

5 DISKUSSION

5.1 *PHARMAKOKINETIK UND BIOVERFÜGBARKEIT*

In der verfügbaren Literatur über β_2 -Agonisten finden sich wenig Anhaltspunkte über die Pharmakokinetik oder Bioverfügbarkeit von Clenbuterol. Zwar gibt es Studien von Herstellerfirmen, die vor allem die Pharmakokinetik von Clenbuterol bei Kälbern und Kühen nach einmaliger und mehrfacher therapeutischer Dosisgabe untersuchten, die Unterlagen sind aber nicht verfügbar. Versuche zur Pharmakokinetik nach Einmalapplikation von Clenbuterol haben lediglich Zimmer (1976a und b) bei Menschen, Kaninchen und Hunden, Kopitar & Zimmer (1976a und b) bei Ratten und Hunden und Yamamoto & Iwata (1982) beim Menschen durchgeführt, wobei Zimmer (1976a und b) und Kopitar & Zimmer (1976a und b) radioaktiv markiertes Clenbuterol verwendeten.

5.1.1 Versuchsplanung

Die unter 2.9.4 aufgeführten Grundsätze für die Planung von Versuchen zur Pharmakokinetik mit Einzeldosierung konnten im wesentlichen berücksichtigt werden. Lediglich in zwei Punkten wichen die Versuche von diesen Planungsvorgaben ab. So unterschieden sich die den 6 Versuchskälbern oral verabreichten Clenbuteroldosen von den intravenösen Dosen. Die oralen Dosen von 2,5, 5 und 10 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ wurden gewählt, um sicher zu gehen, dass der Konzentrationsverlauf im Blutplasma ausreichend lange verfolgt werden kann. Diese Dosen wurden für die intravenöse Verabreichung nicht gewählt, weil zu befürchten war, dass diese relativ hohen Dosen toxisch wirken oder zumindest zu erhöhten Kreislaufproblemen und damit zum Versuchsabbruch führen könnten. Daher wurden als intravenöse Dosen 1, 2 und 3 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ gewählt und zur Berechnung der Bioverfügbarkeit die Werte um die Dosis korrigiert. Aus den zuvor genannten Gründen wurde auch auf die Verwendung der empfohlenen achtfachen Dosis als höchste Dosis verzichtet. Der für die Analysen der Plasma- und Urinproben auf Clenbuterol verwendete ELISA war mit einer Nachweisgrenze von 0,05 ng/ml für Plasma und 1,07 ng/ml für Urin ausreichend empfindlich. Die Absicherung eines Teils der Proben mittels GC-MS zeigte mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,973 eine gute Übereinstimmung.

5.1.2 Versuchsauswertung

Generell fielen bei der Auswertung der Versuchsergebnisse die Schwankungen der Clenbuterolkonzentrationen im Plasma vor allem nach oraler Applikation auf. Als mögliche Ursache kommen physiologische Stoffwechselprozesse in Frage. So könnte die Rückresorption von Clenbuterol aus dem Darm über den enterohepatischen Kreislauf eine

Rolle spielen. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass der Hauptanteil des verabreichten Clenbuterols über den Urin ausgeschieden wird (Zimmer, 1976a und b). In engem Zusammenhang mit den Einzelergebnissen müssen wahrscheinlich auch die berechneten pharmakokinetischen Parameter gesehen werden. Hier fallen ebenfalls die zum Teil starken intra- und interindividuellen Unterschiede auf. Dies zeigt sich an den relativ hohen Variationskoeffizienten, die sich zwischen 13 und 157 % bewegen. Die Untersuchungen zur Pharmakokinetik werden anscheinend oft von individuellen Schwankungen beeinflusst. So berichten auch Sinn (1989) nach Behandlung von Pferden mit Phenprocoumon, Dreimann (1992) nach Behandlung von Menschen mit Valproinsäure und von Katzen mit Carbamazepin sowie Al-Tahan (1985) nach Versuchen mit Clonazepam beim Hund von starken individuellen Schwankungen bei verschiedenen pharmakokinetischen Parametern.

5.1.2.1 Orale Applikation

Modell

Die Pharmakokinetik von Clenbuterol nach oraler Einmalapplikation ließ sich besser mit einem offenen Ein-Kompartiment-Modell als mit einem Zwei-Kompartiment-Modell beschreiben. Dies lässt sich mit der raschen Verteilung von Clenbuterol im Körper erklären, was einen eher monoexponentiellen Abfall der Konzentration zur Folge hatte. Im Versuch von Zimmer (1976b) wurde aufgrund der stärker biphasisch verlaufenden Elimination die Plasmaspiegelkurve nach Clenbuterolapplikation beim Menschen durch ein Zwei-Kompartiment-Modell mit Seitenkompartiment und bei Ratten im Versuch von Kopitar & Zimmer (1976a) mit einem Zwei-Kompartiment-Modell beschrieben. Da beim Kaninchen und beim Hund das meiste Clenbuterol innerhalb der ersten 9 Stunden ausgeschieden wurde, ist die Plasmakurve nur über dieses Zeitintervall mit einem Ein-Kompartiment-Modell ausgewertet worden (Zimmer, 1976a).

Resorption

Clenbuterol wurde nach oraler Applikation von 2,5, 5 bzw. 10 µg/kg KG schnell resorbiert. Bereits 15 Minuten nach der Applikation konnte ein Anstieg der Clenbuterolkonzentration im Blutplasma nachgewiesen werden. Meyer & Rinke (1991) stellten bei Kälbern einen Anstieg im Blutplasma 20 Minuten bis 1 Stunde nach der Clenbuterolgabe fest. Auch Stoffel (1993) konnte nach einer Behandlung von Kühen mit 5 µg Clenbuterol/kg KG bei der ersten Probenahme nach 2 Stunden bereits Konzentrationen im Bereich von 0,3-0,7 ng/ml nachweisen. Der bereits nach 30 Minuten messbare Anstieg der Clenbuterolkonzentration im Plasma wird auch von Zimmer (1976a und b) beim Mensch, Kaninchen und Hund bestätigt.

Die maximale Clenbuterolkonzentration wurde unabhängig von der eingesetzten Dosis im Mittel nach 3,9 Stunden (SD 1,64 h; ME 3,8 h) erreicht, wobei die Maximumwerte der

einzelnen Tiere zwischen 1,5 und 7 Stunden lagen. Die Schwankungen lassen sich damit erklären, dass sich der Clenbuterolspiegel über diesen Zeitraum auf dem gleichen Niveau bewegte. Ein solches Plateau über 2-7 Stunden konnten auch Meyer & Rinke (1991) nachweisen, die 7 Kälber über 21 Tage täglich zweimal mit 5 µg Clenbuterol/kg KG behandelten. Nach Einmalapplikation einer oralen Clenbuteroldosis wurde das Plasmaspiegelmaximum beim Menschen nach 2-3 Stunden (Zimmer, 1976b; Yamamoto & Iwata, 1982) beim Kaninchen nach 3 Stunden, beim Hund nach 2 Stunden (Zimmer, 1976a) bzw. nach 7 Stunden und bei der Ratte nach 30 Minuten (Kopitar & Zimmer, 1976b) bzw. nach 2,5 Stunden (Kopitar & Zimmer, 1976a) erreicht. Einen maximalen Plasmaspiegel nach 2,5-3 Stunden erreichten auch Evans et al. (1973) nach Einmalapplikation einer oralen Dosis Salbutamol.

Die maximale Clenbuterolkonzentration lag nach Verabreichung einer Dosis von 2,5 µg/kg KG bei 0,6 ng/ml (SD 0,60 ng/ml; ME 0,4 ng/ml), nach einer Dosis von 5 µg/kg KG bei 0,6 ng/ml (SD 0,35 ng/ml; ME 0,5 ng/ml) und nach einer Dosis von 10 µg/kg KG bei 1,6 ng/ml (SD 1,44 ng/ml; ME 1,1 ng/ml). Die mittlere Konzentration über den Zeitraum von 1,5 bis 7 Stunden (Plateau) lag nach Verabreichung einer Dosis von 2,5 µg/kg KG bei 0,6 ng/ml, nach einer Dosis von 5 µg/kg KG bei 0,5 ng/ml und nach einer Dosis von 10 µg/kg KG bei 1,4 ng/ml. Meyer & Rinke (1991) erzielten mit einer Dosis von 5 µg Clenbuterol pro kg KG vergleichbare Ergebnisse am 1. Behandlungstag. Sie ermittelten eine mittlere Plateaukonzentration von 0,5 ng Clenbuterol/ml Plasma.

Wie die vorangegangenen Werte bereits zeigen, hat Clenbuterol eine relativ kurze Resorptionsphase. Dies unterstreichen auch die Resorptionshalbwertszeiten. Zwischen den Dosierungen 2,5 und 5 µg Clenbuterol pro kg KG konnten keine Unterschiede bei den Resorptionshalbwertszeiten festgestellt werden. Hier wurden Zeiten von 15-80 Minuten und im Mittel von 45 Minuten ermittelt. Bei der Dosierung 10 µg/kg KG lagen sie zwischen 50-150 Minuten und im Mittel bei 90 Minuten. Meyer & Rinke (1991) erzielten bei den mit einer Dosis von 5 µg Clenbuterol/kg KG behandelten Kälbern mit Resorptionshalbwertszeiten von 40-80 Minuten vergleichbare Ergebnisse. Invasionshalbwertszeiten von 60 Minuten beschrieb Zimmer (1976a und b) nach einmaliger Clenbuterolapplikation beim Menschen und Hund. Bei Ratten betrug sie 114 Minuten (Kopitar & Zimmer, 1976a).

Verteilung

Eine Distributionsphase war nicht kalkulierbar, da sich Clenbuterol offensichtlich schneller im Körper verteilt hat, als es in den Blutkreislauf resorbiert werden konnte. Dies beeinflusste, wie bereits ausgeführt, die Wahl des pharmakokinetischen Modells zur Berechnung der Parameter.

Elimination

Zur Bestimmung der Wirkungsdauer ist die Eliminationshalbwertszeit eines Medikamentes von besonderem Interesse. Die Eliminationshalbwertszeit war dosisunabhängig. Die Werte schwankten zwischen 3,4 und 19,5 Stunden und lagen im Mittel bei 8,5 Stunden (SD 4,15 h; ME 7,5 h). Die Eliminationshalbwertszeit war damit kürzer als die von Meyer & Rinke (1991) ermittelten Ergebnisse. Meyer & Rinke stellten einen biphasischen Verlauf der Clenbuterolelimination aus dem Plasma von Kälbern fest, wobei die Eliminationshalbwertszeit für die erste Phase 15 Stunden betrug. Beim Menschen und bei der Ratte beschrieben Kopitar & Zimmer (1976a) ebenfalls eine biphasische Eliminationskurve nach oraler Clenbuterolapplikation mit Halbwertszeiten für die längere Phase von 35 bzw. 26 Stunden. Zimmer (1976a) konnte wesentlich kürzere Halbwertszeiten für die Elimination beim Kaninchen von 1,5 Stunden und beim Hund von 1 Stunde bestimmen. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Wirkungsdauer von Clenbuterol bei Kälbern kürzer ist als beim Mensch und bei Ratten aber länger als bei Kaninchen und Hund.

