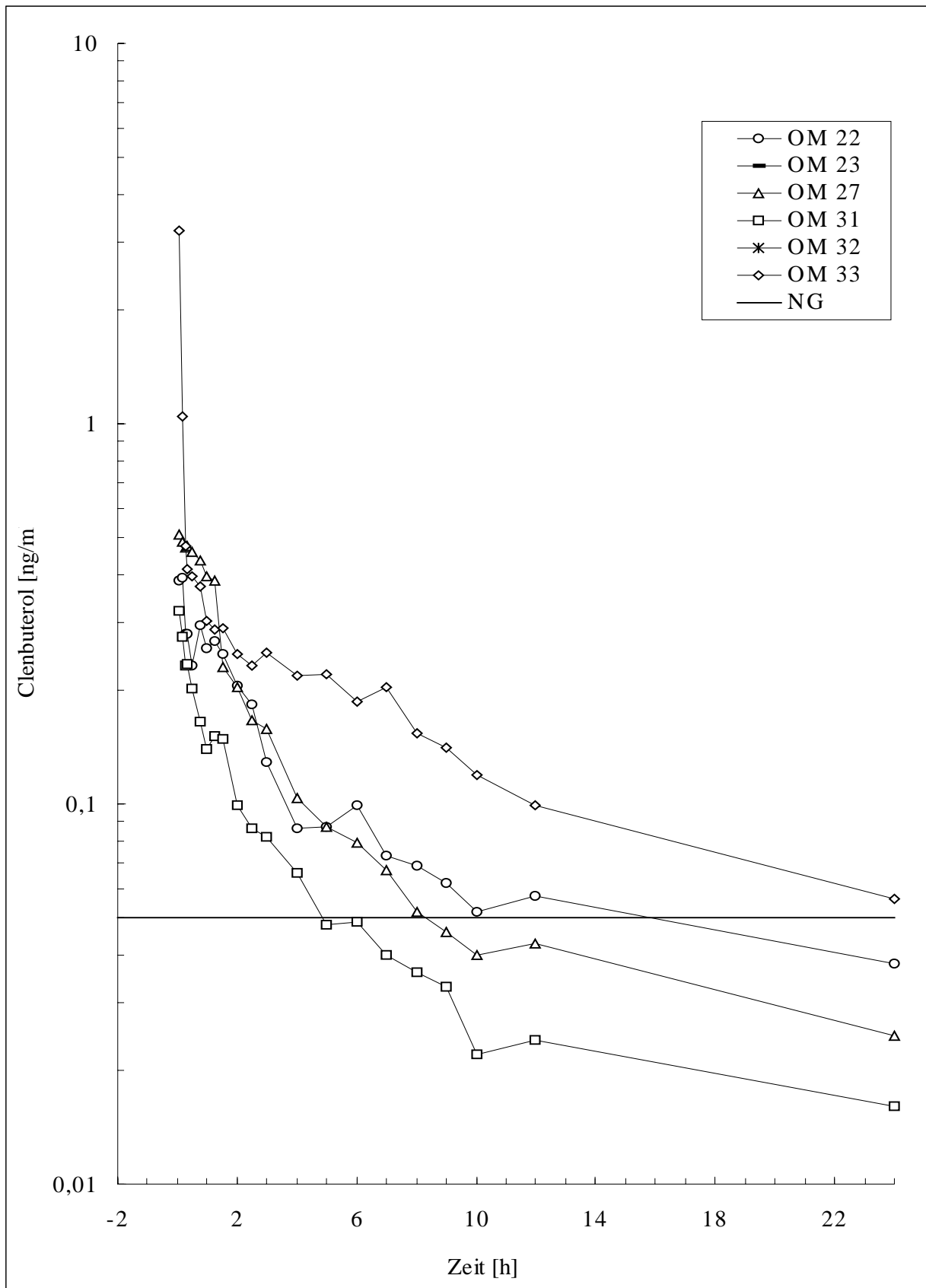


Abbildung 13 Plasmaspiegelkurven nach einmaliger intravenöser Applikation 1 µg Clenbuterol pro kg KG -Darstellung der Einzelwerte (ELISA-Ergebnisse)

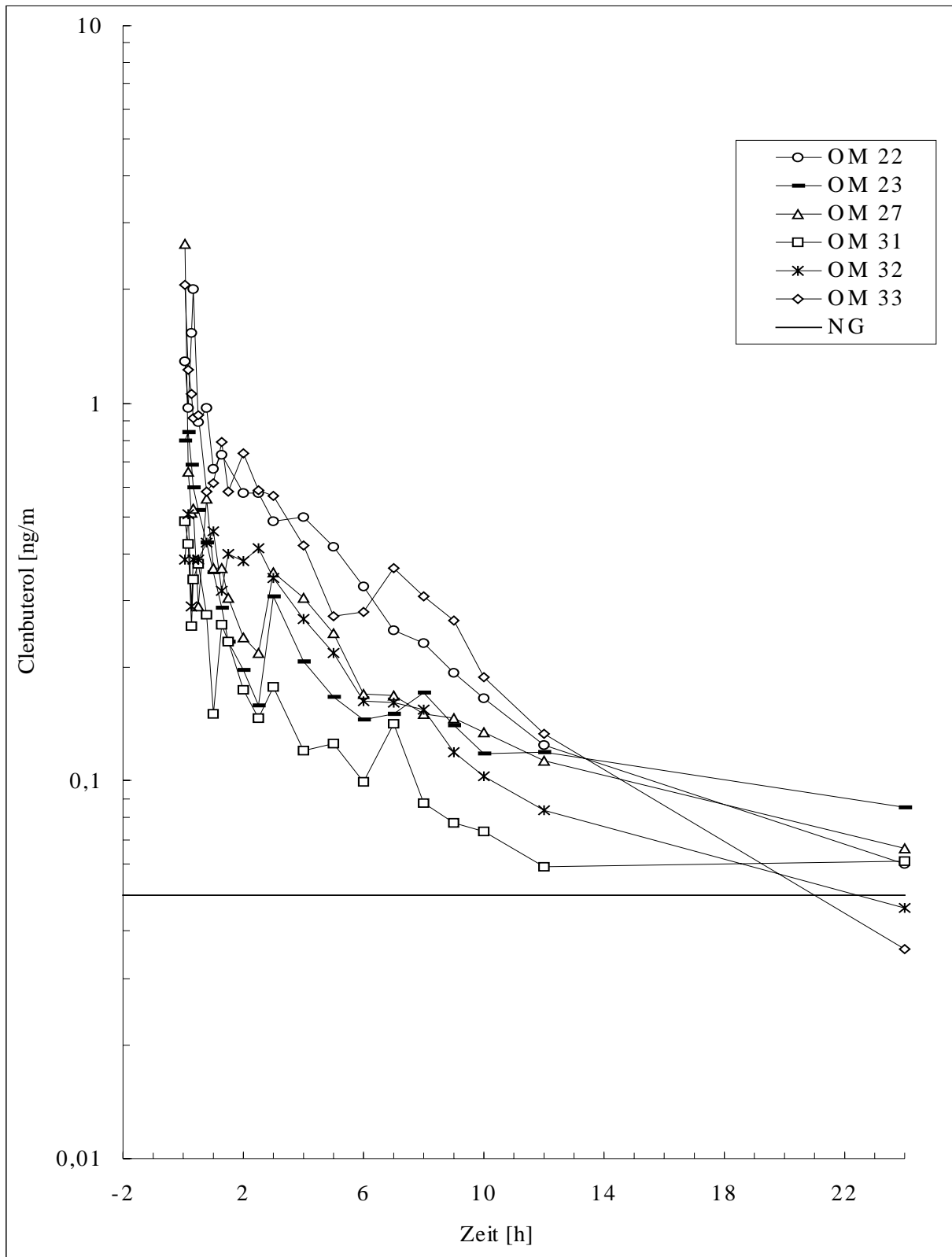


Abbildung 14 Plasmaspiegelkurven nach einmaliger intravenöser Applikation 2 µg Clenbuterol pro kg KG -Darstellung der Einzelwerte (ELISA-Ergebnisse)

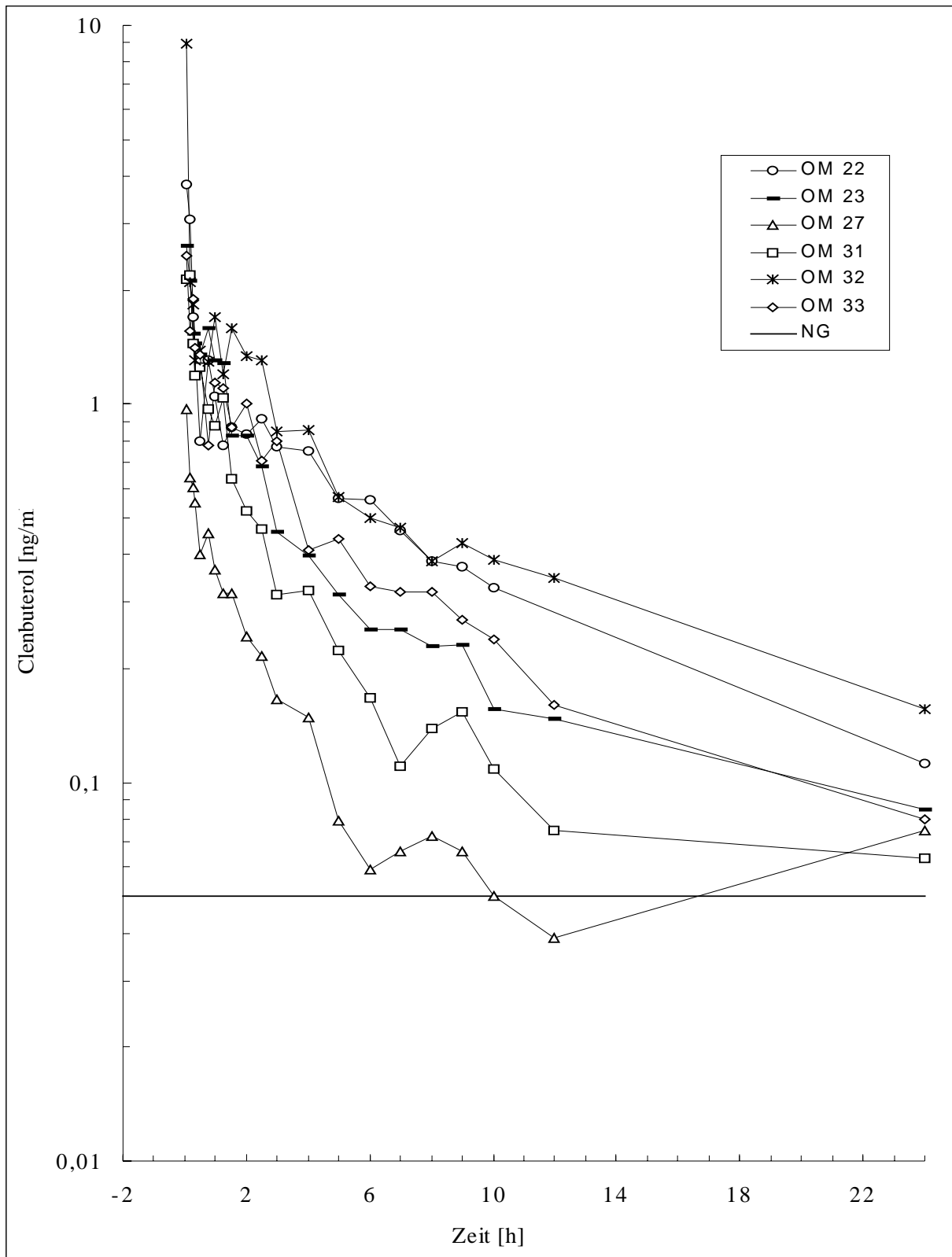


Abbildung 15 Plasmaspiegelkurven nach einmaliger intravenöser Applikation 3 µg Clenbuterol pro kg KG -Darstellung der Einzelwerte (ELISA-Ergebnisse)

4.2.4 Orale Applikation

Die Konzentrationswerte von Clenbuterol im Plasma nach einmaliger oraler Applikation von 2,5, 5 und 10 µg/kg KG stellt Tabelle 20 anhand der Mittelwerte, Minimum- und Maximumwerte dar, so dass die starken individuellen Streuungen sichtbar werden.

Tabelle 20 Clenbuterolgehalte im Plasma nach Einmalapplikation unterschiedlicher Dosen (ELISA-Ergebnisse: Leerwert korrigiert) (Darstellung der Mittel-, Median-, Minimum- und Maximumwerte)

Zeit [h]	5 Kälber				6 Kälber				6 Kälber			
	Dosis 2,5 µg/kg				Dosis 5 µg/kg				Dosis 10 µg/kg			
	MW	ME	MAX	MIN	MW	ME	MAX	MIN	MW	ME	MAX	MIN
0,25	0,14	0,03	0,38	0,01	0,13	0,12	0,24	0,02	0,30	0,30	0,60	0,01
0,5	0,15	0,06	0,54	0,03	0,21	0,19	0,41	0,03	0,66	0,57	1,26	0,04
0,75	0,18	0,09	0,61	0,03	0,31	0,34	0,51	0,07	0,85	0,68	1,88	0,18
1	0,19	0,16	0,46	0,09	0,32	0,33	0,52	0,13	0,79	0,68	2,16	0,21
1,25	0,28	0,19	0,66	0,11	0,34	0,33	0,62	0,16	0,87	0,63	2,46	0,22
1,5	0,32	0,16	0,71	0,14	0,39	0,40	0,66	0,15	0,92	0,60	3,01	0,19
2	0,41	0,19	1,30	0,10	0,44	0,45	0,67	0,19	1,16	0,75	3,60	0,15
2,5	-	-	-	-	0,35	0,29	0,71	0,15	1,19	0,81	3,33	0,17
3	0,50	0,25	1,41	0,21	0,42	0,36	0,69	0,20	1,32	0,91	3,98	0,17
3,5	0,49	0,25	1,39	0,24	0,46	0,38	0,83	0,24	1,35	0,97	3,95	0,39
4	0,53	0,31	1,48	0,22	0,49	0,36	1,03	0,21	1,24	0,82	3,60	0,32
4,5	0,55	0,29	1,56	0,20	0,51	0,37	1,13	0,22	1,33	0,93	3,42	0,37
5	0,58	0,29	1,75	0,22	0,48	0,39	1,01	0,19	1,30	0,89	3,68	0,36
5,5	0,50	0,27	1,44	0,23	0,47	0,36	0,96	0,22	1,23	0,71	4,08	0,26
6	0,47	0,26	1,42	0,14	0,47	0,39	1,14	0,14	1,18	0,71	3,78	0,20
7	0,43	0,26	1,43	0,06	0,39	0,28	0,88	0,15	1,29	0,99	3,35	0,13
8	0,43	0,25	1,36	0,03	0,40	0,35	0,75	0,16	1,08	0,84	2,89	0,13
9	0,37	0,19	1,27	0,03	0,37	0,32	0,73	0,15	1,13	0,81	2,99	0,18
10	0,35	0,16	1,13	0,06	0,35	0,32	0,75	0,09	0,76	0,69	1,70	0,14
12	0,27	0,14	0,96	0,03	0,26	0,22	0,45	0,15	0,79	0,64	2,06	0,17
24	0,11	0,03	0,36	0,00	0,14	0,13	0,31	0,03	0,28	0,32	0,45	0,01

Die für jedes einzelne Kalb berechneten pharmakokinetischen Parameter sind in den Tabellen 19-21 aufgeführt. Außerdem enthalten die Tabellen die berechneten die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten von allen Tieren zusammen.

Die Plasmaspiegelkurven sind anhand der Einzelwerte jedes Tieres und für jede Dosis in den Abbildungen 16-18 in einem halblogarithmischen Koordinatensystem dargestellt. Bei allen Tieren konnten die Verläufe der Konzentrations-Zeit-Kurven nach oraler Applikation einem offenen Ein-Kompartiment-Modell zugeordnet werden, das als Grundlage für die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter diente. Die Eliminationsphase zeigte einen monoexponentiellen Verlauf. Die Eliminationshalbwertszeiten lagen im Mittel zwischen 5,9 und 10,6 Stunden. Eine signifikante Dosisabhängigkeit konnte bei keinem der Parameter beobachtet werden.