5.1.2.2 Intravenöse Applikation

Modell

Die Pharmakokinetik von Clenbuterol nach intravenöser Einmalapplikation von 1, 2 und 3 µg/kg ließ sich sehr gut mit einem offenen Zwei-Kompartiment-Modell beschreiben. Ausdruck dafür war auch der biphasische Kurvenverlauf der Clenbuterolelimination. Hier dauerte die Verteilung von Clenbuterol offensichtlich länger als die Zirkulationszeit des Blutes im Körper. Kopitar & Zimmer (1976a) benutzten für die Beschreibung der Plasmaspiegelkurve nach intravenöser Clenbuterolapplikation bei Ratten ein Zwei-Kompartiment-Modell mit Seitenkompartiment und zusätzlichem Invasionskompartiment für den anfänglich starken Abfall und anschließenden Anstieg der Konzentrationskurve.

Verteilung

Die Zeit, die Clenbuterol für den Transfer vom zentralen in das periphere Kompartiment benötigte, war dosisunabhängig. Die Werte lagen, bedingt durch die starken intra- und interindividuellen Streuungen, zwischen 3 Minuten und 6,5 Stunden mit einem Mittelwert von 1,5 Stunden (SD 1,64 h; ME 1,2 h). Die Halbwertszeiten für die Verteilung bewegten sich bis auf einen Wert zwischen 4 und 56 Minuten, wobei der Mittelwert bei 22 Minuten (SD 24,6 Minuten; ME 15 Minuten) lag. Kopitar & Zimmer (1976a) ermittelten bei Ratten nach Clenbuterolgabe eine wesentlich längere Halbwertszeit von 3,6 Stunden. Große Unterschiede zeigte auch das scheinbare Verteilungsvolumen. Die Verteilungsvolumina der 6 Kälber lagen unabhängig von der Dosis zwischen 0,6 und 4,0 l/kg und im Mittel bei 1,9 l/kg (SD 1,07 l/kg; ME 1,6 l/kg).

Elimination

Wie bereits angedeutet, zeigt die Elimination von Clenbuterol aus dem Blutplasma einen biphasischen Kurvenverlauf. Durch zusätzliche Verteilungsprozesse zwischen dem zentralen und peripheren Kompartiment fällt die Konzentration anfänglich steiler ab als im späteren Teil der Kurve, wo fast ausschließlich Eliminationsprozesse den Konzentrationsabfall bestimmen. Die Eliminationshalbwertszeiten betragen nach Verabreichung einer Dosis von 1 µg Clenbuterol pro kg KG 2,9 Stunden (SD 1,92 h), nach einer Dosisgabe von 2 µg/kg 3,4 Stunden (SD 1,13 h) und nach einer Dosisgabe von 3 µg/kg 5 Stunden (SD 1,49 h). Es konnte keine signifikante Dosisabhängigkeit festgestellt werden. Kopitar & Zimmer (1976a) erhielten bei Ratten ebenfalls eine biphasische Eliminationskurve nach intravenöser Clenbuterolapplikation. Allerdings stellten sie mit 26 Stunden eine wesentlich längere Halbwertszeit fest.

Obwohl ein direkter Vergleich von Ratten und Kälbern (preruminant) fraglich ist, so fällt doch auf, dass die von Kopitar & Zimmer (1976a) bei Ratten für die eigentliche Eliminationsphase ermittelten Halbwertszeiten nach oraler und intravenöser Dosis mit 26 Stunden erheblich länger sind als die Eliminationshalbwertszeiten von 8,5 Stunden nach oraler Dosis und 3,9 Stunden (SD 1,67 h; ME 3,6 h) nach intravenöser Dosis bei den hier verwendeten Mastkälbern.

5.1.2.3 Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit einer Substanz ist ein wichtiger Parameter, um den Anteil des aktiven Wirkstoffs aus einer verabreichten Arzneiform messen zu können, der dem Körper und damit auch dem Zielgewebe tatsächlich zu Verfügung steht, wobei auch die Geschwindigkeit der Resorption des Stoffes in die Berechnungen einfließt (Fichtl, 1995). Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde in die Berechnung der Bioverfügbarkeit die Gesamtkörperclearance mit einbezogen, weil hier starke Unterschiede zwischen den Werten festgestellt wurden (Pfeifer et al. (1995). Die Clearance war dosisunabhängig. Sie lag nach oraler Dosis zwischen 0,08 und 2,40 l/kg·h⁻¹ (MW 0,70 l/kg·h⁻¹; SD 0,585 l/kg·h⁻¹; ME 0,51 l/kg·h⁻¹) und nach intravenöser Dosis zwischen 0,34 und 2,27 l/kg·h⁻¹ (MW 1,07 l/kg·h⁻¹; SD 0,747 l/kg·h⁻¹; ME 0,69 l/kg·h⁻¹). Außerdem ging, wie bereits diskutiert (s. 5.1.1), die Dosis in die Berechnung der Bioverfügbarkeit mit ein.

Clenbuterol wurde oral als Reinsubstanz in Form von Clenbuterolhydrochlorid über die Milchaustauscher-Tränke verabreicht. Es war in dieser Form sehr gut verfügbar. Die Bioverfügbarkeit betrug im Mittel 89 % (SD 17,4 %; ME 84 %), wobei die Werte zwischen 60 % und 146 % schwankten. Die Werte, welche eine Bioverfügbarkeit von >100 %

vortäuschten, stammen von einem Tier und sind nur aus einer intravenösen Dosis berechnet worden. Da das Tier krankheitsbedingt später aus dem Versuch herausgenommen wurde, können vielleicht nicht erkennbare, den Stoffwechsel bereits verändernde Parameter die Bioverfügbarkeit beeinflusst haben. Die anderen pharmakokinetischen Parameter des Tieres waren allerdings auch bei dieser Dosis unauffällig. Werden die betreffenden 3 Werte bei der Berechnung des Mittelwertes nicht berücksichtigt, so erhält man immer noch eine orale Bioverfügbarkeit von 85 % (ME 83 %) mit einer Streuung von 11,2 %. Zimmer (1976a und b) schlossen aus der Tatsache, dass nach Verabreichung von radioaktiv markiertem Clenbuterol beim Menschen und beim Kaninchen die gesamte und beim Hund 75 % der Radioaktivität hauptsächlich renal wieder ausgeschieden wurde, auf eine vollständige bzw. 75 %ige Aufnahme von Clenbuterol in den Körper. Auch bei Ratten wurde eine vollständige Aufnahme von Clenbuterol in den Körper festgestellt (Kopitar & Zimmer, 1976a). Karg (1989) spricht in seinen Ausführungen über Clenbuterol ebenfalls von einer 100 %igen oralen Bioverfügbarkeit.

5.1.2.4 Elimination über den Urin

Clenbuterol wird zum größten Teil über den Urin eliminiert. Beim Kaninchen werden 92 %, beim Hund 74 % (Zimmer, 1976 a) und beim Menschen 87 % (Zimmer, 1976 b) und beim Kalb 59-66 % (Heitzman, 1996) über den Urin ausgeschieden. Daher war auch für die vorliegende Arbeit die Eliminationskinetik von Clenbuterol aus dem Urin von Interesse. Die Ergebnisse können allerdings nur orientierenden Charakter besitzen, da der Versuchsansatz nicht auf die Eliminationskinetik von Clenbuterol über den Urin ausgerichtet war. Nach intravenöser Dosis von 1, 2 und 3 µg Clenbuterol pro kg KG wurde die maximale Urinkonzentration bei allen Tieren mit Ausnahme eines Tieres (4 Stunden) zwischen 0,5 und 2,5 Stunden erreicht. Nach oraler Dosis von 2,5, 5 und 10 µg Clenbuterol pro kg KG lag sie zwischen 2,5 und 12 Stunden (Tabelle 30).

Tabelle 30 Clenbuterolkonzentration (C) [ng/ml] im Urin zu verschiedenen Zeiten nach der letzten Applikation (ELISA-Ergebnisse: Leerwert korrigiert)

Dosis [µg/kg]	Tier [OM]	Clenbuterolkonzentration zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten					
		t = 0,5 h	Cmax	tmax [h]	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
2,5	22	2,90	41,2	12	3,23	-	-
	27	2,84	37,9	3	0,43	-	-
	31	0,68	20,4	3	0,23	0,17	0,02
	32	0,26	31,1	8	4,32	-	-
	33	0,62	62,5	5	-	-	-
5	22	3,19	54,1	10	0,24	-	-
	23	11,61	499,0	4,5	3,04	-	-
	27	4,03	86,8	3	3,14	-	-
	31	67,27	67,3	0,5	0,57	-	-
	32	0,42	62,4	4	0,19	-	-
	33	1,51	73,3	5	1,42	-	-
10	22	9,16	247,6	11	0,49	-	-
	23	12,60	381,4	4	0,32	-	-
	27	19,96	101,1	2,5	1,22	-	-
	31	18,91	115,9	5	17,76	-	-
	32	12,36	117,9	3,5	4,20	-	-
	33	8,46	289,1	6	4,27	3,21	1,10

Die maximalen Urinkonzentrationen waren im Mittel mit 39 ng/ml (Dosis 2,5 µg/kg), 140 ng/ml (Dosis 5 µg/kg) und 209 ng/ml (Dosis 10 µg/kg) ca. 65 bis 240fach höher als die maximalen Plasmakonzentrationen. 24 Stunden nach der Clenbuterolapplikation wurden im Urin mit 2,1 ng/ml (Dosis 2,5 µg/kg), 1,4 ng/ml (Dosis 5 µg/kg) und 4,7 ng/ml (Dosis 10 µg/kg) noch ca. 10-20fach höhere Werte gemessen als im Plasma. Meyer & Rinke (1991) ermittelten nach zweiwöchiger Behandlung von Kälbern mit einer Dosis von zweimal täglich 5 µg/kg KG Konzentrationen im Urin die 40mal höher waren als die im Plasma.

5.2 RÜCKSTANDSPROBLEMATIK

In Deutschland ist Clenbuterol als Therapeutikum zur Behandlung von Tieren seit 1978 und in den meisten Mitgliedsstaaten seit Mitte der achtziger Jahre zugelassen. Clenbuterol und andere β_2 -Agonisten wurden schnell auch als Verbesserer der Mast- und Schlachtleistung bei landwirtschaftlichen Nutztieren bekannt. Eine Anwendung von β_2 -Agonisten zu diesen Zwecken wurde unter anderem deswegen EG-weit nicht genehmigt, weil zur Erzielung solcher Effekte so hohe Dosen notwendig wären, dass sie zu einer Akkumulation im Körper der Tiere führen und damit den Verbraucher gefährden würden.