Tabelle 21 Pharmakokinetische Parameter von Clenbuterol nach einmaliger oraler Dosis von 2,5 µg/kg

Parameter	Kalb (OM)						MW	SD	ME	VK [%]
	22	23	27	31	32	33				
K _a h ⁻¹	0,64	Dosis	1,96	1,64	0,57	1,18	1,20	0,608	1,18	51
K _{el} h ⁻¹	0,11	fehlt	0,15	0,20	0,08	0,11	0,13	0,047	0,11	36
V _d l/kg	4,42		7,69	6,28	1,02	3,75	4,63	2,545	4,42	55
Δ' l/kg	0,02		0,04	0,03	0,005	0,01	0,02	0,013	0,02	58
Cl _{tot} l/kg·h ⁻¹	0,51		1,13	1,27	0,08	0,41	0,68	0,505	0,51	74
t _{½ abs} h	1,09		0,35	0,42	1,21	0,59	0,73	0,391	0,59	53
t _{½ el} h	6,06		4,71	3,42	8,83	6,37	5,88	2,027	6,06	34
AUC ng/ml·h	3,69		2,38	1,60	27,23	5,10	8,00	10,83	3,69	135
AUMC ng/ml·h ²	41,27		17,67	9,62	383,0	54,58	101,2	158,5	41,27	157
MRT h	11,05		7,42	6,01	14,07	10,70	9,85	3,186	10,70	32
V _{ss} l/kg	7,48		7,79	9,40	1,29	5,25	6,24	3,137	7,48	50

Tabelle 22 Pharmakokinetische Parameter von Clenbuterol nach einmaliger oraler Dosis von 5 µg/kg

Parameter	Kalb (OM)						MW	SD	ME	VK [%]
	22	23	27	31	32	33				
K _a h ⁻¹	0,76	0,70	2,45	2,68	0,93	0,50	1,34	0,964	0,84	72
K _{el} h ⁻¹	0,07	0,07	0,06	0,04	0,10	0,13	0,08	0,034	0,07	44
V _d l/kg	13,05	5,63	8,32	16,69	15,35	2,07	10,19	5,784	10,68	57
Δ' l/kg	0,06	0,03	0,04	0,08	0,07	0,01	0,05	0,028	0,05	57
Cl _{tot} l/kg·h ⁻¹	0,86	0,39	0,52	0,59	1,50	0,28	0,69	0,443	0,56	64
t _{½ abs} h	0,91	0,99	0,28	0,26	0,75	1,39	0,76	0,436	0,83	57
t _{½ el} h	10,51	10,12	11,01	19,45	7,10	5,16	10,56	4,912	10,31	47
AUC ng/ml·h	5,17	12,08	9,25	8,49	3,30	15,60	8,98	4,482	8,87	50
AUMC ng/ml·h ²	69,83	184,4	143,1	249,0	35,61	203,1	147,5	81,63	163,7	55
MRT h	15,68	15,27	15,47	29,32	10,78	13,02	16,59	6,517	15,37	39
V _{ss} l/kg	15,16	6,32	8,36	17,27	16,33	4,18	11,27	5,657	11,76	50

Tabelle 23 Pharmakokinetische Parameter von Clenbuterol nach einmaliger oraler Dosis von 10 µg/kg

Parameter	Kalb (OM)						MW	SD	ME	VK [%]
	22	23	27	31	32	33				
K _a h ⁻¹	0,32	Dosis	0,84	0,81	0,74	0,28	0,60	0,274	0,74	46
K _{el} h ⁻¹	0,05	fehlt	0,20	0,09	0,10	0,07	0,10	0,059	0,09	58
V _d l/kg	7,55		12,02	7,24	1,78	5,00	6,72	3,758	7,24	56
Δ' l/kg	0,04		0,06	0,04	0,01	0,02	0,03	0,019	0,04	59
Cl _{tot} l/kg·h ⁻¹	0,37		2,40	0,63	0,17	0,34	0,78	0,920	0,37	117
t _{½ abs} h	2,15		0,83	0,86	0,94	2,52	1,46	0,811	0,94	56
t _{½ el} h	14,07		3,47	7,96	7,13	10,09	8,54	3,907	7,96	46
AUC ng/ml·h	24,10		3,41	14,37	54,43	24,76	24,21	18,99	24,10	78
AUMC ng/ml·h ²	605,4		26,6	173,0	572,5	383,6	352	250,9	383,6	71
MRT h	22,70		7,79	12,04	10,52	15,76	13,76	5,768	12,0	42
V _{ss} l/kg	9,42		22,83	8,38	1,93	6,06	9,72	7,870	8,38	81

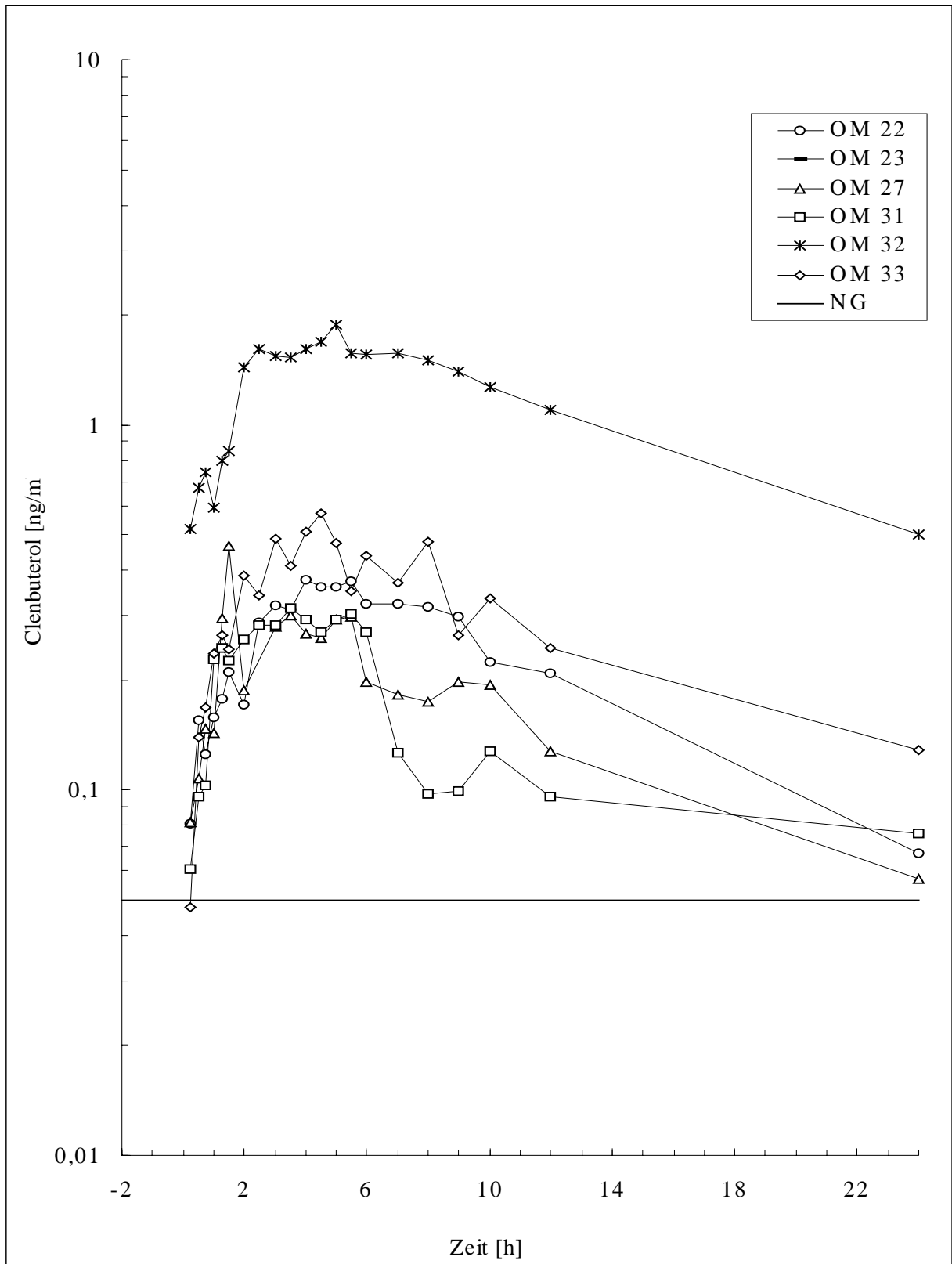


Abbildung 16 Plasmaspiegelkurve nach einmaliger oraler Applikation von 2,5 µg Clenbuterol pro kg KG -Darstellung der Einzelwerte (ELISA-Ergebnisse)

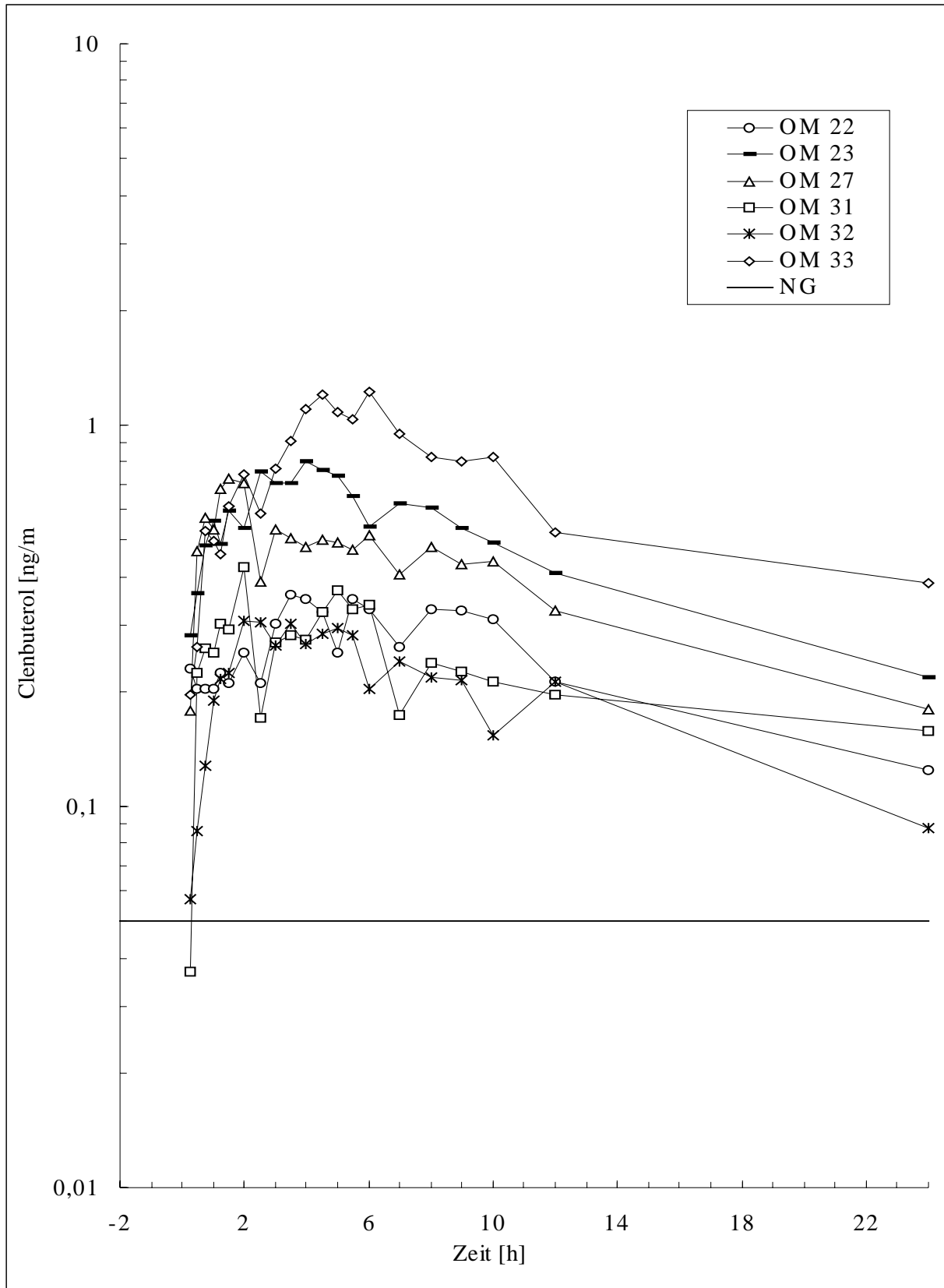


Abbildung 17 Plasmaspiegelkurve nach einmaliger oraler Applikation von 5 µg Clenbuterol pro kg KG -Darstellung der Einzelwerte (ELISA-Ergebnisse)

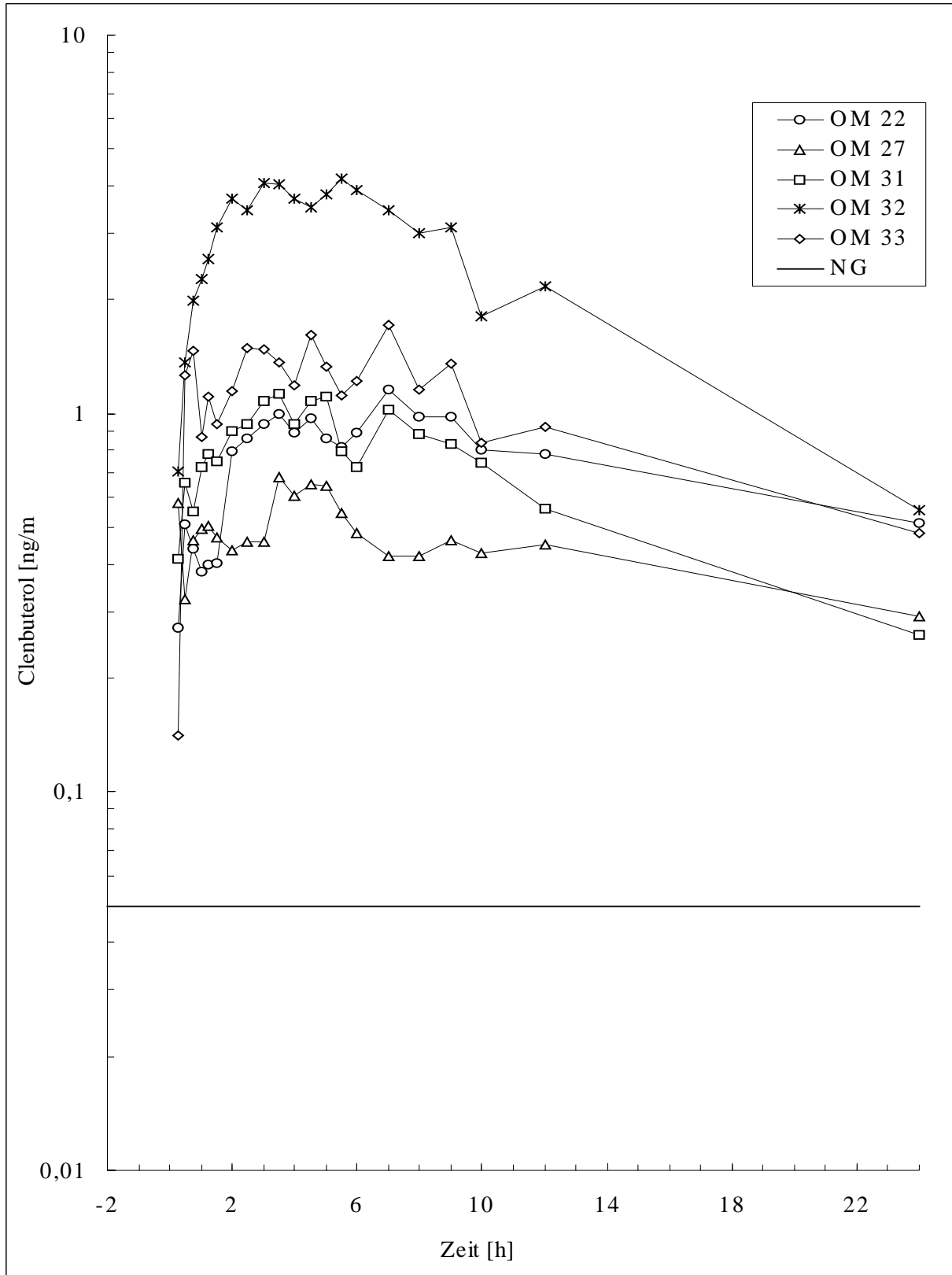


Abbildung 18 Plasmaspiegelkurve nach einmaliger oraler Applikation von 10 µg Clenbuterol pro kg KG -Darstellung der Einzelwerte (ELISA-Ergebnisse)

4.2.5 Bioverfügbarkeit

Da die Versuche zur Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit nicht mit den gleichen intra- und extravasalen Dosen erfolgten, wurden die Formeln zur Berechnung der Bioverfügbarkeit um die Dosis korrigiert. Obwohl jedem Tier alle intravenösen und oralen Dosen nach Einhaltung ausreichend langer Auswaschzeiten appliziert wurden, kann nach Pfeifer et al. (1995) eine zeitliche Änderung der Clearance nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde zur Berechnung der Bioverfügbarkeit die Formel zusätzlich nach Pfeifer et al. (1995) wie folgt korrigiert:

$$F \% = \frac{AUC_{p.o.} \cdot Cl_{tot,p.o.} \cdot D_{i.v.}}{AUC_{i.v.} \cdot Cl_{tot,i.v.} \cdot D_{p.o.}} \cdot 100$$

Die Bioverfügbarkeit wurde für jedes Tier in der Weise berechnet, dass die Parameter aus den Werten für jede intravenös verabreichte Dosis mit denen jeder oral verabreichten Dosis in Beziehung gesetzt wurden. In Tabelle 24 sind die so nach oben genannter Formel ermittelten Bioverfügbarkeiten dargestellt. Die aus diesen Werten berechnete absolute Bioverfügbarkeit von Clenbuterol nach oraler Dosis im Vergleich zur intravenösen Dosis betrug im Mittel 89 % mit einer Streuung von ± 17 %.