In der vorliegenden Arbeit standen die Möglichkeiten der Überwachung des Clenbuteroleinsatzes im Vordergrund des Interesses. Dabei bildete die Frage, ob zwischen einer legalen therapeutischen und einer illegalen Behandlung zur Verbesserung des Masteffektes unterschieden werden kann, einen wichtigen Gesichtspunkt.

Inzwischen ist seit Juni 1997 die Anwendung von Clenbuterol in der Tierproduktion europaweit stark eingeschränkt worden. Clenbuterol darf demnach nur noch als Tokolytikum bei gebärenden Kühen und bei Pferden sowie zur Bekämpfung von Erkrankungen der Atemwege bei Pferden eingesetzt werden. Die Zulassung für einige clenbuterolhaltige Präparate ruht zur Zeit, weil beim Europäischen Gerichtshof die Klage eines Herstellers gegen die Richtlinie 96/22/EG und die Verordnung (EG) Nr. 1312/96 anhängig ist. Die festgelegten Höchstmengen (MRLs) gelten vorläufig bis zum 01.07.2000.

Die Überwachung des Clenbuteroleinsatzes erfolgt im Bereich der Tierproduktion zum einen im Erzeugerbetrieb und zum anderen auf dem Schlachthof. Blutplasma, Urin, Kot und Haare sind vor allem für die Überwachung im Erzeugerbetrieb von Interesse. Bei der Rückstandsüberwachung auf dem Schlachthof stehen theoretisch Schlachttierkörper und Körperflüssigkeiten für die Probenahme zur Verfügung. Die Matrices für die vorliegenden Versuche wurden unter folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

- Die Matrix sollte routinemäßig während der Schlachtung zu entnehmen sein,
- sie sollte ein Zielgewebe für Clenbuterol darstellen,
- sie sollte mit einer routinefähigen Nachweismethode zu analysieren sein,
- Clenbuterol sollte möglichst lange und in hohen Konzentrationen nachzuweisen sein und
- die für die Überwachung auf dem Schlachthof auf der Grundlage der Verordnung (EWG) 2377/90 des Rates für Leber, Niere und Muskel vorgeschlagenen Höchstmengen (s. 1.1) sollten diskutiert werden.

Ausgewählt wurden Leber, Niere und Musculus glutaeus, Retina/Uvea und Gallenflüssigkeit.

5.2.1 Blutplasma

Die Überprüfung der Möglichkeit, mit Hilfe eines Grenzwertes bereits im landwirtschaftlichen Betrieb Tiere, die eine therapeutische von denen, die eine illegale höhere Dosis erhielten, unterscheiden zu können, war eine Aufgabe dieser Arbeit. Quirke (1994a) schlug für Plasma auf der Grundlage interner Studien der Firma Boehringer und der Untersuchungsergebnisse von Sauer et al. (1993 und 1995) einen Grenzwert von 2 ng/ml vor.

Um generell die Möglichkeit der Festlegung eines Grenzwertes überprüfen zu können, wurden die Plasmakonzentrationskurven von 6 Kälbern, die mit einer therapeutischen Dosis von täglich 2 x 0,8 µg/kg KG behandelt wurden, mit den Kurven von 8 Tieren verglichen, die höhere Dosen von täglich 2 x 10 µg/kg KG (= Mastdosis; 5 Tiere) bzw. bis zu 2 x 20 µg/kg KG (= doppelte Mastdosis; 3 Tiere) erhielten (genaues Dosierschema s. Tabelle 12). Abbildung 53 stellt alle Einzelwerte und Abbildung 54 stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen im Plasma zusammen mit dem von Quirke (1994a) vorgeschlagenen Grenzwert und der Nachweisgrenze der Methode graphisch dar.

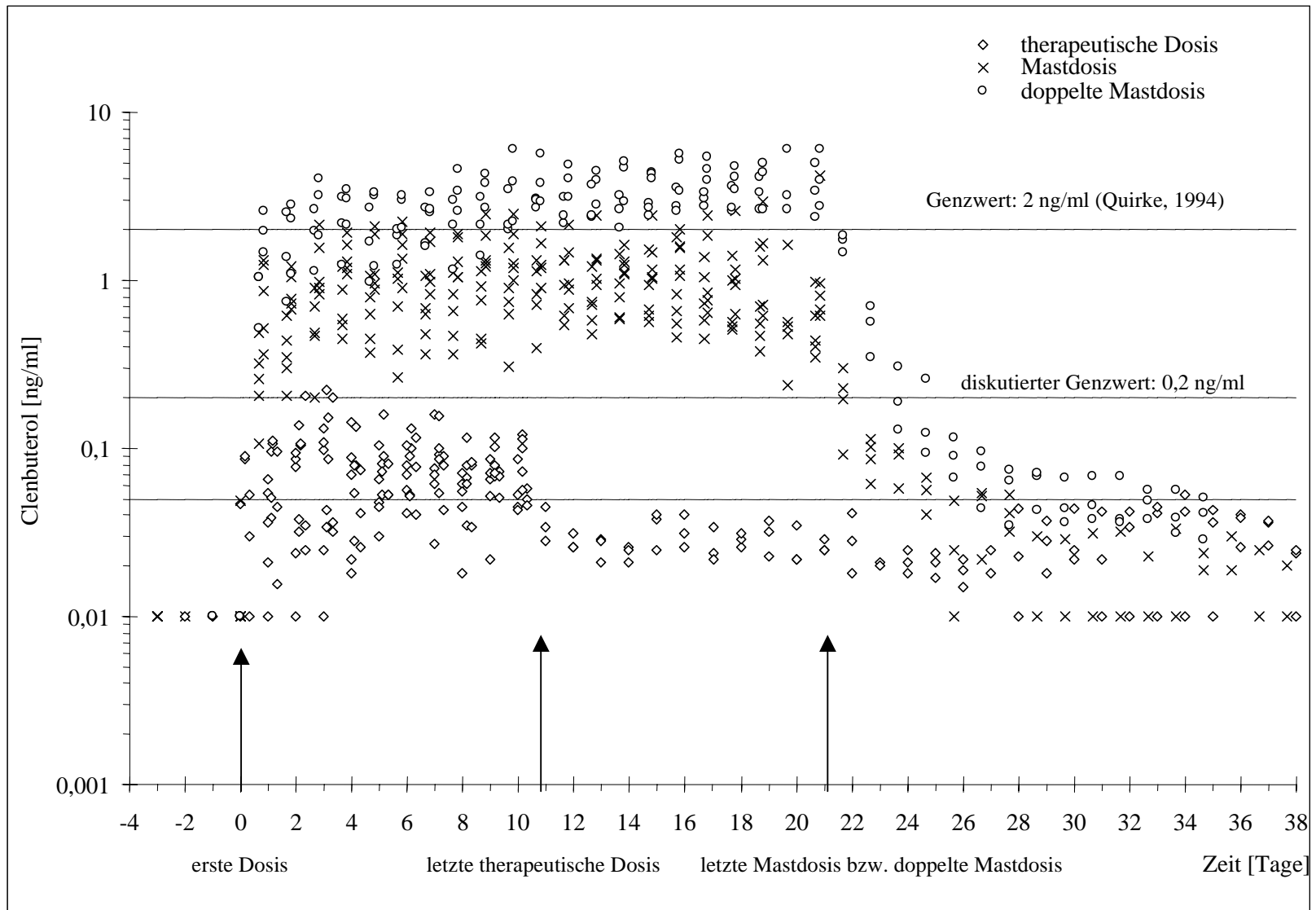


Abbildung 53 Clenbuterolgehalte im Plasma von 14 Tieren, die mit 3 verschiedenen Dosen behandelt wurden (Einzelwerte)

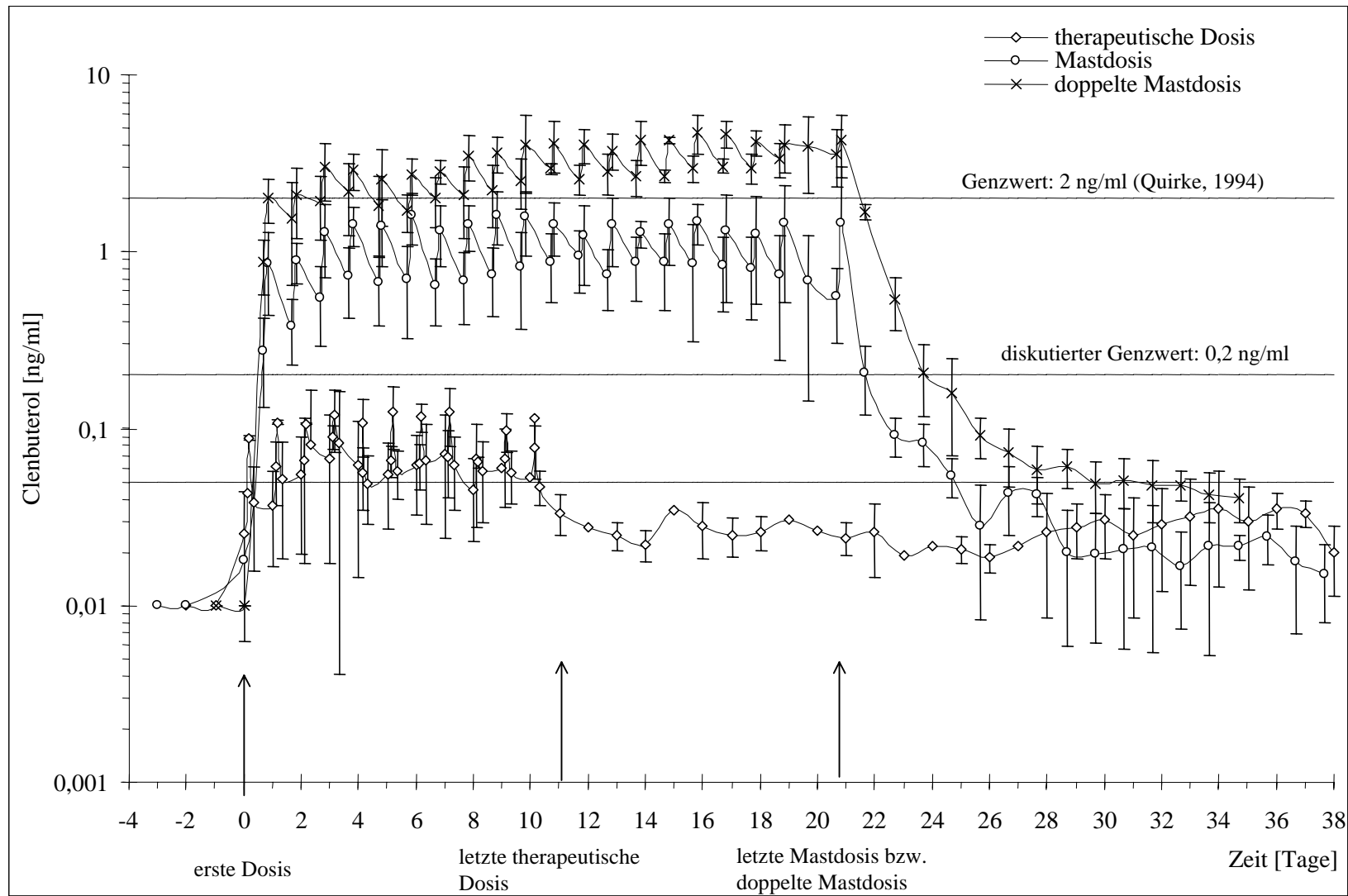


Abbildung 54

Plasmaverlaufskurven von 14 Tieren, die mit 3 verschiedenen Dosen behandelt wurden (MW \pm SD)

Eine deutliche Trennung zwischen den Werten aus der Behandlung der Kälber mit der Mastdosis und den Werten der Kälber, die mit der doppelten Mastdosis behandelt wurden, ist nicht zu erkennen. Auch die Werte der therapeutischen Dosis sind nicht in jedem Fall deutlich von den Werten der höheren Dosen zu unterscheiden. Während der therapeutischen Dosis lag der Mittelwert zum Zeitpunkt der höchsten Clenbuterolgehalte 4 Stunden nach Dosisgabe bei 0,105 ng/ml (SD 0,028 ng/ml; ME 0,103 ng/ml).