Tabelle 24 Berechnung der Bioverfügbarkeit [f %] von Clenbuterol aus AUC, Cltot und Dosis

Dosis [µg/kg]		1 i.v.						2 i.v.						3 i.v.						
Kalb OM	AUC [ng/ml×h]	Cltot l/kg×h-1	22	23	27	31	32	33	22	23	27	31	32	33	22	23	27	31	32	33
						0,67	fehlt	1,16	0,47	fehlt	2,81	5,49	0,93	1,44	0,88	1,97	5,07	8,73	4,68	1,84
			1,87	fehlt	0,83	2,15	fehlt	0,37	0,40	2,08	1,65	2,27	0,69	0,39	0,37	0,68	1,79	0,69	0,34	0,48
3 p.o.	22	3,69	0,51	60					68					69						
	23	fehlt	fehlt	-					-					-						
	27	2,38	1,13		111					91					98					
	31	1,60	1,27			81					82					90				
	32	27,23	0,08				-					129					73			
	33	5,10	0,41					79					83						84	
5 p.o.	22	5,17	0,86	71					81					82						
	23	12,08	0,39		-					97					87					
	27	9,25	0,52			100					81					88				
	31	8,49	0,59				100					102					111			
	32	3,30	1,50					-					146					83		
	33	15,60	0,28						83					87					88	
10 p.o.	22	24,10	0,37	71					82					83						
	23	fehlt	0,47		-					-					-					
	27	3,41	2,40			85					69					75				
	31	14,37	0,63				90					91					100			
	32	54,43	0,17					-					139					79		
	33	24,76	0,34						81					85					86	

Bioverfügbarkeit in %

4.2.6 Vergleich von ELISA- und GC-MS- Ergebnissen

Zur Absicherung der ELISA-Ergebnisse wurden Plasmaproben von 3 Tieren aus 8 Versuchsabschnitten (5 x orale und 3 x intravenöse Dosisgabe) zusätzlich mittels GC-MS untersucht. In Abbildung 19 sind die ELISA-Werte von 156 Proben gegen die entsprechenden GC-MS-Werte abgetragen. Außerdem ist die daraus berechneten Regressionsgerade und das Prognoseintervall dargestellt. Das Prognoseintervall wurde auf der Basis 95 % berechnet, d.h. von 156 Proben dürfen 8 Proben außerhalb des Bereiches liegen. Diese Forderung ist erfüllt. Die ELISA-Werte stehen mit in guter Korrelation mit den GC-MS-Ergebnissen, was durch den Korrelationskoeffizienten von 0,974 zum Ausdruck kommt.

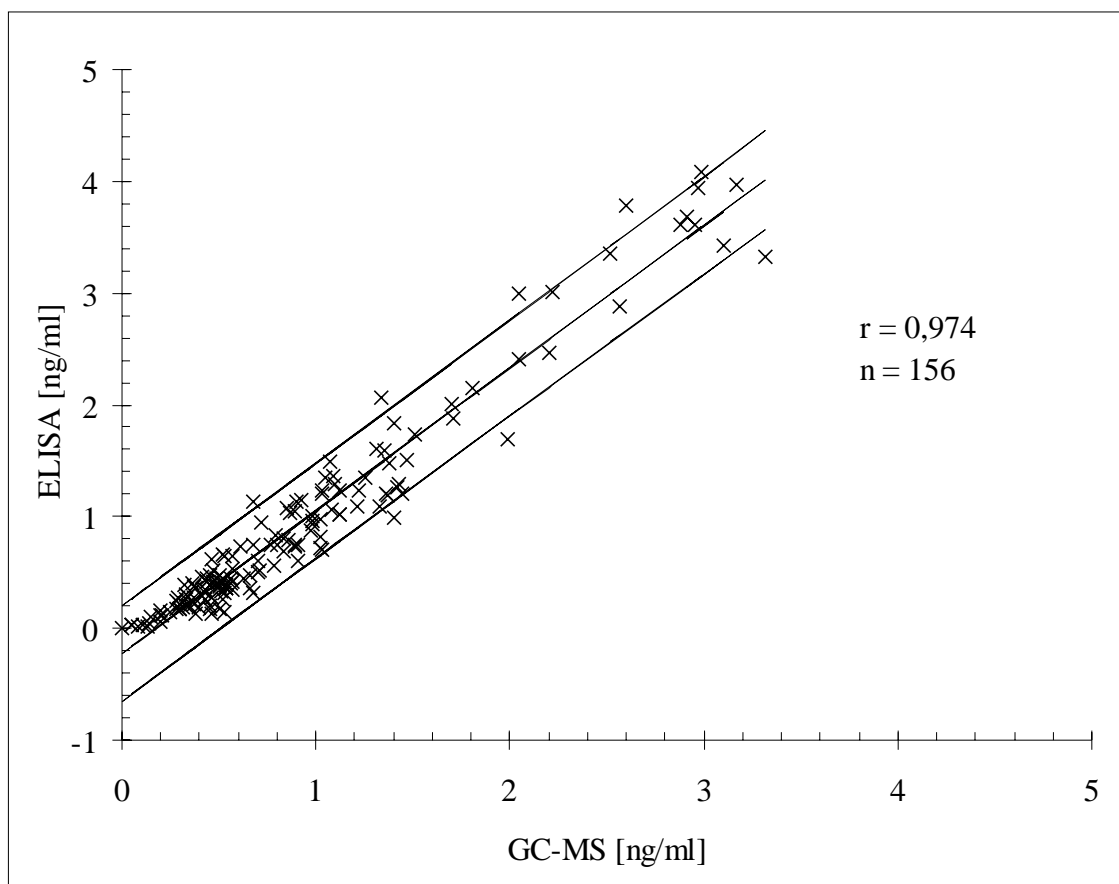


Abbildung 19 Vergleich der ELISA- mit den GC-MS- Ergebnissen von Plasma
n = Anzahl der Proben; r = Korrelationskoeffizient

4.2.7 Urin-Ergebnisse

Tabelle 25 zeigt die Mittelwerte, Minimum- und Maximumwerte der Clenbuterolkonzentration im Urin für alle drei Dosen in den ersten 24 Stunden nach der oralen Applikation an. Abbildung 20 zeigt die Clenbuterolausscheidung aus dem Urin nach intravenöser Dosis und Abbildung 21 nach oraler Dosis anhand der Mittelwerte in halblogarithmischer Darstellung. Nach intravenöser Dosis wurde die maximale Konzentration im Urin innerhalb von 0,5-2,5 Stunden und nach oraler Dosis innerhalb von 2,5-12 Stunden erreicht, wobei der Konzentrationsspiegel zwischen 2,5 und 7 Stunden auf relativ gleich hohem Niveau verlief (s. Tabelle 25). Die maximale Konzentration betrug nach intravenöser Dosis im Mittel 38,6 ng/ml (Dosis 1 µg/kg), 55,9 ng/ml (Dosis 2 µg/kg) und 76,6 ng/ml (Dosis 3 µg/kg). Nach oraler Dosis lag die maximale Clenbuterolkonzentration im Mittel bei 38,6 ng/ml (Dosis 2,5 µg/kg), 140 ng/ml (Dosis 5 µg/kg) und 203 ng/ml (Dosis 10 µg/kg).

Tabelle 25 Clenbuterolgehalte im Urin nach Einmalapplikation unterschiedlicher Dosen (ELISA-Ergebnisse: Leerwert korrigiert) (Darstellung der Mittel-, Median-, Minimum- und Maximumwerte)

Zeit [h]	5 Kälber				6 Kälber				6 Kälber			
	Dosis 2,5 µg/kg				Dosis 5 µg/kg				Dosis 10 µg/kg			
	MW	ME	MAX	MIN	MW	ME	MAX	MIN	MW	ME	MAX	MIN
0,5	1,5	0,68	2,9	0,3	14,7	3,61	67,3	0,4	13,6	12,5	20,0	8,5
1	8,6	6,1	21,2	1,0	24,5	13,2	75,9	2,1	61,0	45,4	182,9	11,2
1,5	12,1	6,63	31,9	4,2	39,7	20,7	117,3	2,7	64,9	52,2	175,0	4,4
2	12,7	7,65	31,4	4,8	78,1	29,5	325,8	18,7	84,8	69,6	192,2	16,6
2,5	20,8	20,4	35,4	10,8	105,9	45,3	398,2	26,7	129,3	106,0	320,0	54,2
3	20,9	19,5	37,9	13,4	110,4	35,8	440,2	31,2	145,3	90,6	360,0	21,9
3,5	19,1	15,6	29,7	9,8	90,4	28,5	434,4	3,2	158,3	104	315,0	41,9
4	23,9	13,4	55,3	11,9	101,7	42,8	443,8	4,9	150,6	102	381,4	40,4
4,5	18,7	22	27,2	9,1	110,9	28,1	499,0	10,4	169,1	139	355,2	72,0
5	27,4	22,3	62,5	12,8	103,0	39,8	438,2	8,7	138,7	139	207,3	82,5
5,5	24,8	17,5	57,2	9,8	109,5	36,5	491,4	6,6	155,9	170	250,7	82,6
6	19,6	20,1	26,9	11,3	87,0	39,2	360,0	12,8	142,0	110	289,1	56,5
7	22,7	12,9	62,5	1,5	88,9	43,8	321,2	9,1	122,3	92	274,1	11,7
8	14,6	5,24	31,1	2,9	55,8	20,2	238,0	0,6	58,6	15,2	218,8	1,0
9	12,2	8,05	24,8	1,5	55,4	13,5	263,6	0,5	44,0	7	216,1	1,1
10	9,4	2,18	39,4	1,4	50,9	12,5	225,2	0,3	49,3	16,8	234,6	0,8
11	13,6	4,82	37,2	0,7	49,4	17,1	209,5	0,5	58,6	29,1	247,6	2,1
12	14,4	6,75	41,2	4,1	21,0	13,2	71,1	1,1	49,5	24,8	185,0	12,3
24	2,1	1,83	4,3	0,2	1,4	1	3,1	0,2	4,7	2,71	17,8	0,3

Plateau

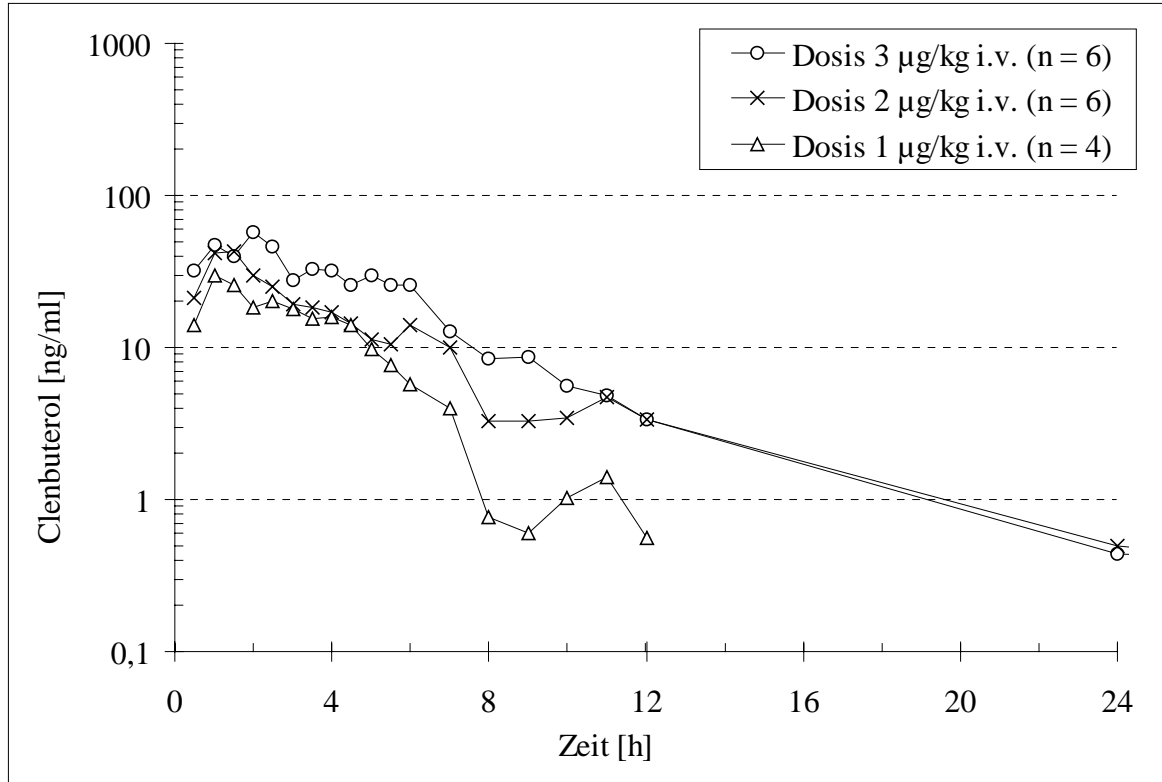


Abbildung 20 Verlauf der Clenbuterolkonzentration im Urin nach einmaliger intravenöser Applikation verschiedener Dosen (Darstellung der Mittelwerte-ELISA)

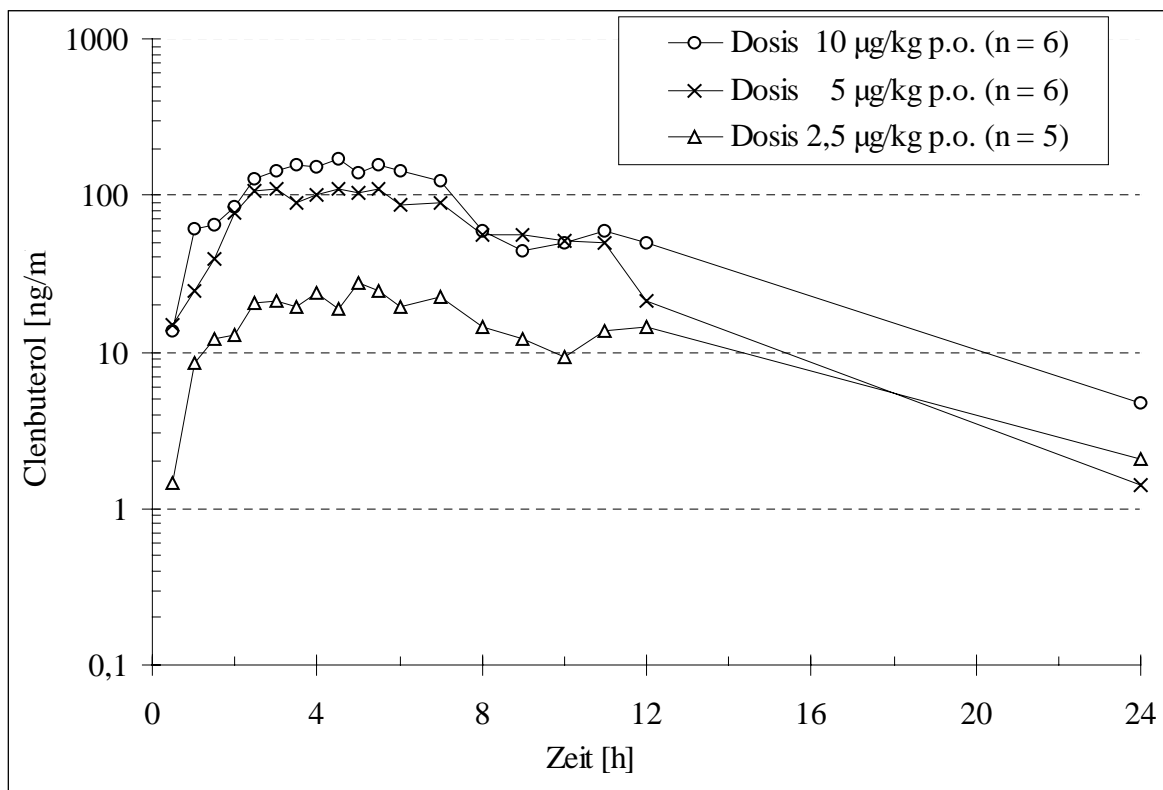


Abbildung 21 Verlauf der Clenbuterolkonzentration im Urin nach einmaliger oraler Applikation verschiedener Dosen (Darstellung der Mittelwerte-ELISA)

4.3 *RÜCKSTANDSVERHALTEN VON CLENBUTEROL*

4.3.1 Plasmaergebnisse

Vor, während und nach der Behandlung entnommene Plasmaproben von 15 ausgewählten Kälbern wurden mittels ELISA untersucht. Es wurden die Proben solcher Tiere gewählt, bei denen die 2. Probenahme am Tag 3 bzw. 4 Stunden nach der Fütterung erfolgte, und die erst längere Zeit nach der letzten Behandlung geschlachtet wurden. Von den ausgewählten Tieren hatten 6 die therapeutische Dosis, 5 die Mastdosis und 3 die doppelte Mastdosis erhalten. Zusätzlich wurden die Proben von dem aus einem Vorversuch stammenden Tier (OM 64) analysiert, das die doppelte Mastdosis über die gesamten 21 Tage erhielt.

Die Einzelergebnisse der Analysen sind im Anhang in Tabelle II-IV enthalten und in den Abbildungen I-XV des Anhangs graphisch dargestellt. Außerdem sind alle Einzelergebnisse noch einmal zusammen in Abbildung 53 und deren Mittelwerte und Standardabweichung in Abbildung 54 im Diskussionsteil (s. 5.2.1) aufgeführt, um den von Quirke (1994a) vorgeschlagenen Grenzwert diskutieren zu können.

Die höchste Plasmakonzentration wurde bei den mit der therapeutischen Dosis behandelten Tieren mit 0,22 ng/ml, bei den mit der Mastdosis behandelten Tieren mit 4,2 ng/ml und bei den mit der doppelten Mastdosis behandelten Tieren mit 6,0 ng/ml gemessen. Tabelle 26 zeigt Mittelwerte, Medianwerte, Standardabweichungen, Minimalwerte und Maximalwerte der Plasmakonzentrationen, die während des gesamten Behandlungszeitraumes zu den verschiedenen Probenahmezeiten bei den einzelnen Tieren und insgesamt erreicht worden sind. Es konnten während der Behandlung mit der therapeutischen Dosis nach 4 Stunden mit 0,105 ng/ml höhere Clenbuterolwerte gemessen werden als nach 3 Stunden mit 0,067 ng/ml. 24 Stunden nach der ersten Clenbuteroldosis waren die Konzentrationen im Plasma am niedrigsten.

Abbildungen 22-24 zeigen die Abnahme der Clenbuterolkonzentration im Plasma nach Abschluss der Behandlung. Die logarithmische Unterteilung der y-Achse erlaubt die Darstellung der drei verschiedenen Dosisverläufe bei gleicher Skalierung. Im Anschluss an die therapeutische Behandlung lagen die gemessenen Clenbuterolkonzentrationen nach 2 Tagen Wartezeit und nach Behandlung mit der Mastdosis nach 7 Tagen Wartezeit unterhalb der Nachweisgrenze. Nach Behandlung mit der doppelten Mastdosis wurden nach 14 Tagen Wartezeit noch Clenbuterolkonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze festgestellt.

Tabelle 26 Clenbuterolgehalte im Plasma [ng/ml] zu verschiedenen Probenahmezeiten nach der ersten Behandlung am Tag
 - gesamter Behandlungszeitraum - (Anzahl Proben [n], MW, SD, ME, MIN, MAX)

Probe- nahme- zeiten	therapeutische Dosis Kalb OM						alle Tiere	Mastdosis Kalb OM					alle Tiere	doppelte Mastdosis Kalb OM			alle Tiere	
	20	28	29	30	48	63		37	51	52	55	58		93	94	95		
3 h	n	10	10	10	10													
	MW	0,049	0,068	0,101	0,051		0,067											
	SD	0,013	0,035	0,047	0,010		0,036											
	ME	0,057	0,067	0,084	0,053		0,058											
	MIN	0,026	0,028	0,069	0,035		0,026											
	MAX	0,062	0,116	0,223	0,071		0,223											
4 h	n					10	10	20	21	21	21	21	21	105	21	21	21	63
	MW					0,093	0,118	0,105	2,096	0,977	1,589	1,092	0,980	1,347	3,88	4,36	2,62	3,623
	SD					0,014	0,034	0,028	0,701	0,237	0,475	0,313	0,205	0,607	0,900	1,127	0,803	1,194
	ME					0,091	0,120	0,103	1,993	0,969	1,615	1,054	1,017	1,196	3,93	4,46	2,68	3,442
	MIN					0,067	0,061	0,061	0,782	0,522	0,625	0,365	0,617	0,365	2,315	1,984	1,087	1,087
	MAX					0,115	0,159	0,159	4,245	1,358	2,464	1,655	1,303	4,245	5,473	6,020	4,045	6,020
8 h	n	10	10	10	10			40										
	MW	0,046	0,052	0,102	0,040			0,060										
	SD	0,013	0,036	0,055	0,008			0,041										
	ME	0,045	0,045	0,080	0,041			0,052										
	MIN	0,032	0,01	0,053	0,030			0,010										
	MAX	0,065	0,115	0,206	0,053			0,206										
24 h	n	9	10	9	10	10	10	58	21	21	21	21	21	105	21	21	21	63
	MW	0,032	0,041	0,078	0,027	0,076	0,086	0,057	1,096	0,405	0,94	0,579	0,544	0,713	2,311	3,212	1,953	2,492
	SD	0,007	0,026	0,037	0,008	0,013	0,035	0,034	0,394	0,135	0,308	0,186	0,162	0,363	0,640	1,011	0,791	0,974
	ME	0,034	0,051	0,07	0,025	0,077	0,087	0,053	1,013	0,392	0,994	0,584	0,54	0,613	2,179	3,118	2,393	2,590
	MIN	0,019	0,01	0,036	0,018	0,054	0,045	0,010	0,436	0,202	0,318	0,106	0,257	0,106	1,037	1,037	0,518	0,518
	MAX	0,037	0,071	0,143	0,043	0,097	0,158	0,158	1,820	0,610	1,550	0,963	0,946	1,820	3,400	6,039	2,976	6,039

Abnahme der Clenbuterolkonzentration im Plasma (MW und SD) nach Abschluss der letzten Behandlung (ELISA-Ergebnisse)

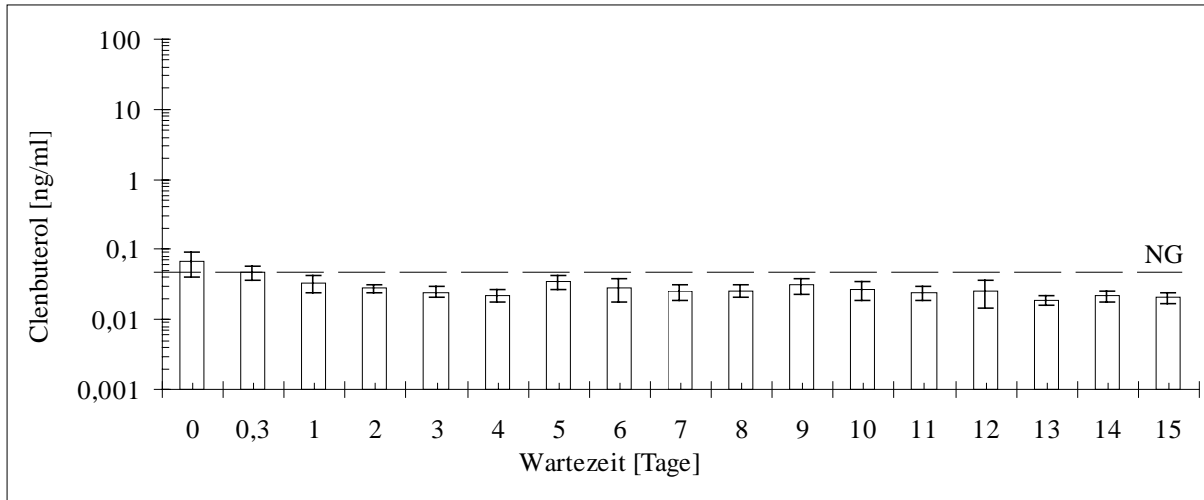


Abbildung 22 therapeutische Dosis

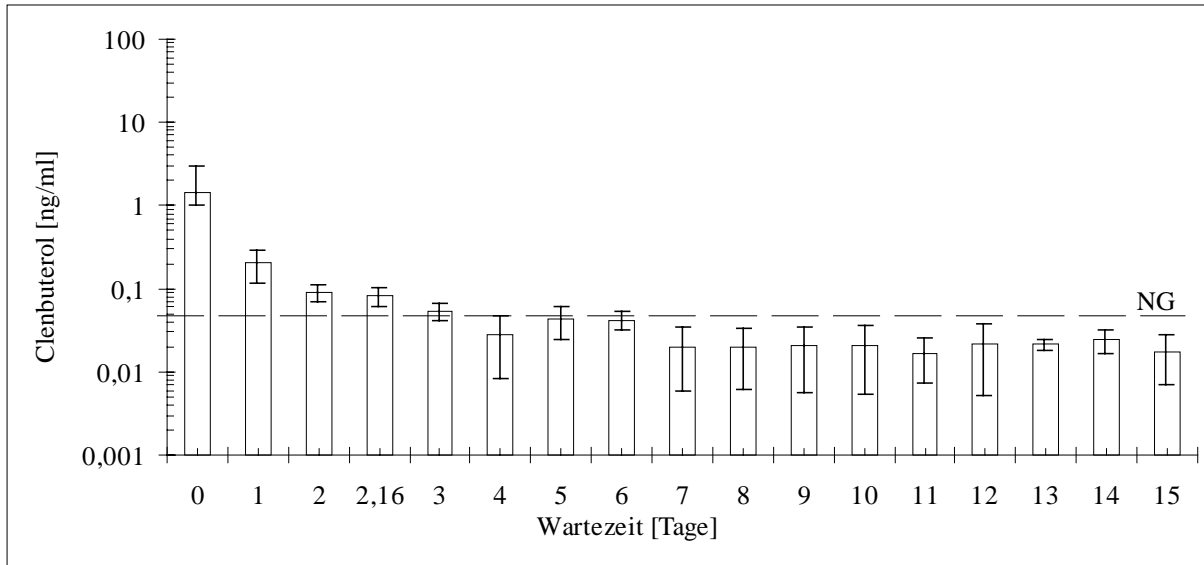


Abbildung 23 Mastdosis

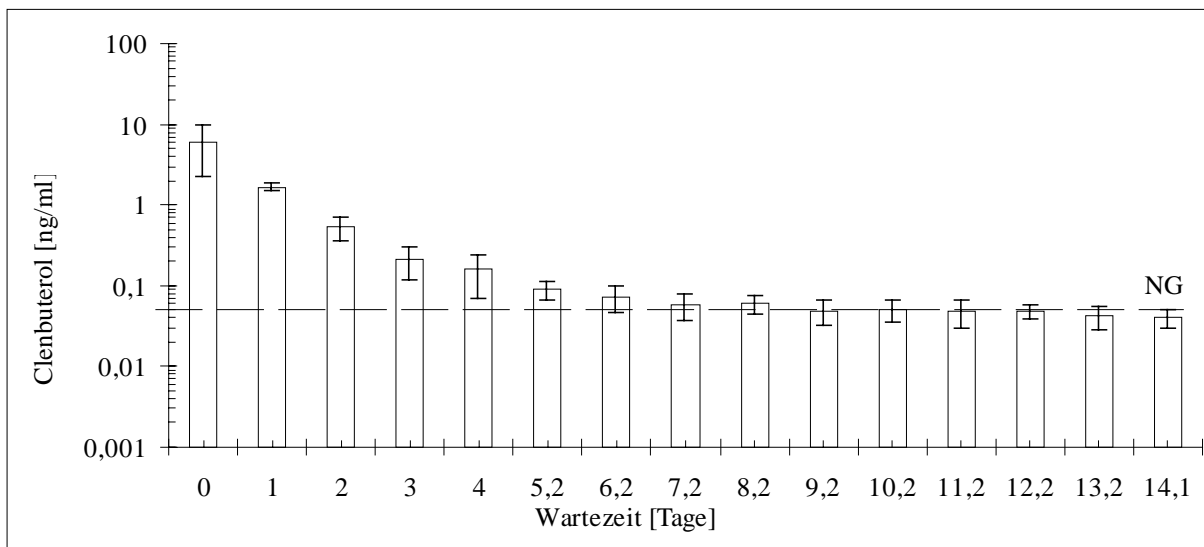


Abbildung 24 doppelte Mastdosis

4.3.2 Clenbuterolrückstände in verschiedenen Geweben

4.3.2.1 Ergebnisse der Vorversuche

Homogenisation

Wurden Leber, Muskel und Nieren im Stück unbearbeitet gelagert und erst vor der Aufarbeitung homogenisiert, konnten höhere Clenbuterolkonzentrationen erzielt werden als nach Aufarbeitung von homogenisiert gelagertem Material (Ergebnisse s. Gude et al., 1996). Daher wurden für die folgenden Auswertungen in der Regel nur Ergebnisse von im Stück gelagerten Proben verwendet. Ausnahmen waren Proben von 4 Lebern und 3 Nieren, die nur in gekuttertem Zustand verfügbar waren.

Untersuchung von Teilstücken der Leber

Anatomisch verschiedene Bereiche der Leber unterschieden sich nicht hinsichtlich des Clenbuterolgehaltes (Ergebnisse s. Gude et al., 1996). Daher wurden für die folgenden Auswertungen die Mittelwerte aller Einzelergebnisse der Lebern verwendet.