Während der Verabreichung der Mastdosis lag der Mittelwert zum Zeitpunkt der niedrigsten Plasmakonzentration bei 0,713 ng/ml (SD 0,363 ng/ml; ME 0,613 ng/ml) und zum Zeitpunkt der höchsten Plasmakonzentration bei 1,35 ng/ml (SD 0,607 ng/ml; ME 1,2 ng/ml; MIN 0,365 ng/ml; MAX 4,245 ng/ml), d.h. auch diese Werte waren zum größten Teil unterhalb eines Grenzwertes von 2 ng/ml angesiedelt. Quirke (1994b) ermittelte dagegen bei gleichem Applikationsschema mit Clenbuterolgehalten im Mittel von 7,24 ng/ml (SD 3,700 ng/ml, MIN 0,6 ng/ml; MAX 20 ng/ml) wesentlich höhere Konzentrationen.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wäre ein Grenzwert von 2 ng/ml deutlich zu hoch angesetzt und ein Großteil der Werte, die von Tieren stammen, die mit einer illegalen Dosis von 10 µg/kg KG behandelt wurden, wäre mittels dieses Grenzwertes von der Überwachung nicht erkannt worden. Als Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen wäre dieser eher im Bereich von 0,2 ng/ml anzusiedeln, aber auch hier ist keine eindeutige Trennung zwischen therapeutischer Dosis und Mastdosis möglich. Bei den eigenen Versuchen lagen lediglich während der Applikationsphase der doppelten Mastdosis die meisten Werte oberhalb des Grenzwertes von 2 ng/ml (s. Tabelle 26, Abbildungen 53 und 54).

Vergleichbare Arbeiten über Clenbuterolgehalte im Plasma von Kälbern während der Behandlung mit einer therapeutischen Dosis über 10 Tage sind außerdem von Rinke (1990) und Gleixner & Meyer (1995) bekannt. Die Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimum- und Maximumwerte sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31 Clenbuterolgehalte von Kälbern im Plasma während der Behandlung mit einer therapeutischen Dosis von 2 x 0,8 µg/kg KG über 10 Tage

Anzahl Tiere	Anzahl Proben	MW	SD	MIN	MAX	Autor
6	60	0,080	0,038	<NG	0,223	eigene Untersuchungen
4	58	0,107	0,031	0,054	0,190	Rinke (1990)
6	60	0,254	0,114	0,065	0,467	Gleixner & Meyer (1995)
20	180	0,444	0,234	0,109	1,762	Quirke (1994b)

Als zusätzliches Kriterium wurde von Quirke (1994a) jeglicher Nachweis von Clenbuterol im Plasma nach 7 Tagen Wartezeit als Beweis für eine illegale Anwendung angesehen. Diese Aussage gilt auch für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Bereits 24 Stunden nach Verabreichung der letzten therapeutischen Dosis konnte bei keinem Tier mehr Clenbuterol im messbaren Bereich festgestellt werden (s. Anhang, Tabelle II). Die Proben, die 7 Tage nach der letzten Mastdosis entnommen wurden, wiesen Clenbuterolgehalte im Bereich der Nachweisgrenze auf (s. Anhang, Tabelle III). Ab dem 8. Tag war kein Clenbuterol mehr nachweisbar. Bei den 3 Tieren, die mit der doppelten Mastdosis behandelt wurden, konnte Clenbuterol im Plasma bis zum 5., 8. bzw. bis zum letzten Tag der Probenahme (14. Tag) gefunden werden. Gleixner & Meyer (1995), die Kälber mit einer therapeutischen Dosis behandelten, wiesen dagegen Clenbuterol im Plasma nach zwei Tagen Wartezeit bei allen 6 Tieren, nach acht Tagen bei einem Tier und nach 15 Tagen bei keinem Tier mehr nach.

Auffallend waren die gegenüber der Studie der Firma Boehringer (Quirke, 1994b; Sauer et al., 1993 und 1995) wesentlich geringeren Clenbuterolgehalte im Plasma, sowohl bei der therapeutischen als auch bei der Mastdosis. Eine mögliche Erklärung wäre die Tatsache, dass bei den eigenen Versuchen die Kälber mit einem Milchaustauscher getränkt wurden, um die Tiere möglichst praxisnah zu halten. In der Studie der Firma Boehringer wurden die Tiere dagegen mit Grassilage und Futterkonzentrat gefüttert. Ergebnisse der Versuche von Rinke (1990) und Gleixner & Meyer (1995), bei denen die Kälber ebenfalls mit Milchaustauscher gefüttert wurden, bestätigen für die therapeutische Dosis eher die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen (s. Tabelle 31). Bisher gibt es in der verfügbaren Literatur keine Hinweise auf Studien, die sich mit Unterschieden bei der Pharmakokinetik von Clenbuterol zwischen ruminanten und preruminanten Kälbern beschäftigen.

5.2.2 Urin

Für die Festlegung eines Grenzwertes zur Unterscheidung zwischen therapeutischer und illegaler Dosis im Erzeugerbetrieb kam als Matrix auch Urin in Betracht. Auf der Grundlage interner Studien der Firma Boehringer und der Ergebnisse von Sauer et al. (1993 und 1995) schlug Quirke (1994a) einen Grenzwert für Urin von 20 ng/ml vor. Urin schied als Matrix für die vorliegende Arbeit aus, da die Clenbuterolgehalte im Urin starken Schwankungen unterliegen. Während der Behandlung von Kühen mit Dosen von 2, 5 und 10 µg Clenbuterol pro kg KG lagen die gemessenen Urinkonzentrationen bei Degand et al. (1992) zwischen 2 und 200 ng/ml, 10 und 700 ng/ml sowie zwischen 20 und 800 ng/ml (Werte aus den Diagrammen entnommen). Diese Werte lassen bereits erkennen, dass gemessene Konzentrationen sowohl über als auch unter dem empfohlenen Grenzwert lagen. Wird der Grenzwert den Ergebnissen der Versuche von Rinke (1990) und Degand et al. (1992)

zugrunde gelegt, so liegen ein Teil der Werte von Kälbern, die eine Dosis von 2 x täglich 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Clenbuterol pro kg KG erhielten, auch über diesem und umgekehrt ein Teil der Werte von Kälbern, die Dosen von 2 x 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG bzw. 1 x 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG erhielten, darunter (s. Abbildung 55). Bei allen Dosierungen sind wiederum die starken Konzentrationsunterschiede während des Behandlungszeitraumes zu erkennen. Die Ergebnisse der Studien zeigen bereits deutlich, dass eine Abgrenzung zwischen Tieren, die mit der therapeutischen Dosis und Tieren, die mit der einer illegalen Dosis behandelt wurden, nicht möglich war.

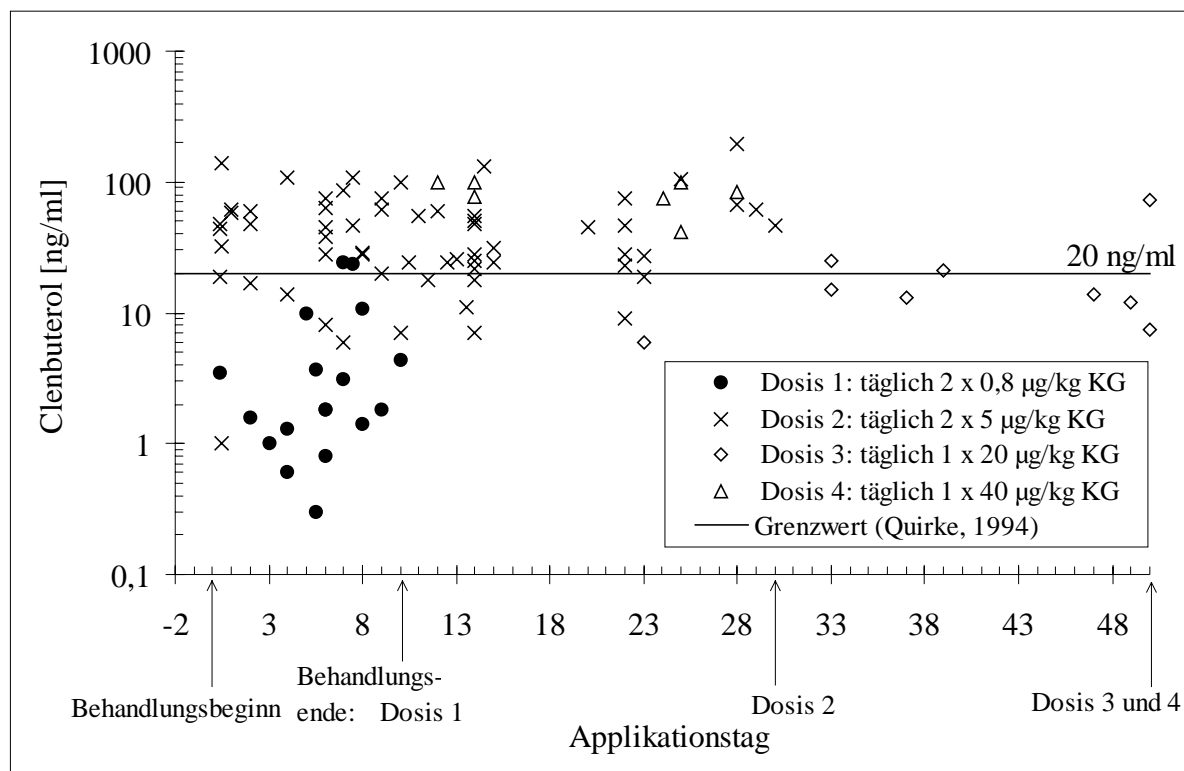


Abbildung 55 Clenbuterolkonzentrationen im Urin während einer Applikation von verschiedenen Dosen (Dosis 1 und 2: Rinke, 1990; Dosis 3 und 4: Degand et al., 1992)

Nach Quirke (1994a) kann jeglicher Clenbuterolnachweis im Urin nach 14 Tagen als zusätzliches Kriterium für eine illegale Anwendung angesehen werden. Diese Aussage konnte aufgrund mangelnder Vergleichsmöglichkeiten und fehlender eigener Untersuchungen nicht überprüft werden. Lediglich Rinke (1990) untersuchte im Urin von 7 Kälbern die Clenbuterolkonzentrationen zu verschiedenen Zeiten nach der letzten Applikation einer Dosis von 2 x 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG über 21 Tage und konnte am 13. Tag, dem letzten Entnahmetag der Entzugsphase, Clenbuterol im Bereich von 0,05 ng/ml nachweisen. Degand et al. (1992) entnahmen Urinproben von einem Kalb 8 und 14 Tage nach der letzten Behandlung (Dosis: 20 μg Clenbuterol pro kg KG für 25 Tage) und erhielt Gehalte von 75 und $< 0,2$ ng/ml.