Untersuchung von Teilen der Niere

Die Nieren von 22 Tieren wurden in Cortex und Medulla unterteilt. Bei Proben von 17 Nieren war der Clenbuterolgehalt in der Medulla um 4 bis 113 % höher als im Cortex. Da von Gude et al. (1996) erst ein Teil dieser Ergebnisse veröffentlicht wurden, stellt Tabelle 27 alle Ergebnisse noch einmal zusammen. Zwischen rechter und linker Niere konnten keine Konzentrationsunterschiede festgestellt werden (s. Gude et al., 1996). Für die weiteren Auswertungen sind nur Ergebnisse der Medulla bzw. der gesamten Niere, wenn diese nicht geteilt wurde, verwendet worden.

Tabelle 27 Clenbuterolkonzentrationen [ng/g] in den Nieren von 22 Tieren

	Cortex	Medulla	Differenz	
				in %
therapeutische Dosis	1,24	2,63	1,39	112
	1,27	1,12	-0,16	-12
	2,45	3,10	0,65	27
	0,260	0,145	-0,12	-44
	0,298	0,633	0,34	113
	0,160	0,123	-0,04	-23
Mastdosis	74	79	4,73	6
	62	105	42,62	69
	1,61	1,92	0,31	19
	1,74	2,03	0,29	17
	0,63	0,83	0,20	32
	0,46	0,30	-0,16	-34
	0,22	0,23	0,01	4
	0,43	0,30	-0,13	-31
doppelte Mastdosis	225	276	51,0	23
	174	231	57,7	33
	132	182	50,7	38
	131	162	31,1	24
	1,98	2,92	0,9	47
	1,17	1,71	0,5	47
	3,76	4,56	0,8	21
	0,85	1,17	0,3	38

4.3.2.2 Clenbuterolrückstände in Leber, Muskel, Niere, Retina/Uvea, Galle und zum Vergleich auch in Plasma

Aufgrund der Vielzahl von Daten sind die Einzelergebnisse im Anhang aufgeführt. Tabelle V enthält alle GC-MS- Ergebnisse. Dargestellt ist die Anzahl der Bestimmungen je Probe sowie deren Mittelwert, Median, Standardabweichung und Variationskoeffizient (VK). Mittelwert und Median zeigten in der Regel eine gute Übereinstimmung. Tabelle VI im Anhang zeigt zum Vergleich die ELISA- Ergebnisse der Proben.

Die Abnahme von Clenbuterol nach der letzten Behandlung mit therapeutischer, Mast- oder doppelter Mastdosis ist für jede Matrix in den Abbildungen 25-31 dargestellt. Die logarithmische Unterteilung der y-Achse ermöglicht einen Vergleich zwischen den verschiedenen Dosen und erlaubt eine bessere Auflösung der niedrigen Konzentrationsbereiche. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse von Proben dargestellt, die mittels GC-MS und zum Teil zusätzlich mittels ELISA untersucht wurden. Während die Abnahme von Clenbuterol nach der letzten Dosis bei Leber, Muskel und Niere einen mehrphasigen Verlauf zeigt, weist sie bei Retina/Uvea einen eher linearen Verlauf auf.

Abnahme der Clenbuterolkonzentration in verschiedenen Matrices nach Abschluß der letzten Behandlung mit unterschiedlichen Dosen (MW ± SD) - Darstellung aller Dosierungen je Matrix

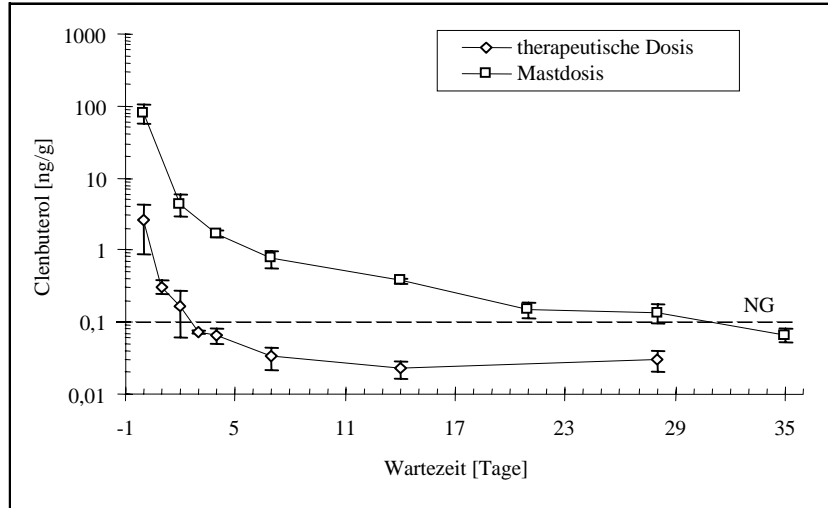


Abbildung 25 Leber (ELISA - Ergebnisse)

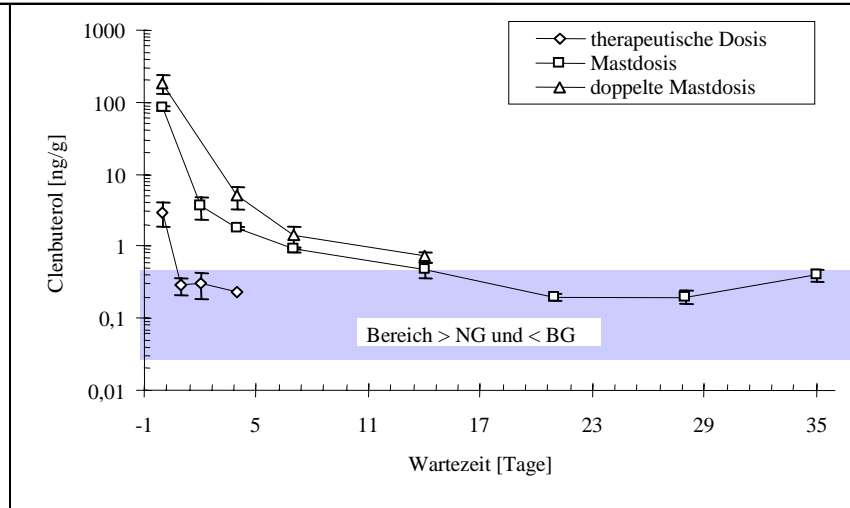


Abbildung 26 Leber (GC-MS - Ergebnisse)

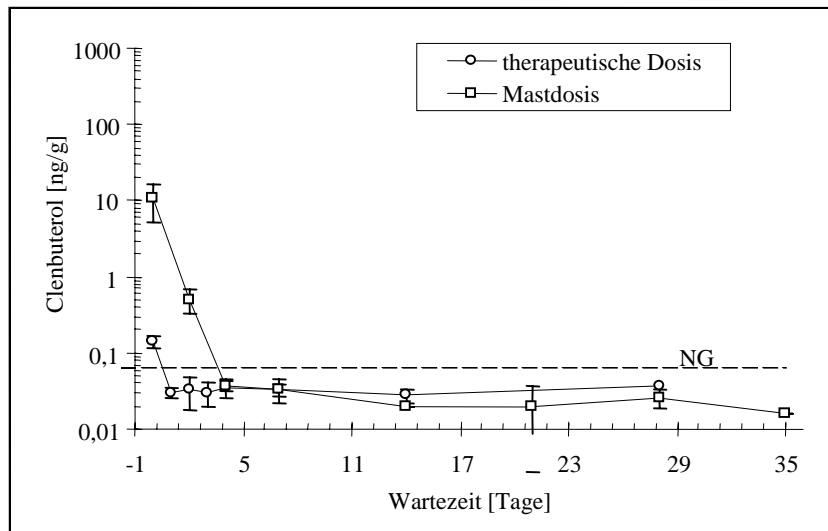


Abbildung 27 Muskel (ELISA - Ergebnisse)

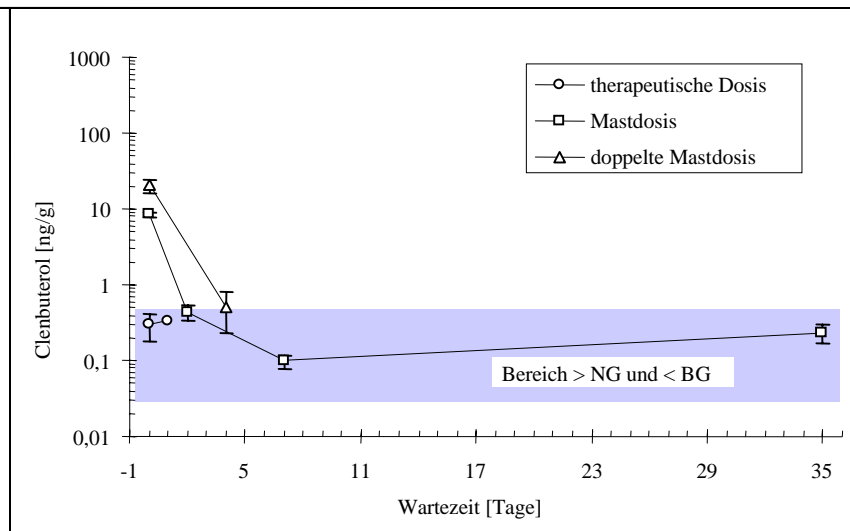


Abbildung 28 Muskel (GC-MS - Ergebnisse)

Abnahme der Clenbuterolkonzentration in verschiedenen Matrices nach Abschluß der letzten Behandlung mit unterschiedlichen Dosen (MW ± SD)

- Darstellung aller Dosierungen je Matrix -

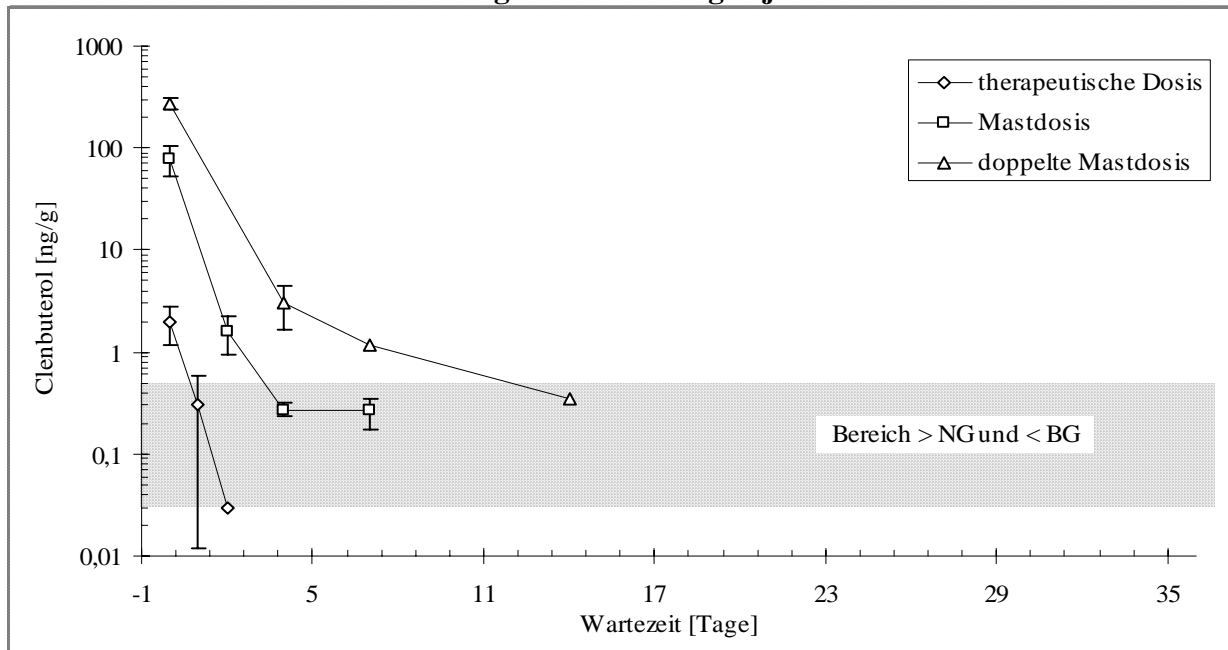


Abbildung 29 Niere (GC-MS- Ergebnisse)

Verwendet wurden die Analysenergebnisse von Medulla bzw. der gesamten Niere, wenn diese nicht getrennt analysiert worden ist (s. Anhang, Tabelle II).

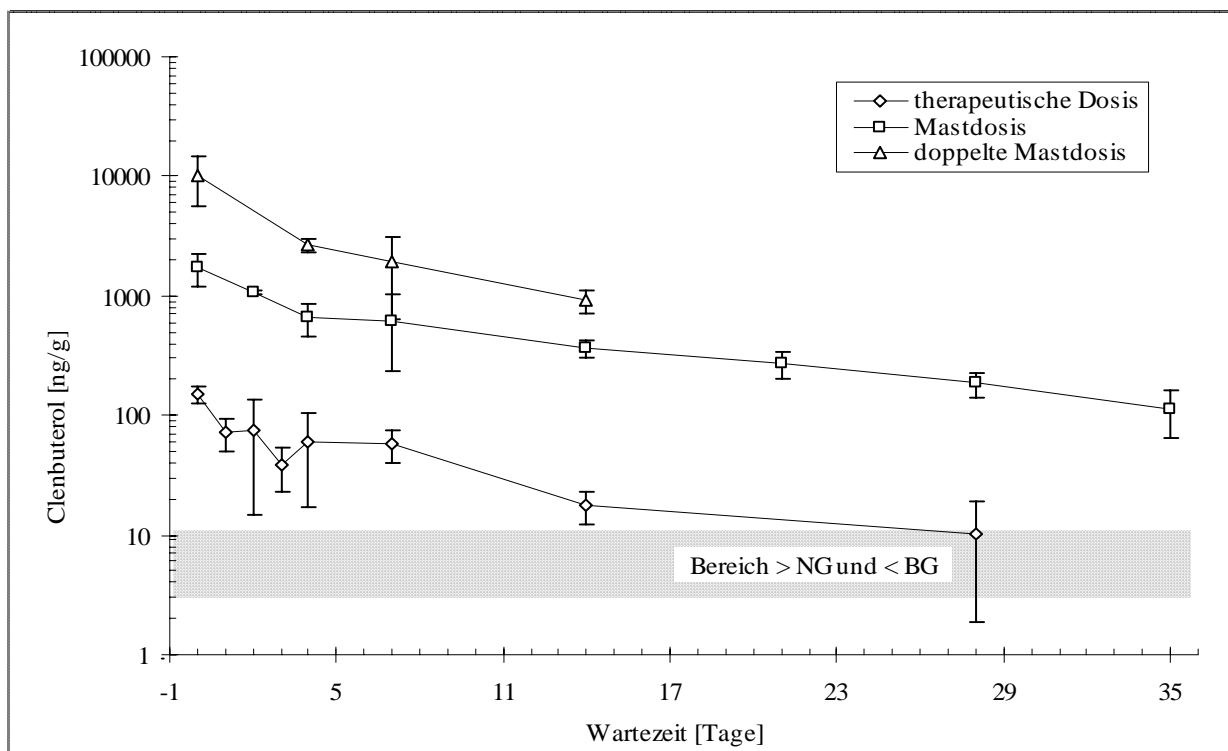


Abbildung 30 Retina/ Uvea (GC-MS- Ergebnisse)

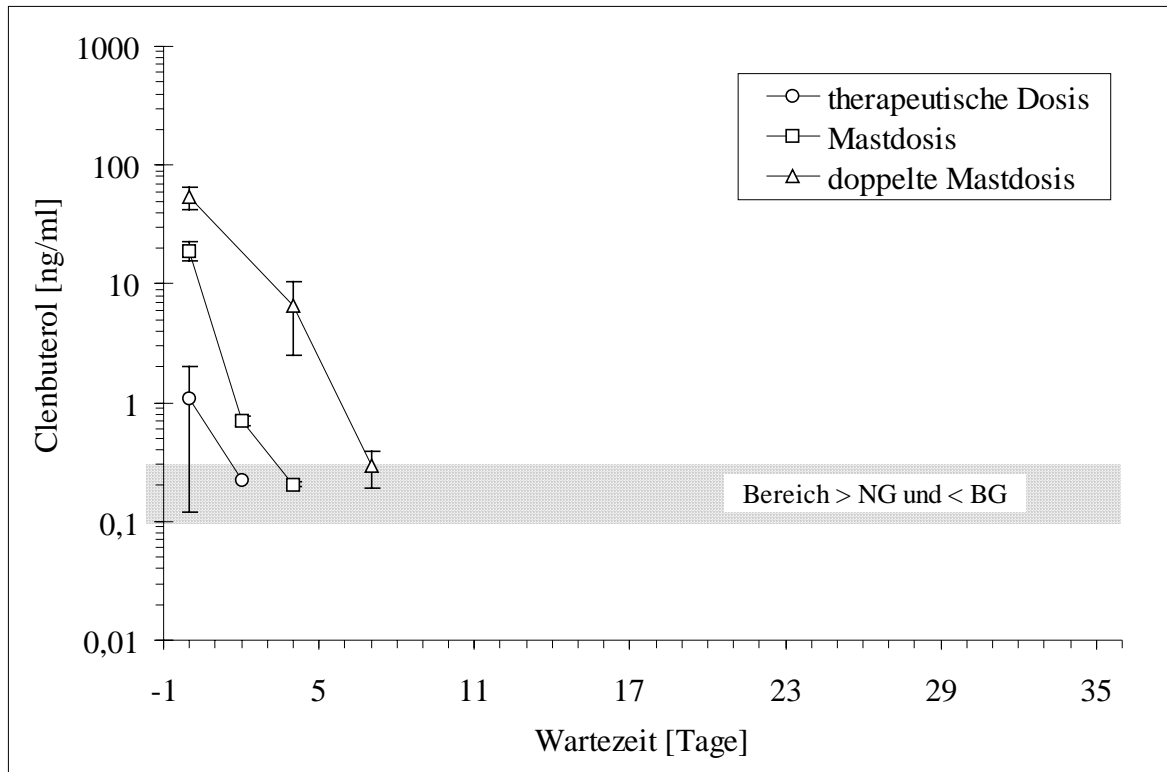


Abbildung 31 Abnahme der Clenbuterolkonzentration in der Galle nach Abschluss der letzten Behandlung mit unterschiedlichen Dosen (MW und SD) (GC-MS -Ergebnisse)

In den Abbildungen 32-34 ist die Abnahme von Clenbuterol in Leber, Muskel, Niere, Retina/Uvea, Galle und Plasma dosisweise dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind hier nur die Werte eingezeichnet, die oberhalb der Bestimmungsgrenze (BG) (Ergebnisse der GC-MS) bzw. oberhalb der Nachweisgrenze (NG) (Ergebnisse des ELISAs) lagen.

**Abnahme der Clenbuterolkonzentration in verschiedenen Matrices nach Abschluß
der letzten Behandlung mit unterschiedlichen Dosen (MW ± SD)
- Darstellung aller Matrices je Dosierung -**

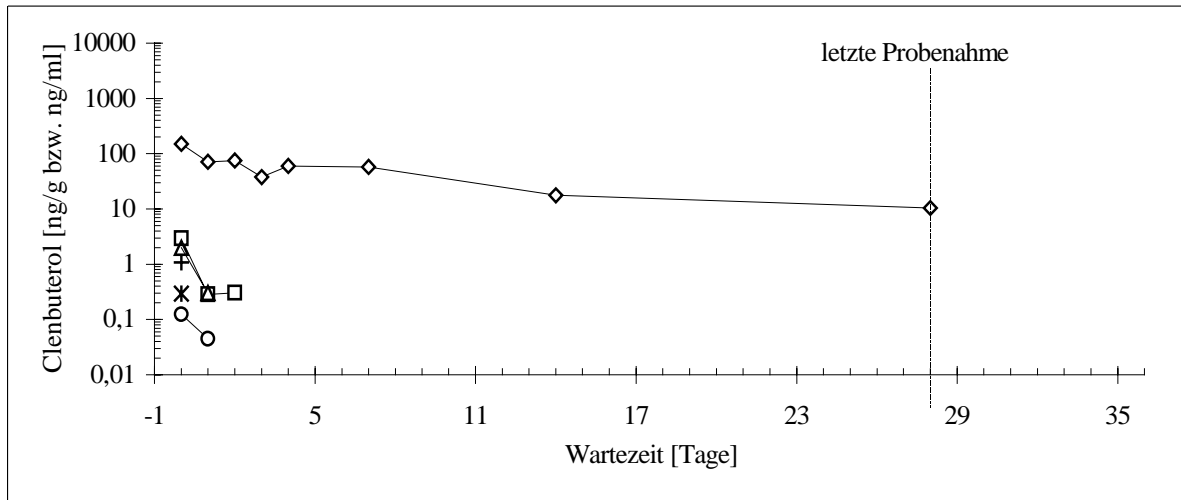


Abbildung 32 therapeutische Dosis

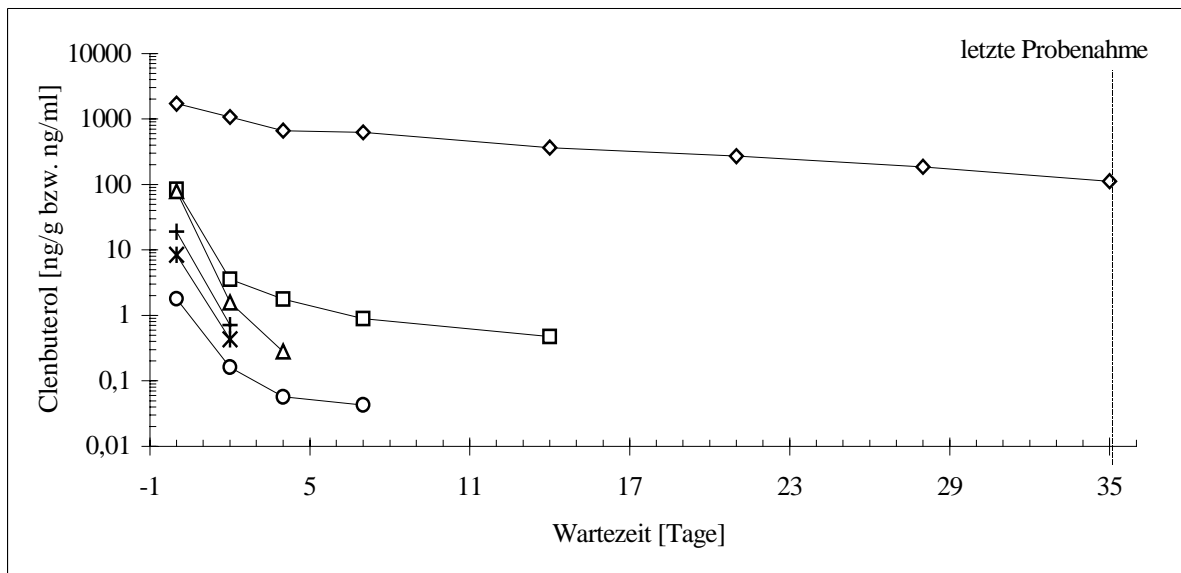


Abbildung 33 Mastdosis

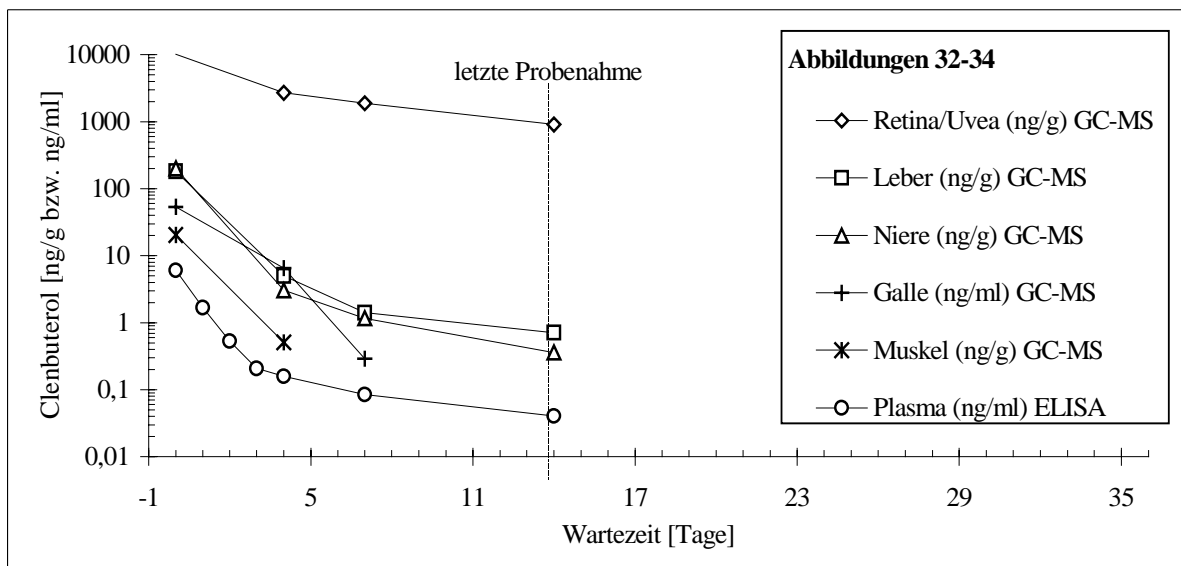


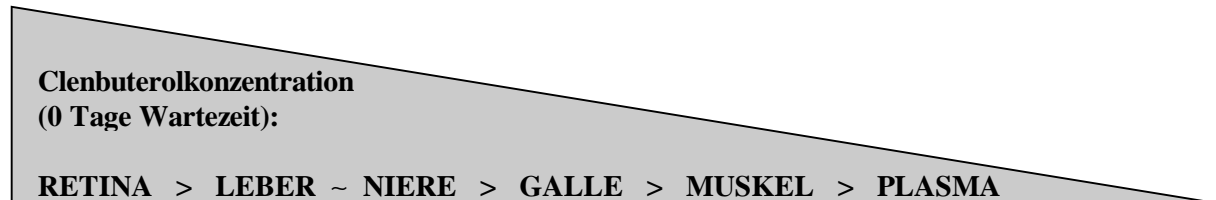
Abbildung 34 doppelte Mastdosis

Abbildungen 32-34

- ◇— Retina/Uvea (ng/g) GC-MS
- Leber (ng/g) GC-MS
- △— Niere (ng/g) GC-MS
- +— Galle (ng/ml) GC-MS
- *— Muskel (ng/g) GC-MS
- Plasma (ng/ml) ELISA

Eine starke Akkumulation von Clenbuterol konnte in der Retina/Uvea festgestellt werden. Die Clenbuterolkonzentrationen nach 0 Tagen Wartezeit lagen bei jeder Dosis um das 20-50fache über denen von Leber und Niere.

Insgesamt ergibt sich, dass die Clenbuterolkonzentration zum Zeitpunkt der letzten Dosisgabe in den einzelnen Matrices dosisunabhängig wie folgt abnimmt:



Eine schematisierte Zusammenfassung der Daten zum Clenbuterolgehalt in den einzelnen Matrices und an verschiedenen Tagen nach Gabe der letzten Dosis gibt die Tabelle 28.

Tabelle 28 Clenbuterolnachweis in einzelnen Matrices an verschiedenen Tagen

Dosis	Matrices	Wartezeit nach letzter Dosis - Probenahmetage -							
		0	1	2	3	4	7	14	28
therapeutische Dosis	Muskel	■							
	Galle	■							
	Niere	■	■						
	Plasma	■	■						
	Leber	■	■	■					
	Retina/Uvea	■	■	■	■	■	■	■	■
		0	2	4	7	14	21	28	35
Mastdosis	Muskel	■	■						
	Galle	■	■						
	Niere	■	■	■					
	Plasma	■	■	■	■				
	Leber	■	■	■	■	■			
	Retina/Uvea	■	■	■	■	■	■	■	■
		0	4	7	14				
doppelte Mastdosis	Muskel	■	■						
	Galle	■	■	■					
	Niere	■	■	■	■				
	Plasma	■	■	■	■				
	Leber	■	■	■	■				
	Retina/Uvea	■	■	■	■	■	■	■	■

■ - Clenbuterolnachweis erfolgte mindestens bei einem
 □ - Clenbuterol konnte nicht nachgewiesen werden

Clenbuterol war in der Retina/Uvea bei allen Tieren unabhängig von der Dosis und bis zur letzten Probenahme nachweisbar. Bei allen anderen Matrices konnte es dagegen nach therapeutischer Dosis nur in den ersten 1-2 Tagen nachgewiesen werden. Selbst bei der doppelten Mastdosis wurde im Muskel nach 7 Tagen und in der Galle nach 14 Tagen kein Clenbuterol mehr gefunden, während einzelne Tiere in Leber, Niere und Plasma bei der letzten Probenahme nach 14 Tagen noch Clenbuterol enthielten.

Die Ergebnisse zeigen, dass Clenbuterol in den untersuchten Matrices unterschiedlich schnell abgebaut wird. Obwohl beispielsweise im Plasma nach 0 Tagen Wartezeit wesentlich weniger Clenbuterol enthalten war als in Niere, Galle und Muskel, konnte es noch nach längerer Wartezeit nachgewiesen werden.

4.3.2.3 Darstellung der Einzelergebnisse von Leber, Muskel und Niere in Bezug zu Höchstmengen bzw. Beurteilungswerten

In den Abbildungen 35-37 sind die Einzelergebnisse von Leber, Muskel und Niere je Dosis graphisch dargestellt. Zusätzlich wurden die in der Einleitung und Aufgabenstellung diskutierten Höchstmengen (MRLs) und Beurteilungswerte eingezeichnet.

Bereits 2 Tage nach Verabreichung der letzten therapeutischen Dosis konnten in keinem der Organe noch Clenbuterolrückstände festgestellt werden, die oberhalb des MRLs lagen. Nach 14 Tagen waren auch bei vorheriger Verabreichung der Mastdosis in keinem Organ Clenbuterolrückstände oberhalb des MRLs nachweisbar. Selbst nach Verabreichung der doppelten Mastdosis konnten nur in der Leber noch Konzentrationen nachgewiesen werden, die oberhalb des MRLs lagen, wobei hier die letzten Proben nach 14 Tagen entnommen wurden.