5.2.3 Kot

Kot schied für die Aufgabenstellung in dieser Arbeit als Matrix ebenfalls aus, da davon auszugehen war, dass die weitaus größere Menge des Clenbuterols über den Urin ausgeschieden wird (Zimmer, 1976a und b; Heitzman, 1996; Zalko et al., 1996). Außerdem musste, ähnlich wie beim Urin, mit größeren Schwankungen der Clenbuterolkonzentration gerechnet werden, da aufgrund der Stoffwechselprozesse im Körper nicht von einer gleichmäßigen Verteilung des Clenbuterols im Kot ausgegangen werden konnte. Des Weiteren ist die Extraktion von Clenbuterol aus dem Kot weitaus aufwendiger, so dass die Praktikabilität für Routineuntersuchungen noch zu prüfen wäre.

5.2.4 Haare

Haare waren für die Festlegung von Grenzwerten ebenfalls nicht geeignet, da sie äußerlich leicht kontaminiert werden können (Elliott et al., 1996). Außerdem ist eine eindeutige Abgrenzung zwischen therapeutischer und illegaler Dosis nicht möglich, da die Clenbuterolkonzentrationen relativ stark schwanken. Godfrey et al. (1996), die Haare nach einer Clenbuterolbehandlung mit einer therapeutischen bzw. einer illegalen Dosis von täglich $2 \times 10 \mu\text{g/kg KG}$ untersuchten, ermittelten Maximalwerte von $59,9 \mu\text{g/kg}$ (SD $38,7 \mu\text{g/kg}$) und $1720 \mu\text{g/kg}$ (SD $528,8 \mu\text{g/kg}$). Die Einzelwerte sind zwar nicht aufgeführt, aber die graphisch dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen lassen bereits die starken Unterschiede zwischen den Werten erkennen. Haare werden trotzdem weiterhin für die Rückstandsüberwachung als Screeningmatrix von Interesse sein, insbesondere weil Clenbuterol und vermutlich auch andere β_2 -Agonisten über lange Zeit und in hohen Konzentrationen nachzuweisen und Haare außerdem ohne weiteres für die Probennehmer zugänglich sind (Appelgren et al., 1996; Dürsch, 1992).

5.2.5 Leber, Muskel, Niere, Galle und Retina/Uvea

Clenbuterol reicherte sich in allen untersuchten Geweben und in der Galle an. Die stärkste Anreicherung wurde in der Retina/Uvea gemessen. Die Konzentrationen in Leber und Niere waren dagegen wesentlich niedriger. Zwischen den Clenbuterolkonzentrationen in Leber und Niere konnten zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Diese Ergebnisse werden durch Versuche von Meyer & Rinke (1991), Sauer et al. (1995) und Appelgren et al. (1996) bestätigt. Noch geringere Gehalte wiesen Galle gefolgt von Muskel auf. Im Muskel wurden auch bei Meyer & Rinke (1991) und Appelgren et al. (1996) die geringsten Konzentrationen nachgewiesen. Sauer et al. (1995) fanden in der Galle ähnlich hohe Konzentrationen wie in der Niere.

Clenbuterol wurde aus den untersuchten Geweben bis auf Retina/Uvea schnell eliminiert. Zum Teil erfolgte die Ausscheidung bei Leber, Niere und Plasma biphasisch. Retina/Uvea zeigten während der gesamten Zeit einen linearen Konzentrationsabfall. Die Halbwertszeiten lagen hier dosisunabhängig zwischen 100 und 250 Stunden. Nach der letzten therapeutischen Dosis konnte außerdem aufgrund des geringen Anfangsgehaltes in den anderen Matrices nur für Leber eine Eliminationshalbwertszeit von 7 Stunden ermittelt werden. Nach der letzten Mastdosis lagen die Halbwertszeiten der Gewebe und von Galle zwischen 8-11 Stunden und von Plasma bei 22 Stunden. Nur von Leber und Niere konnten auch Zeiten für eine zweite Phase von 106 und 20 Stunden ermittelt werden. Sauer et al. (1995), die Kälber mit dem gleichen Dosierschema behandelten, erhielten mit 185 ng/ml in der Leber und 190 ng/ml in der Niere über doppelt so hohe Anfangsgehalte. Die Eliminationshalbwertszeiten für beide Phasen lagen für Leber bei 41 und 170 Stunden und für Niere bei 31 und 153 Stunden. In beiden Studien zeigten Leber und Niere übereinstimmend zwar gleich hohe Anfangsgehalte, aus der Niere wurde Clenbuterol aber schneller eliminiert als aus der Leber. Sauer et al. (1995) ermittelten auch für Galle mit 24 Stunden (α -Phase) und 126 Stunden (β -Phase) längere Eliminationshalbwertszeiten. Für Plasma verlief bei diesen Versuchen die Eliminationskurve sogar dreiphasig, mit Zeiten von 19, 57 und 120 Stunden. Wie bereits in der Diskussion der Plasmaergebnisse festgestellt, fanden Sauer et al. (1995) auch in den Geweben und in der Galle bei gleichem Dosierschema höhere Clenbuterolkonzentrationen als in den eigenen Versuchen festgestellt. Als Ursache kommt die schon dort diskutierte unterschiedliche Fütterungsweise der Kälber in Frage. Dafür sprechen auch Ergebnisse von Heitzman (1996) (s. Tabelle 8). Auch hier lagen die Gehalte in verschiedenen Geweben nach einer therapeutischen Dosis bei ruminanten Kälbern um das doppelte bis dreifache höher als bei preruminanten Kälbern. Sauer et al. (1993) wiesen Clenbuterol noch 7 Tage nach einer therapeutischen Dosis in der Leber ruminanter Färsen nach, Degand et al. (1992) konnten dagegen trotz etwas höherer Dosis (2 μ g/kg KG) bereits nach 4 Tagen kein Clenbuterol mehr in der Leber preruminanter Kälber ermitteln.

Clenbuterol war unabhängig von der Dosis als erstes nicht mehr in Muskel und Galle nachweisbar, gefolgt von Niere, Plasma und Leber. In der Retina/Uvea konnte es dagegen bei allen drei Dosierungen bis zur letzten Probenahme nach 14, 28 bzw. 35 Tagen gefunden werden. Diese Ergebnisse bestätigen auch Versuche von Meyer & Rinke (1991), Sauer et al. (1995) und Appelgren et al. (1996).

5.2.5.1 Festlegung von Höchstmengen

Innerhalb der Europäischen Union wurden im Hinblick auf die weitere Zulassung von Clenbuterol für Kälber, Rinder, Schafe und Pferde zu therapeutischen Zwecken auch die Festlegung von Höchstmengen für Leber, Muskel und Milch diskutiert. In Deutschland waren bis zur Festlegung EU-einheitlicher Höchstmengen Beurteilungswerte für Leber und Niere festgelegt worden. Im Ergebnisteil wurden die Einzelergebnisse bereits zusammen mit den Höchstmengen und Beurteilungswerten dargestellt (Abbildungen 35-37). Die Abbildungen 56-58 und Tabelle 32 zeigen die Höchstmengen und zum Vergleich die Beurteilungswerte zusammen mit den verfügbaren Ergebnissen verschiedener Autoren und den eigenen Versuchsergebnissen. Die schwarzen Symbole stellen die mit einer therapeutischen Dosis durchgeführten Versuche dar. Generell kann festgestellt werden, dass im Anschluss an die letzte therapeutische Dosis spätestens nach 7 Tagen kein Clenbuterol mehr in der Niere und bereits nach 3 Tagen kein Clenbuterol mehr im Muskel nachzuweisen war. In der Leber konnte Clenbuterol nach 7 Tagen zum Teil noch in Bereichen unterhalb der Höchstmenge gefunden werden, bei der nächsten Probenahme nach 14 Tagen war in keinem Fall mehr Clenbuterol zu finden. Bei den eigenen Versuchen wurde 14 Tage nach der letzten illegalen Dosis von $2 \times 10 \mu\text{g/kg KG}$ (Mastdosis) Clenbuterol in Leber und Niere im Bereich der Höchstmenge und nach 21 Tagen bereits gar nicht mehr nachgewiesen. Im Muskel konnte schon 4 Tage nach einer verabreichten Mastdosis und 7 Tage nach einer doppelten Mastdosis kein Clenbuterol mehr gefunden werden. Auch die Versuche anderer Autoren weisen darauf hin, dass nach einer illegalen Dosis bei Einhaltung der für die therapeutische Anwendung vorgeschriebenen Wartezeit von 28 Tagen die Clenbuterolgehalte bereits unterhalb der Höchstmengen lagen. Da die Clenbuterolelimination nicht in allen Versuchen bis zu einem Gehalt unterhalb der Höchstmenge verfolgt wurden (s. Tabelle 32), ist deren Aussagekraft in dieser Hinsicht stark eingeschränkt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen also deutlich, dass die vorgeschlagenen Höchstmengen so hoch angesetzt sind, dass kein mit einer therapeutischen Dosis behandeltes Tier, bei dem die bisher angegebenen Wartezeit von 28 Tagen eingehalten wurde, noch Gehalte oberhalb der Höchstmenge aufweisen würde. Die Höchstmengen sind allerdings kaum dazu geeignet, illegal behandelte Tiere zu erkennen, da auch bei den meisten dieser Tiere die Rückstandsmengen unterhalb der Höchstmengen liegen würden.