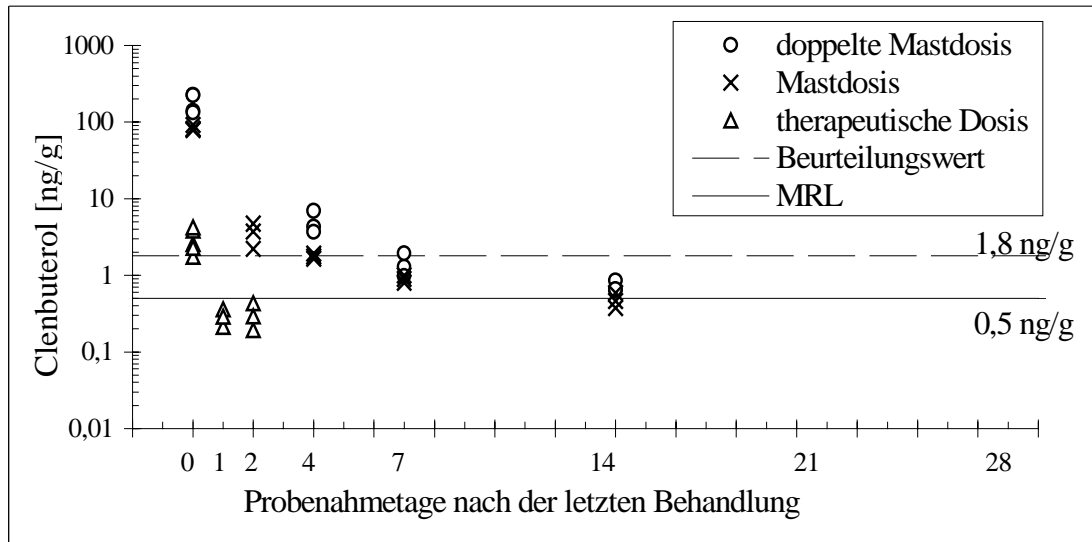


Abbildung 35 Clenbuterolgehalte in der Leber - Einzelergebnisse

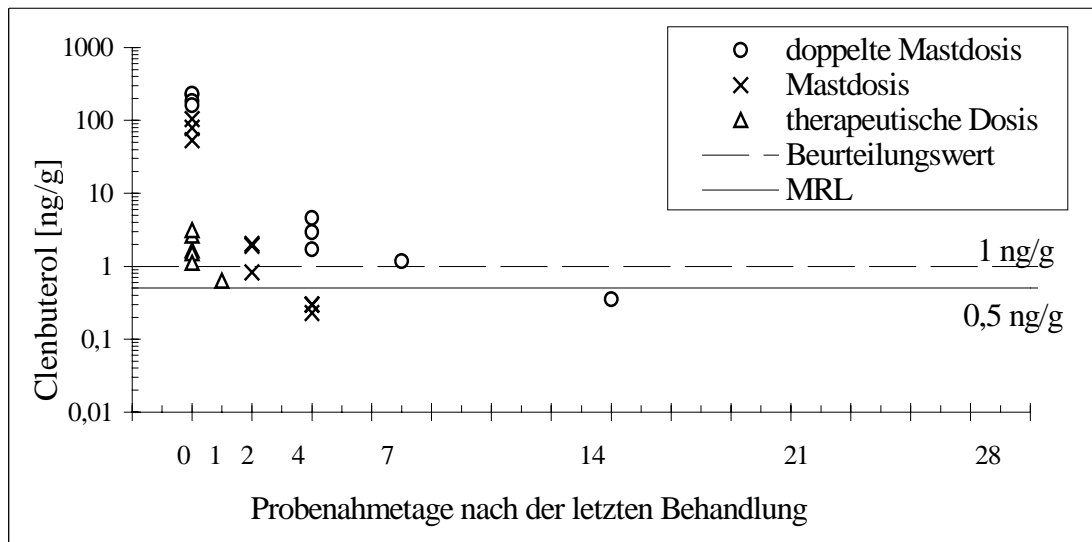


Abbildung 36 Clenbuterolgehalte in der Niere - Einzelergebnisse

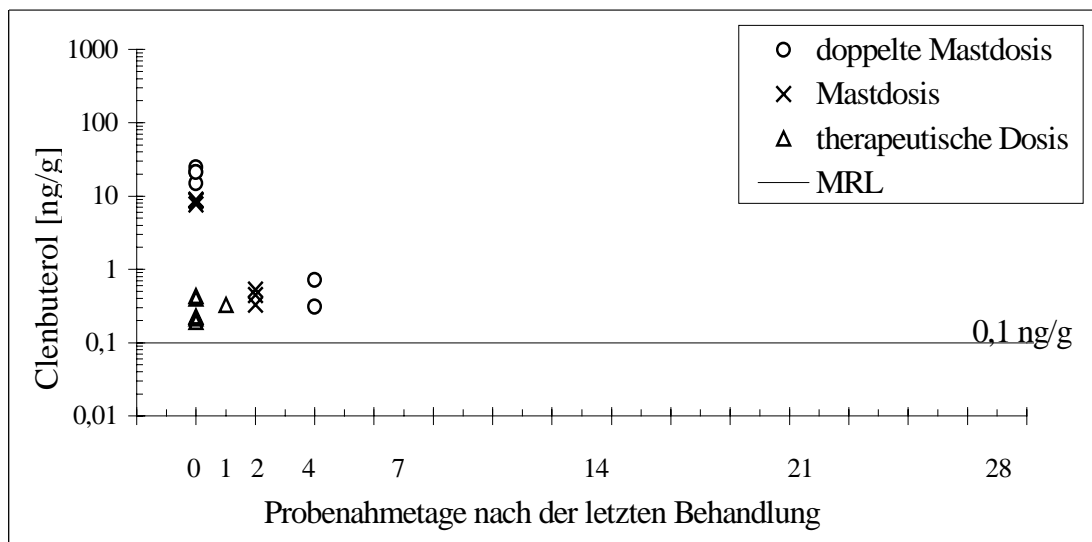


Abbildung 37 Clenbuterolgehalte im Muskel - Einzelergebnisse

4.4 PRÜFUNG EINES THEORETISCH ENTWICKELTEN MODELLS ZUR KONTROLLE DES CLENBUTEROLEINSATZES AUF DEM SCHLACHTHOF

Bisher erfolgte die Beurteilung eines festgestellten Rückstandes in einer Matrix über eine Höchstmenge (z.B. im Sinne eines MRLs). Mit einer Höchstmenge als Kriterium sind Rückschlüsse auf die zuvor verabreichte Dosis jedoch nicht möglich, da in den meisten Fällen die Wartezeit zwischen Dosisgabe und Probenahme unbekannt ist. Ein Rückstandsnachweis könnte demzufolge sowohl auf eine illegale Behandlung der Tiere mit einer hohen Dosis und einer anschließend ausreichend langen Wartezeit als auch auf eine Behandlung der Tiere mit einer therapeutischen Dosis und einer kurzen Wartezeit danach zurückzuführen sein.

Im Folgenden wurde davon ausgegangen, dass die Aussagekraft eines Rückstandsbefundes erhöht wird, wenn die Rückstandsgehalte von mindestens zwei Matrices bekannt sind. Wird aus den ermittelten Gehalten ein Quotient gebildet, wäre es denkbar, diesen in Konzentrationsverlaufskurven einzutragen, welche aus Quotienten derselben Matrices von Tieren gebildet wurden, die aus vorangegangenen Studien stammten und bei denen das Behandlungsschema bekannt war. Gibt es Verläufe von Tieren, die mit verschiedenen Dosen behandelt worden sind und bei denen danach eine ausreichend lange Wartezeit eingehalten wurde, müsste sich durch den Schnittpunkt mit einer dieser Verlaufskurven die Wartezeit nach der letzten Dosis ermitteln lassen.

Die unter 4.3 dargestellten Ergebnisse von Leber, Muskel, Niere, Retina/Uvea, Plasma und Galle dienten als Datengrundlage zur Überprüfung dieses auf theoretischen Überlegungen basierenden Modells zur Kontrolle des Clenbuteroleinsatzes auf dem Schlachthof.

Tabelle 29 gibt einen Überblick über die Anfangskonzentrationen von Clenbuterol in den einzelnen Matrices und über die ermittelten Halbwertszeiten. Die höchsten Konzentrationen und längsten Halbwertszeiten wiesen Leber und Retina/Uvea auf. Die Niere enthielt zwar ähnlich hohe Anfangskonzentrationen aber kürzere Halbwertszeiten als die Leber. Galle, Muskel und Plasma schieden aufgrund der erheblich geringeren Anfangskonzentrationen und der schnellen Elimination als geeignete Matrices aus.

Tabelle 29 Clenbuterolkonzentration (C) nach 0 Tagen Wartezeit und Halbwertszeiten (t_{1/2}) von Clenbuterol in den verschiedenen Matrices und Dosierungen (GC-MS -Ergebnisse und bei Plasma ELISA -Ergebnisse)

Matrix	Dosis C in	therapeutische Dosis		Mastdosis				doppelte Mastdosis						
		C	Elimination		C	1. Phase		2. Phase		C	1. Phase		2. Phase	
			Zeit- spanne [Tage]	t _{1/2} [Tage]		Zeit- spanne [Tage]	t _{1/2} [Tage]	Zeit- spanne [Tage]	t _{1/2} [Tage]		Zeit- spanne [Tage]	t _{1/2} [Tage]		
Retina	[ng/g]	150	0 - 28	7,9	1719	0 - 36	10,2	-	10068	0 - 14	4,2	-		
Leber	[ng/g]	2,9	0 - 1	0,30	84	0 - 2	0,43	2 - 14	4,4	182	0 - 4	0,77	4 - 14	4,0
Niere	[ng/g]	2,0		-	79	0 - 2	0,35	2 - 7	0,82	200	0 - 4	0,65		-
Galle	[ng/ml]	1,1		-	19	0 - 2	0,42		-	53	0 - 7	0,96		-
Muskel	[ng/g]	0,3		-	8,4	0 - 2	0,47		-	20	0 - 4	0,74		-
Plasma	[ng/ml]	0,13		-	1,7	0 - 4	0,91		-	4,3	0 - 5	0,91	5 - 14	9,1

Von den untersuchten Matrices kamen für die Berechnung eines Quotienten nur die Werte von Leber und Retina in Frage.

Die in Abbildung 38 dargestellten Quotienten (Clenbuterolgehalt in Retina : Clenbuterolgehalt in Leber) wurden aus den Werten von jedem Tier einzeln und unabhängig von der Dosis gebildet. Anhand der Abbildung ist bereits zu erkennen, dass ein einheitlicher Verlauf, der für ein standardisiertes Modell erforderlich gewesen wäre, nicht zu erzielen war.

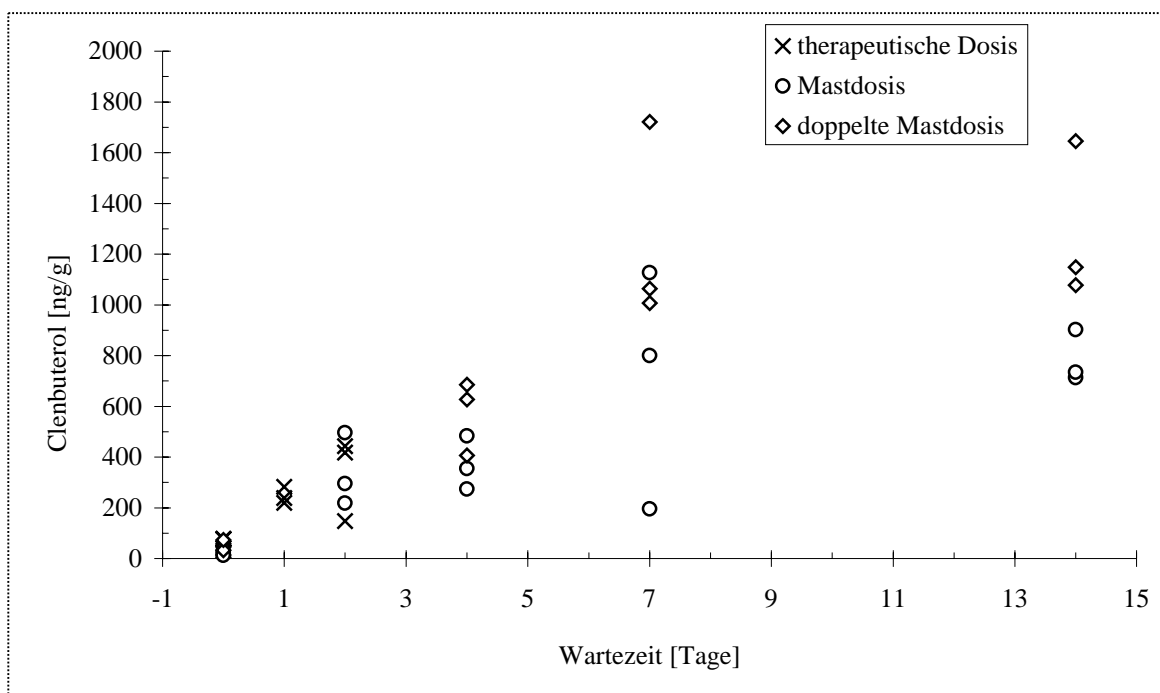


Abbildung 38 Darstellung der aus Retina und Leber gebildeten Quotienten aller Tiere und aller Dosen unter Verwendung der GC-MS-Ergebnisse

4.5 ZUSÄTZLICHE INFORMATIONEN

4.5.1 Allgemeinbefinden der Tiere während der Versuche

Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Clenbuterol

Sowohl nach intravenöser als auch nach oraler Gabe vertrugen die Kälber die Clenbuterolbehandlung gut. Lediglich in der ersten Stunde nach intravenöser und 3-5 Stunden nach oraler Verabreichung der höheren Dosen (i.v.: 2 und 3 µg/kg KG; oral: 5 und 10 µg/kg KG) deutliche Nebenwirkungen wie Muskelzittern, erhöhte Herz- und Atemfrequenz und z.T. Schweißausbruch zu beobachten, die bis zu 12 Stunden anhielten.

Bei zwei Tieren (OM 23 und OM 32) verschlechterte sich das Allgemeinbefinden der Tiere ca. 14 Tage nach Versuchsbeginn. Die Tiere verweigerten teilweise die Futteraufnahme, hatten erhöhte Körpertemperatur und eitrigen Nasenausfluss. Beide Tiere schieden daraufhin aus dem Versuch aus.

Versuche zum Rückstandsverhalten von Clenbuterol nach verschiedenen Dosisgaben

Nach oraler Verabreichung der therapeutischen Clenbuteroldosis von 0,8 µg Clenbuterol/kg KG zeigten die Kälber keine Anzeichen von Nebenwirkungen. Während der ersten Behandlungstage mit der Dosis von 10 µg Clenbuterol/kg KG waren nach 3-5 Stunden die oben beschriebenen Nebenwirkungen zu beobachten.

Das in einem Vorversuch mit der Dosis von 20 µg Clenbuterol/kg KG behandelte weibliche Kalb (OM 64) zeigte keinerlei Nebenwirkungen. Im Hauptversuch mit derselben Dosis konnten dann jedoch deutliche Nebenwirkungen in der für die 10 µg-Dosis beschriebenen Form beobachtet werden, so dass der Versuchsplan entsprechend Tabelle 2 geändert wurde. Bei langsamer Steigerung der Dosis wurden die genannten Symptome nicht mehr beobachtet.

4.5.2 Begleitende Blutserumuntersuchungen

Vor, während und nach der Behandlungsphase wurden stichprobenweise jeweils vor der morgendlichen Fütterung Serumproben von 11 Kälbern entnommen. 9 Kälber erhielten während der Behandlungsphase die Mastdosis und zwei Kälber dienten als Kontrolltiere. Die Serumproben wurden im Labor von Dr. Dr. J. Seiffert auf verschiedene Leber- und Nierenfunktions- und Stoffwechselfparameter untersucht. Alle Parameter sind in den Abbildungen 39-51 anhand der Mittelwerte der Tiere dargestellt. Die Orientierungsmessgrößen für den Normalbereich sind als Querbalken, der Behandlungszeitraum als Längsbalken eingezeichnet. Die physiologischen Bereiche bei Kälbern/Rindern wurden nach Schmidl (1981), Kraft & Dürr (1997) und nach Angaben von Seiffert (1995) zusammengestellt. Die meisten Messwerte aller untersuchten Serumparameter lagen zum Teil mit erheblichen Streuungen im Normalbereich. Im Vergleich der Tiere während der Behandlung zu den Kontrolltieren konnte bei keinem Parameter ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Weder die Leberfunktionswerte AST, GLDH, γ -GT und Bilirubin noch die Nierenfunktionsparameter Harnstoff, Kreatinin und Protein gaben Hinweise auf eine Schädigung dieser Organe. Eventuelle Schädigungen von Organen wären ein wichtiger Hinweis, da sich dadurch die Pharmakokinetik eines Stoffes und damit die Versuchsergebnisse verändern könnten. Lediglich beim Harnstoff konnte mit Behandlungsbeginn ein Abfall der Werte unter den unteren Normbereich beobachtet werden. Erniedrigte Harnstoffwerte weisen auf einen erhöhten Eiweißbedarf hin (Kraft & Schillinger, 1989). Andere Stoffwechselfparameter, wie Kreatinin, Triglyceride, Cholesterin waren dagegen nicht verändert. Die Blutzuckerwerte lagen mit 80-100 mg/dl bei den Versuchskälbern deutlich höher als sie bei wiederkäuenden Rindern zu erwarten sind. Dies spricht dafür, dass die Versuchstiere noch keine Vormagenaktivitäten besaßen (Kraft & Schillinger, 1989). Die Bilirubin- und Cholesteringehalte bewegten sich dagegen in Größenordnungen, wie sie in der Literatur für Rinder angegeben werden.