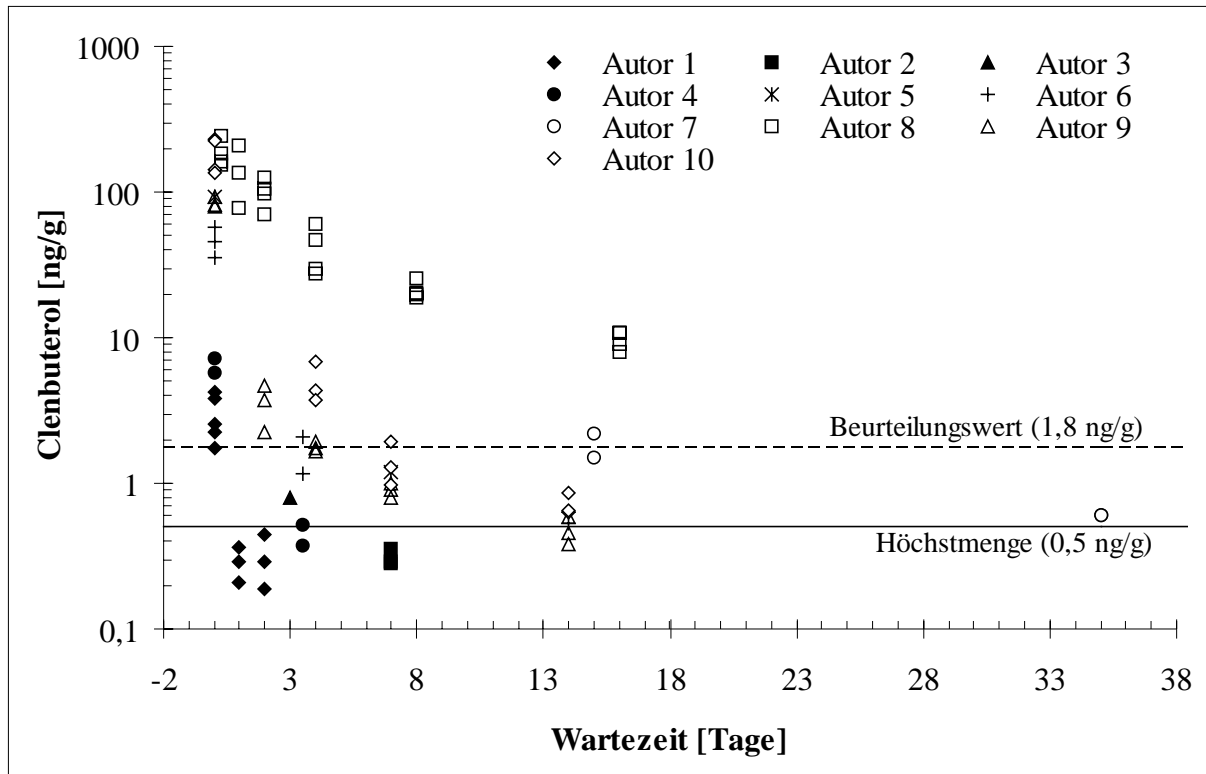


Abbildung 56 Clenbuterolgehalte in Lebern zu verschiedenen Zeiten nach der letzten Dosis, Einzelergebnisse verschiedener Autoren (Einzelheiten s. Tabelle 32 nach den Abbildungen)

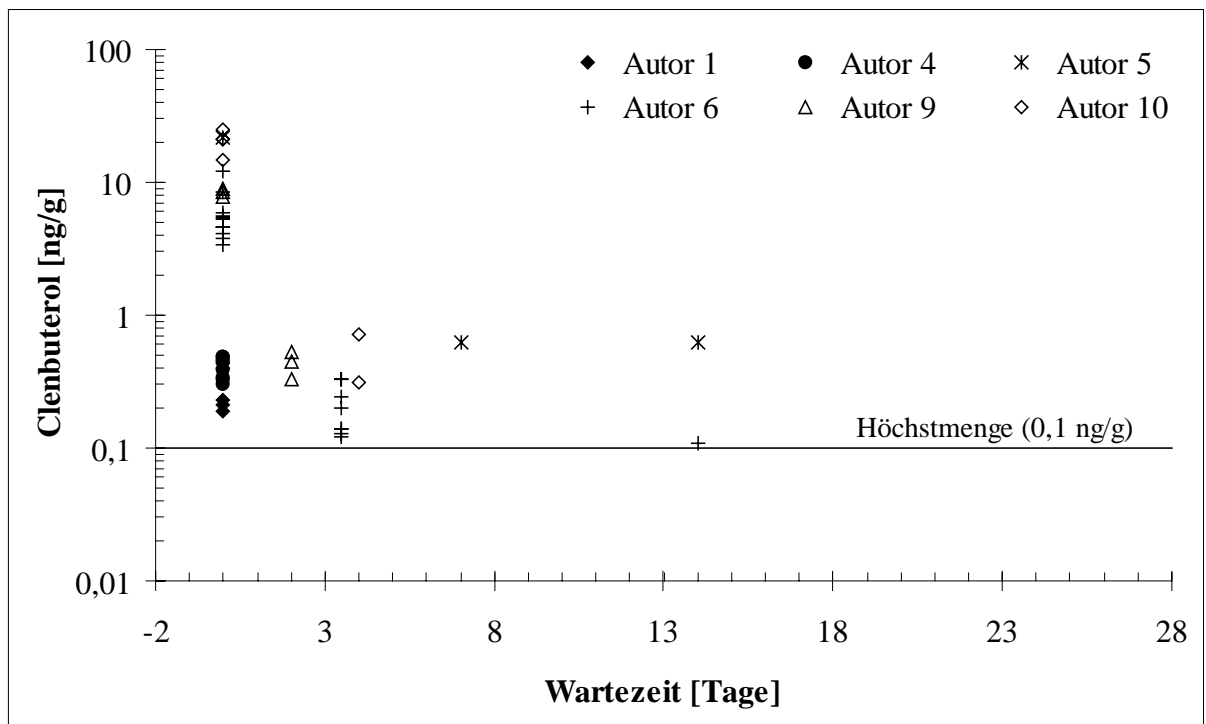


Abbildung 57 Clenbuterolgehalte im Muskel zu verschiedenen Zeiten nach der letzten Dosis, Einzelergebnisse verschiedener Autoren (Einzelheiten s. Tabelle 32)

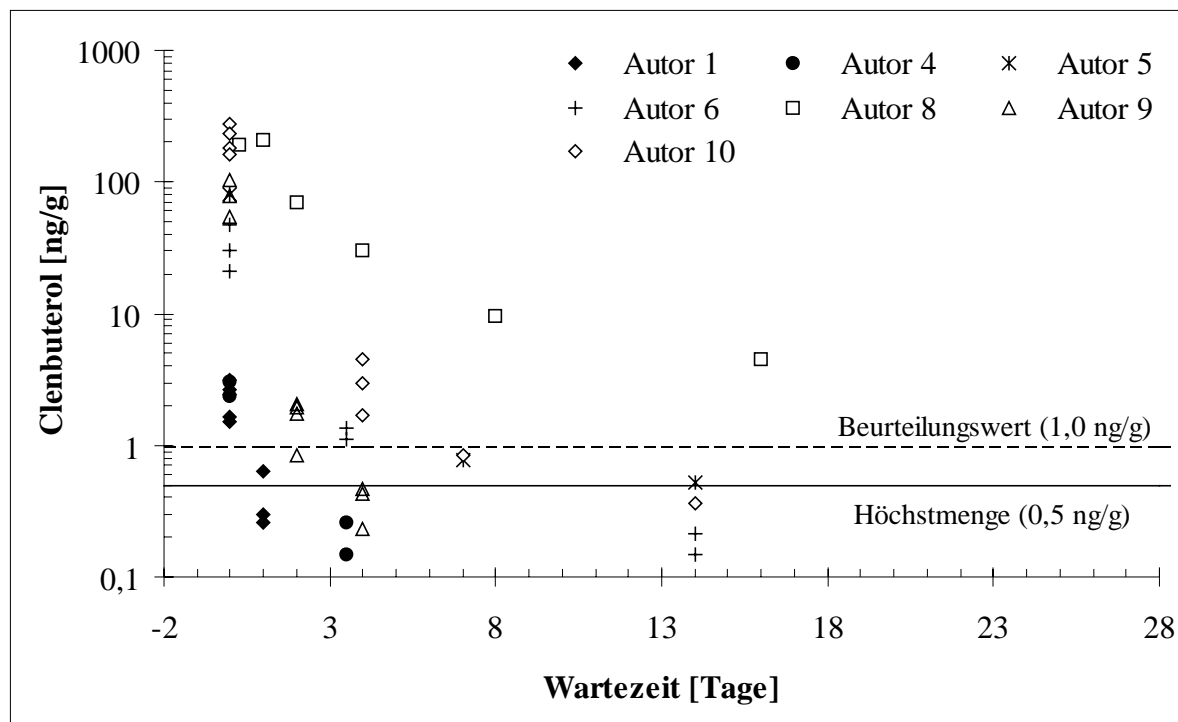


Abbildung 58 Clenbuterolgehalte in Nieren zu verschiedenen Zeiten nach der letzten Dosis, Einzelergebnisse verschiedener Autoren (Einzelheiten s. Tabelle 32)

Tabelle 32 Überblick über die Versuchsanordnungen der in den Abbildungen 56-59 dargestellten Ergebnisse verschiedener Autoren

Nr Autor und Jahr	Tierart	Dosierschema	letzter Tag des Nachweises (NW)			letzter Probenahme-tag
			L	N	M	
1 Eigene Untersuchungen	Kälber (pr)	2 x 0,8 µg/kg KG über 10,5 Tage	2	1	0	28
2 Sauer et al. (1993)	Färsen (r)	1,6 µg/kg KG über 4 Tage	7	-	-	7
3 Degand et al. (1992)	Kälber (pr)	2 µg/kg KG über 11 bzw. 15 Tage	3	-	-	7
4 Rinke (1990)	Kälber (pr)	2 x 0,8 µg/kg KG über 10 Tage	3,5	3,5	0	3,5
5 Appelgren et al. (1996)	Kälber (r)	2 x 5 µg/kg KG über 21 Tage	7	14	14	14
6 Rinke (1990)	Kälber (pr)	2 x 5 µg/kg KG über 21 Tage	14	3,5	3,5	14
7 Elliott et al. (1993a)	Färsen (r)	16 µg/kg KG über 30 Tage	56	-	-	140
8 Quirke (1994a und b); Sauer et al. (1995); Sauer & Limer (1993)	Kälber (r)	2 x 10 µg/kg KG über 21 Tage	16	16*	-	16
9 Eigene Untersuchungen	Kälber (pr)	2 x 10 µg/kg KG über 21 Tage	14	4	2	35
10 Eigene Untersuchungen	Kälber (pr)	2 x 10 bis 2 x 20 µg/kg über 21 Tage (Schema s. Tabelle 12)	14	14	4	14
11 Elliott et al. (1995)	Färsen (r)	1,6 µg/kg KG über 7 Tage	kein NW			42
12 Sauer & Anderson (1994)	Kälber (r)	1,5 mg/Tier/Tag über 21 Tage	-	-	-	64

*Ergebnisse aus dem Diagramm entnommen M = Muskel; L = Leber; N = Niere
r = ruminant; pr = preruminant

5.2.5.2 Pigmentierte Gewebe des Auges

Im Hinblick auf eine weitgehende Anwendungsbeschränkung von Clenbuterol zu therapeutischen Zwecken und ein vollständiges Anwendungsverbot von anderen β_2 -Agonisten gewinnen zunehmend Gewebe an Bedeutung, in denen β_2 -Agonisten lange Zeit und in hohen Konzentrationen nachzuweisen ist. Lediglich in den pigmentierten Geweben des Auges wurde Clenbuterol bei jedem der in Tabelle 32 aufgeführten Versuche bis zum jeweils letzten Probenahmetag nachgewiesen. Die Clenbuterolkonzentrationen und Probenahmezeiträume sind anhand der Mittelwerte und, wenn möglich, der Standardabweichungen in Abbildung 59 dargestellt. Clenbuterol konnte bis zur letzten Probenahme nach einer therapeutischen Dosis am 42. Tag (Elliott et al., 1995) und nach einer illegalen Dosis am 140. Tag (Elliott et al., 1993a) noch nachgewiesen werden. Bei keinem der mit therapeutischer Dosis durchgeführten Versuche wurden Clenbuterolgehalte über 200 ng/g festgestellt werden. Bis auf einen Versuch von Rinke (1990) lagen die Clenbuterolkonzentrationen nach einer illegalen Dosis um das 5-10fache über den Gehalten nach einer therapeutischen Dosis. Die ermittelten Rückstandskonzentrationen lassen damit Rückschlüsse auf die eingesetzte Dosis zu. Aufgrund der genannten Tatsachen ist bei dieser Matrix eine Unterscheidung zwischen therapeutischer und Mastdosierung in gewissen Grenzen zwar leichter als bei anderen Matrices möglich, aber auch hier ist die Aussagekraft stark vom Bekannt sein der Wartezeit abhängig.

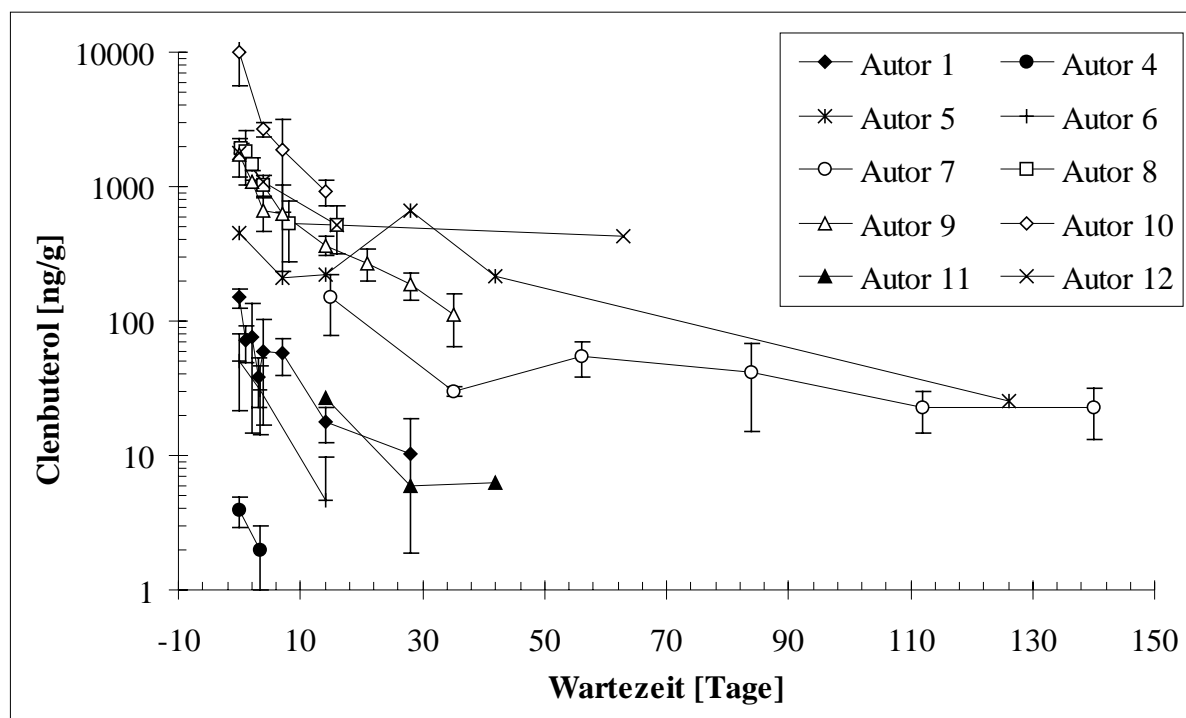


Abbildung 59 Clenbuterolkonzentration in pigmentierten Geweben des Auges zu verschiedenen Zeiten nach der letzten Dosis, Ergebnisse verschiedener Autoren (Einzelheiten s. Tabelle 32)

5.2.5.3 Modell zur Unterscheidung zwischen therapeutischer und Mastdosis

In den meisten Fällen ist bei einem Clenbuterolnachweis nicht bekannt, wann das Tier zum letzten Mal behandelt wurde. Daher ist es im Falle eines Rückstandsnachweises nicht möglich, Rückschlüsse auf die eingesetzte Dosis zu ziehen und so zwischen therapeutischer und illegaler Dosis zu unterscheiden. Anhand der vorhandenen Ergebnisse wurde versucht, mittels eines Quotienten, der aus den Rückstandsgehalten zweier Matrices gebildet wird (s. auch 4.4), die Wartezeit zu bestimmen.

In den in Frage kommenden Matrices sollte(n):

- die Substanz eine möglichst hohe und dennoch unterschiedliche Anfangskonzentration aufweisen,
- der Rückstandsgehalt über einen möglichst langen Zeitraum oberhalb der Bestimmungsgrenze einer analytischen Methode bleiben, d.h. die Halbwertszeiten müssen ausreichend lang sein,
- die Substanz unterschiedliche Halbwertszeiten aufweisen und sich dosisunabhängig verhalten und
- die Eliminationskurven einen gleichen Verlauf aufweisen (ideal wäre ein monoexponentieller, d.h. linearer Verlauf).

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten diese Voraussetzungen nicht erfüllt werden. Clenbuterol wurde aus den meisten der untersuchten Matrices so schnell eliminiert, dass der Verlauf nicht lange genug verfolgt werden konnte. Es konnten keine zwei Matrices mit ähnlichen Eliminationsprofilen gefunden werden. Außerdem war die biologisch bedingte Streuung der Messwerte sowohl zwischen den Tieren als auch im Verhältnis der Matrices zueinander sehr hoch und konnte durch die Bildung eines Quotienten nicht ausgeglichen werden. Damit ist das auf theoretischen Überlegungen basierende Modell für die Praxis nicht anwendbar.

Die Möglichkeit, über die Bildung von Quotienten verschiedene Aussagen zu treffen, wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. So haben Sauer et al. (1995) anhand von Quotienten zwischen Leber und Niere, Diaphragma, Galle sowie Urin zu verschiedenen Zeiten nach der letzten Clenbuteroldosis festgestellt, dass in der Leber nicht nur die höchsten Anfangskonzentrationen gemessen werden, sondern auch die Elimination im Verhältnis langsamer verläuft. Sie empfahlen daher Leber als geeignetste Matrix für ein Monitoring. Gleixner & Meyer (1995) schlossen anhand von Quotienten zwischen den Clenbuterolkonzentrationen von Plasma und Augen auf eine Korrelation zwischen den beiden Matrices. Sie konnten mit diesem Ansatz individuelle Streuungen ausgleichen und ein

Merkmal für eine therapeutische Behandlung definieren. Dieser Ansatz scheint aber für eine Anwendung in der Praxis wenig praktikabel zu sein, da während der Behandlung ermittelte Plasmagehalte mit Gehalten in Augen nach 28 Tagen Wartezeit verglichen werden.

5.3 STOFFWECHSEL UND KÄLBERGESUNDHEIT

Nebenwirkungen

Nach Verabreichung von Clenbuterol konnten während der Versuche zur Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit sowie zum Rückstandsverhalten Nebenwirkungen wie Muskelzittern, erhöhte Atem- und Herzfrequenz und Schweißausbruch beobachtet werden. Diese traten in der ersten Stunde nach intravenöser und 3-5 Stunden nach oraler Applikation auf und hielten bis zu 12 Stunden an. Beermann et al. (1986) beschrieben bei Lämmern nach einer oralen Cimeterolbehandlung eine Erhöhung der Herzfrequenz um 80-120 %, die nach 2,5 Stunden auftrat und 12-24 Stunden anhielt. Der arterielle Blutfluss steigerte sich innerhalb von 2-4 Stunden auf 218 % und war 24 Stunden später noch um 164 % erhöht. Zimmerli & Blum (1990) stellten am ersten Tag eine signifikante Erhöhung des Minutenvolumens und der Herzfrequenz, aber nicht der Atemfrequenz bei Kälbern innerhalb von 6 Stunden nach Verabreichung von Clenbuterol fest. Diese Effekte konnten am 14. und 28. Behandlungstag nicht mehr beobachtet werden. Zimmerli & Blum führen die Erhöhung der Herzfrequenz auf eine Verminderung des Blutdrucks zurück. Auch Herbert et al. (1985) und Eisemann et al. (1988) stellten nach einer Clenbuterolgabe ebenfalls eine Verdoppelung der Herzfrequenz und des Blutflusses bei Rindern bzw. Lämmern am ersten, aber nicht mehr am neunten Behandlungstag fest. Die eigenen Ergebnisse und die Ergebnisse aus der Literatur lassen erkennen, dass die beschriebenen Nebenwirkungen hauptsächlich während der ersten Behandlungstage auftraten und dass nach längerer Applikation Gewöhnungseffekte zu beobachten waren. Als eine mögliche Ursache kann der von Lefkowitz et al. (1983) und Stiles et al. (1984) beschriebene Regulationsmechanismus für β -Rezeptoren angesehen werden, wonach es durch Langzeitapplikation oder Applikation von hohen Dosen von β -Rezeptor-Agonisten zu einer Verminderung der Rezeptorzahl oder einer Desensibilisierung des Rezeptors kommt. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass ein legaler Einsatz hoher Clenbuteroldosen über längere Zeit schon aus Gründen des Tierschutzes nicht in Betracht kommt.