Darstellung verschiedener Blutserumparameter

Abbildung 39

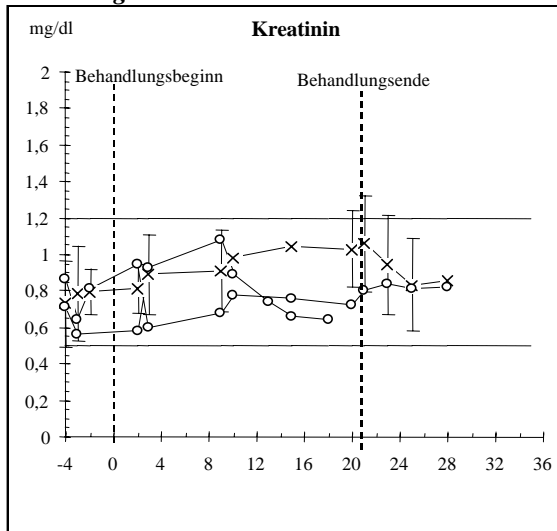


Abbildung 40

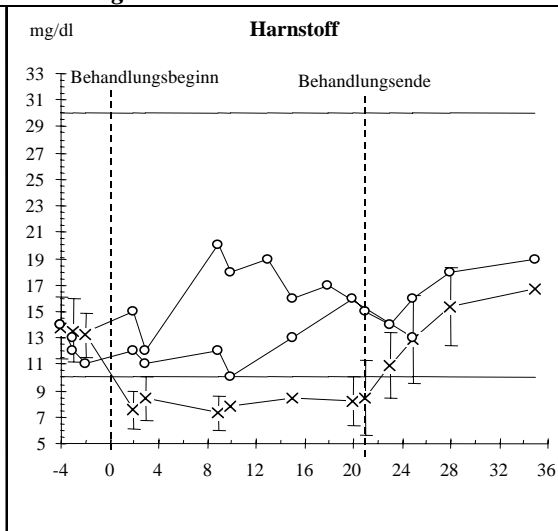


Abbildung 41

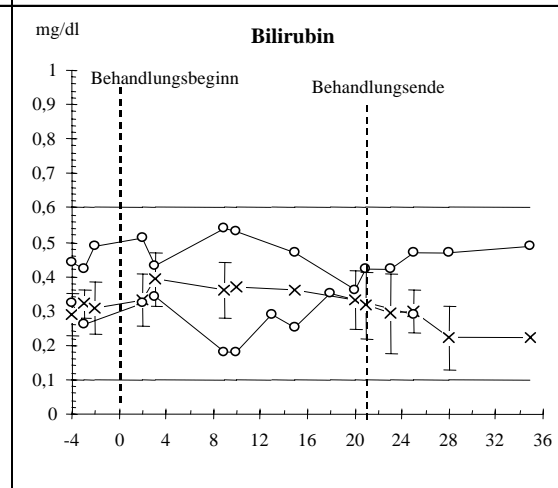
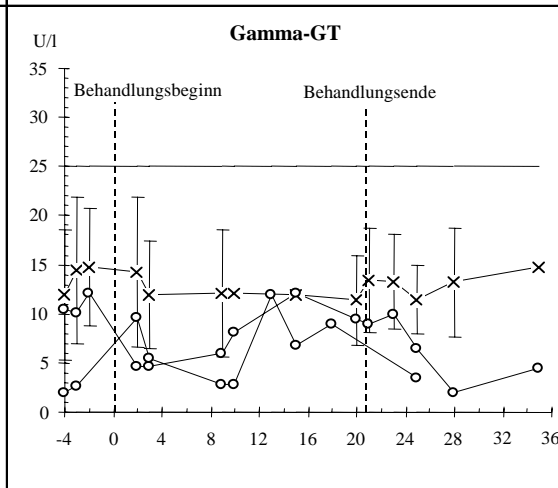
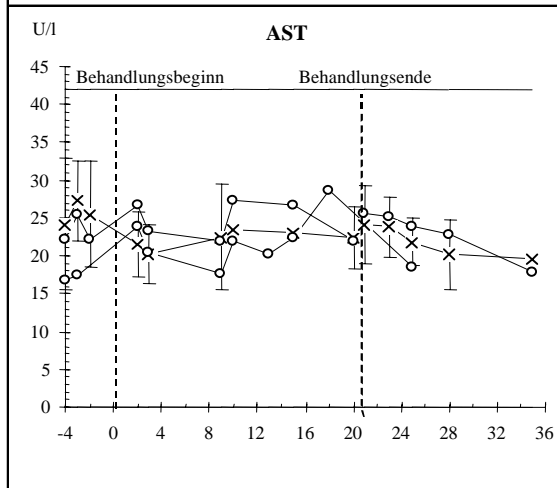
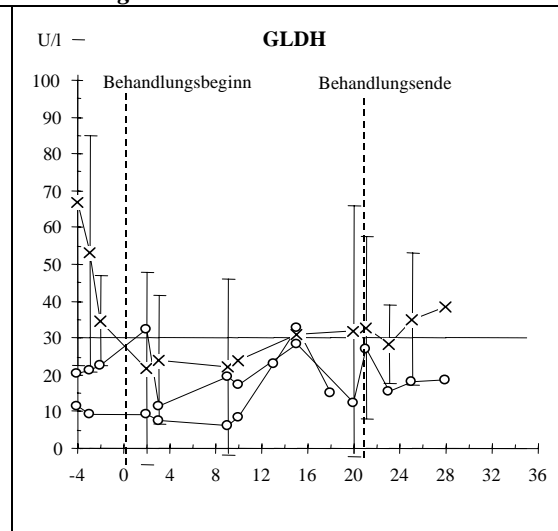


Abbildung 42

-x- = behandelte Tiere (MW, SD von 9 Tieren);

Abbildung 43

-o- = Kontrolltiere (Einzelwerte von 2 Tieren)

Abbildung 44

Darstellung verschiedener Blutserumparameter

Abbildung 45

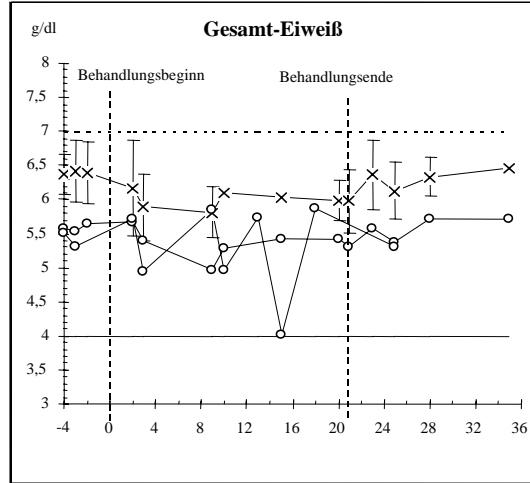


Abbildung 46

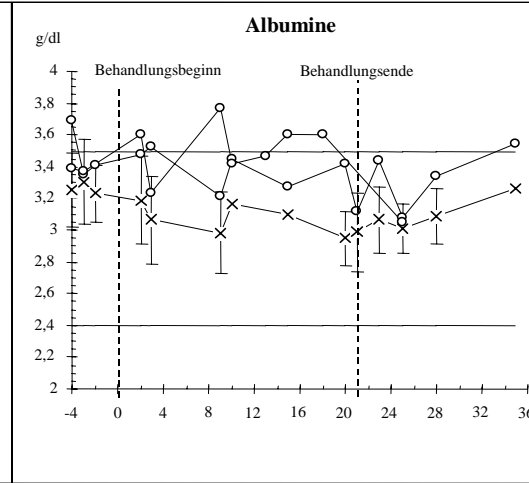


Abbildung 47

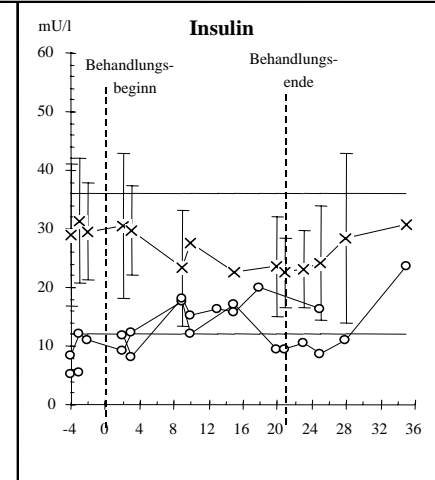
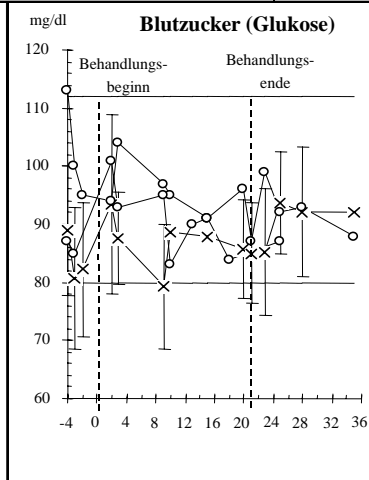
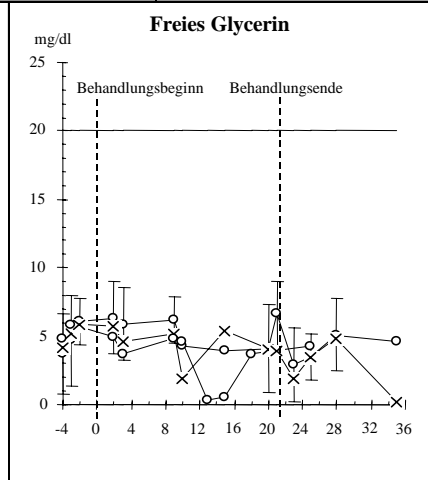
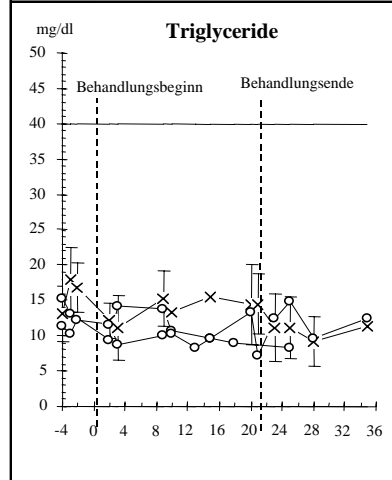
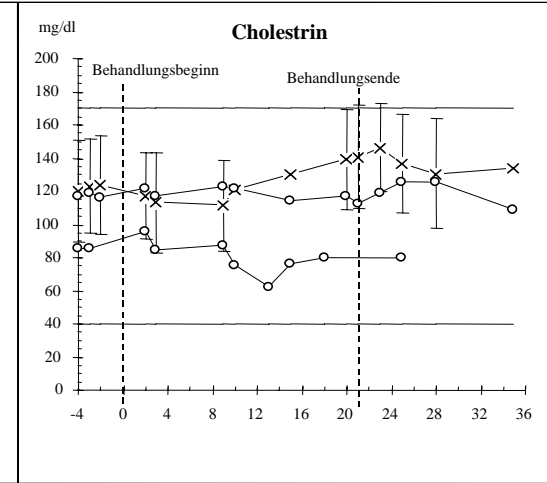


Abbildung 48

Abbildung 49

Abbildung 50

Abbildung 51

-x- = behandelte Tiere (MW, SD von 9 Tieren); -o- = Kontrolltiere (Einzelwerte von 2 Tieren)

4.5.3 Körpergewichte der Tiere

Die Körpergewichte der Kälber sowie deren Zunahmen in der Akklimationsphase, in der Behandlungsphase und in der Postbehandlungsphase sind im Anhang in den Tabellen VII - X zusammen mit den Mittelwerten, Medianwerten und den Standardabweichungen dargestellt. In Abbildung 52 sind die mittleren Gewichtszunahmen der Kälber von Beginn der Behandlung bis zum Versuchsende dargestellt. Die Gewichte der behandelten Tiere sind den nach einer Akklimationsphase gemessenen Gewichten der Kontrolltiere gegenübergestellt. Dargestellt ist jeweils die Differenz zwischen dem Ausgangskörpergewicht zu Behandlungsbeginn und dem am jeweiligen Versuchstag gemessenen Körpergewicht.

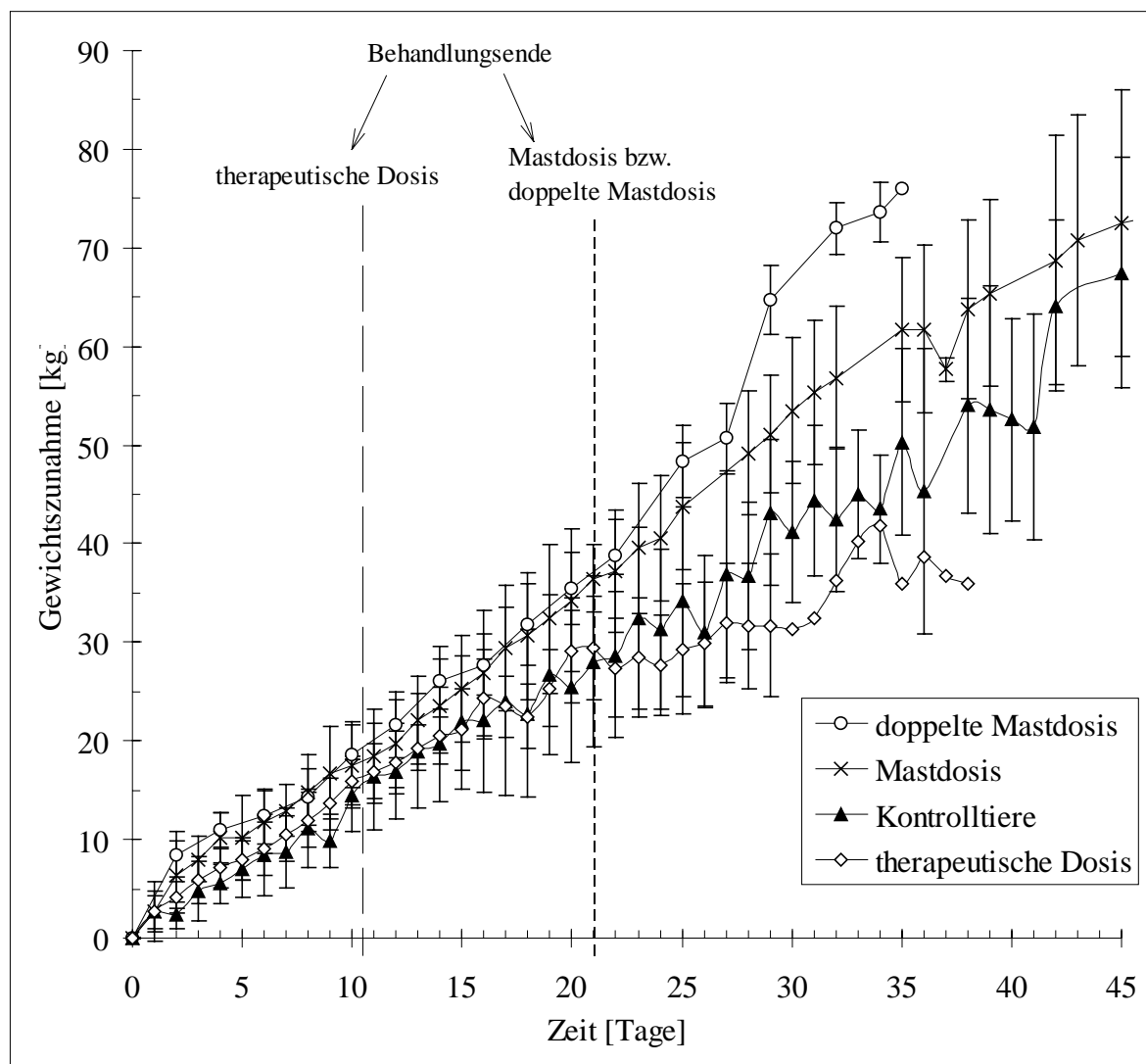


Abbildung 52 Körpergewichtszunahmen vom Beginn der Behandlung bis zum Versuchsende - Darstellung der Mittelwerte