Blutserumparameter

Die von den Kälbern während der 21-tägigen Behandlung mit einer Dosis von 10 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ 16 Stunden nach der letzten Fütterung entnommenen Blutproben wurden zur Kontrolle der Kälbergesundheit auf verschiedene Serumparameter untersucht. Veränderungen der

Serumparameter können auf Schädigungen von Niere und Leber hinweisen, wodurch die Pharmakokinetik von Clenbuterol beeinflusst werden könnte. Der Gehalt der untersuchten Leberenzyme AST, GLDH, γ -GT lag im Normalbereich, ebenso der Bilirubingehalt. Ricks et al. (1984) konnten dagegen bei Rindern während einer Behandlung mit 10 mg Clenbuterol/Tier/Tag eine Erhöhung des Serum-AST-Gehaltes feststellen. Eine erhöhte Ausschüttung der Enzyme bzw. des Bilirubins ins Blut könnte auf akute oder chronische Hepatitiden verbunden mit Leberzellschäden hinweisen (Schmidl, 1981). Kreatinin und Harnstoff lagen ebenfalls im Normbereich. Kreatinin und Harnstoff sind stickstoffhaltige Endprodukte des Eiweißstoffwechsels, deren Erhöhung unter anderem als Indikator für eine Niereninsuffizienz dient (Schmidl, 1981).

Neben den erwähnten Auswertungskriterien sollten die untersuchten Serumparameter weiterhin Auskünfte über Clenbuterol-bedingte, langfristige Veränderungen des Stoffwechsels geben. Clenbuterol beeinflusst durch seine Hauptwirkung auf die β_2 -Rezeptoren sowohl den Fettstoffwechsel als auch den Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel (ausführlich unter 2.4.3 beschrieben). Anhand der untersuchten Parameter konnte während des Behandlungszeitraumes lediglich ein Absinken der Harnstoffwerte nachgewiesen werden, deren Abweichung von den Normalwerten nicht signifikant war. Ursache könnte ein vermehrter Eiweißbedarf bedingt durch einen erhöhten Muskelstoffwechsel sein. Alle anderen Parameter zeigten keine langfristigen Veränderungen außerhalb des Normbereiches. Eisemann et al. (1988) fanden bei Rindern nach einer Clenbuterolgabe (8 mg/Tier/Tag) eine signifikante Erhöhung der Glucosegehalte im Plasma am ersten, aber nicht mehr am neunten Behandlungstag. Zimmerli & Blum (1990) konnten ebenfalls am ersten Behandlungstag innerhalb der ersten sechs Stunden einen Anstieg der Plasmakonzentration an Glukose, Laktat, Insulin und freien Fettsäuren bei Kälbern nach einer Clenbuterolbehandlung (10 μ g/kg KG/Tag) feststellen, der am 14. und 28. Tag nicht mehr nachweisbar war. Beermann et al. (1986) berichteten dagegen über signifikante Verringerungen der Insulin- und Glucosewerte im Plasma von Lämmern nach Cimaterolgabe (10 mg/kg/Tag) in der zweiten und vierten Behandlungswoche, was auf einen Langzeiteffekt hinweist. Einen reduzierenden Effekt auf die Harnstoff-, Insulinkonzentration bei Erhöhung der Konzentration an Kreatinin, freien Fettsäuren, AST und ALT konnten auch Quirke et al. (1988) durch eine Cimaterolgabe (33, 49,5 und 66 mg/Tier/Tag) an Rinder nachweisen. Beim Menschen stellten Baronti et al. (1980) nach Clenbuterol- oder Terbutalingaben keine signifikanten Veränderungen des Glukose-, Gesamt-Protein-, Cholesterin- und Harnstoffspiegel im Blut sowie des Kreatinin- und Bilirubinspiegels im Serum fest.

Die unterschiedlichen Versuchsansätze führen zu wenig vergleichbaren Ergebnissen. Dies kann daran liegen, dass nicht nur Serum sondern auch Blut und Plasma untersucht und die

Versuchstiere nicht nur im nüchternen Zustand sondern auch nach der Nahrungsaufnahme und zu verschiedenen Zeiten beprobt worden sind. Offensichtlich sind Stoffwechselfparameter nur kurze Zeit nach der Gabe von β_2 -Agonisten verändert. Langzeiteffekte wurden selten beobachtet. Diese Erkenntnisse stimmen insofern auch mit Ergebnissen einer Literaturstudie von Greife & Berschauer (1988) überein. Sie stellten fest, dass es nach akuter Verabreichung von β -Agonisten primär zu einer Mobilisierung der Energiereserven kommt. Dies wird durch den Anstieg von freien Fettsäuren, Glukose, Laktat und Insulin deutlich. Sie konnten nach Langzeitapplikation von geringen Dosen Adaptationseffekte beobachten, die sogar zu einem leichten Rückgang dieser Parameter im Blut führten. Als Ursache wurde der bereits unter „Nebenwirkungen“ diskutierte Regulationsmechanismus für β -Rezeptoren vermutet.

5.4 *SCHLUSSFOLGERUNGEN*

⇒ Clenbuterol wird bei Kälbern im Körper schnell resorbiert und verteilt. Es zeigt mit fast 90 % eine gute Bioverfügbarkeit. Entgegen den Erkenntnissen vorheriger Studien wurde Clenbuterol in den vorliegenden Versuchen relativ schnell wieder aus dem Körper ausgeschieden. Dies könnte auf die Art der Fütterung zurückzuführen sein. Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass Clenbuterol bei mit Milchaustauscher gefütterten Kälbern schneller eliminiert wird als bei Kälbern, die mit Rauhfutter gefüttert werden. Dies würde bedeuten, dass die Pharmakokinetik von Clenbuterol durch die Ausbildung des Pansens verändert wird.

Überwachung bei Zulassung zu therapeutischen Zwecken

⇒ Die Ergebnisse dieser Arbeit aber auch die Ergebnisse anderer Autoren zeigen, dass eine Überwachung des therapeutischen Clenbuteroleinsatzes *im Erzeugerbetrieb* nicht durchführbar ist. Eine Abgrenzung zwischen therapeutisch und illegal behandelten Tieren ist mit Hilfe der von Quirke (1994a) vorgeschlagenen Grenzwerte nicht möglich.

Generell scheint der Ansatz der Festlegung von Grenzwerten zur Unterscheidung zwischen therapeutischer und illegaler Dosis während einer Behandlungsphase fraglich, da sich die Werte zumindest während des Beginns einer Behandlung und während der Entzugsphase überschneiden. In der Praxis sind solche Parameter nicht kalkulierbar. Außerdem ist das Behandlungsschema für eine illegale Dosis ebenfalls eine unbekannte Größe, welche aber den Clenbuterolspiegel in Geweben und Körperflüssigkeiten stark beeinflusst.

Eine Probenahme im Erzeugerbetrieb wäre daher nur sinnvoll, wenn der Tierbesitzer keine therapeutische Behandlung vorgenommen hat, also kein tierärztlicher Beleg vorliegt. Dann wäre die Entnahme von Urin- oder Plasmaproben zu empfehlen. Auch wenn der Clenbuterolgehalt im Urin stärker schwankt, so ist Clenbuterol hier in größeren Mengen und über einen längeren Zeitraum als im Plasma nachzuweisen. Wenn davon ausgegangen wird, dass Clenbuterol mit der Fütterung verabreicht wird, dann liegt der günstigste Zeitpunkt für die Entnahme von Plasmaproben zwischen 3 und 5 Stunden nach der Fütterung.

⇒ **Auf dem Schlachthof** ist dagegen unter Annahme der bisher festgelegten Wartezeit von 28 Tagen jeglicher Clenbuterolnachweis in Proben von Organen, Geweben oder Körperflüssigkeiten ein Indiz für eine Nichteinhaltung der Wartezeit bzw. eine illegale Verwendung von Clenbuterol. Eine Ausnahme bilden lediglich Gewebe wie Haare und die pigmentierten Teile des Auges. Diese Tatsache ist ein Hinweis dafür, dass die Wartezeit zu lang angesetzt ist. Wenn nach einer therapeutischen Behandlung kürzere Wartezeiten festgelegt wären, könnte die Höchstmengenregelung eher greifen. Eine Abgrenzung von illegalen Behandlungen wäre aber auch dann nicht möglich, da aufgrund der schnellen Elimination von Clenbuterol nach einer etwas längeren Wartezeit auch bei solchen Tieren die Höchstmengen nicht mehr überschritten würden.

Bei der Untersuchung von Retina/Uvea ist jeglicher Clenbuterolgehalt über 200 ng/g ein Hinweis auf eine illegale Behandlung. Bei bekannter Wartezeit wäre eine Differenzierung zwischen therapeutischer und illegaler Dosierung in gewissen Grenzen möglich.

⇒ Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass allein durch die Bestimmung der Clenbuterolkonzentration in tierischen Geweben oder Körperflüssigkeiten eine wirkungsvolle Überwachung des legalen Clenbuteroleinsatzes zu therapeutischen Zwecken nach den derzeitigen Erkenntnissen weder im Erzeugerbetrieb noch auf dem Schlachthof möglich ist.

Überwachung des verbotenen Einsatzes

- ⇒ Um illegale Anwendungen von β_2 -Agonisten bei lebensmittelliefernden Tieren zu überwachen, sind insbesondere die stark pigmentierten Gewebe, wie sie im Auge und bei Haaren zu finden sind, von besonderem Interesse. Auch wenn Clenbuterol von allen bisher getesteten β_2 -Agonisten am stärksten in pigmentierten Geweben akkumuliert, so scheinen diese Gewebe auch für den Nachweis anderer β_2 -Agonisten geeignet zu sein. Hier besteht noch erheblicher Forschungsbedarf.
- ⇒ Haare spielen für die Probenahme im Erzeugerbetrieb zur Kontrolle von Anwendungsverböten eine größere Rolle. Sie sind leicht zu entnehmen, Clenbuterol und andere β_2 -Agonisten akkumulieren in dunklen Haaren und sind daher in großen Konzentrationen vorhanden sowie über lange Zeit nachzuweisen. Da ein Clenbuterolnachweis in Haaren immer auch durch eine äußere Kontamination verursacht sein kann, können sie als Matrix nur für das Screening Bedeutung erlangen. Im positiven Fall müsste das Ergebnis beispielsweise durch eine Probeschachtung und einer Analyse der Retina/Uvea abgesichert werden.
- ⇒ Die Untersuchung von Retina/Uvea-Proben ist vor allem bei Probenahmen im Schlachthof von größter Bedeutung. Wenn die Wartezeit bekannt ist, z.B. nach Beschlagnahme eines Bestandes, können Rückschlüsse auf die eingesetzte Dosis gezogen werden.

Metaboliten

- ⇒ Ein weiterer Aspekt, der im Hinblick auf eine Rückstandsüberwachung beachtet werden muss, ist die Tatsache, dass die gängige Analytik auf den Nachweis der Muttersubstanz ausgerichtet ist. Es ist aber bekannt, dass Clenbuterol und andere β_2 -Agonisten im Tierkörper auch in Form von Metaboliten vorliegen (s. 2.9.6), über deren Pharmakokinetik wenig bekannt ist. Es gibt anhand von Versuchen mit radioaktiv markiertem Clenbuterol zwar Hinweise dafür, dass auch die Metaboliten genauso schnell ausgeschieden werden wie die Muttersubstanz, aber in der vorhandenen Literatur sind keine Hinweise auf Versuche zum Eliminationsverhalten, die mit den Metaboliten durchgeführt wurden, gefunden worden. Hier besteht noch Forschungsbedarf.