Nachweis von Clenbuterol in menschlichem Kopfhaar

Andreas Gleixner

Einleitung

Hormonelle Leistungsförderer, die im Sport als Dopingmittel, aber z.B. auch verbotener Weise in der Tiermast Anwendung finden, werden in drei Stoffgruppen eingeteilt. Es handelt sich um Proteohormone (z.B. Wachstumshormon), sexualhormonwirksame Anabolika und $ß_2$-adrenerge Agonisten.

$ß_2$-Agonisten sind synthetische Derivate natürlicher Katecholamine (z.B. Adrenalin) und werden als Sympathomimetika bezeichnet. Chemisch betrachtet handelt es sich um Phenylethylamine. Der bekannteste $ß_2$-Agonist ist Clenbuterol. Für Clenbuterol wurde tierexperimentell gezeigt, daß die Anreicherung von Clenbuterol in Augen mit dem Melaningehalt im Pigmentepithel der Retina zusammenhängt [3]. Es lag nahe, die ebenso Melanin als Farbstoff enthaltenden Haare [14] als Analysennmaterial in Betracht zu ziehen [4, 6].

Für eine Reihe von Drogen ist das Wissen über deren Einbau und Nachweis in Haaren bereits sehr groß [10, 12, 15, 16]. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Nachweis von Clenbuterol in menschlichem Kopfhaar [5, 7]. Dazu wurden Haarproben von freiwilligen Probanden, z. T. von Patienten, die mit Clenbuterol therapiert worden waren, auf Clenbuterolrückstände untersucht.

Material und Methode

Probanden: Zur Bestimmung von Clenbuterol in menschlichen Kopfhaaren wurden von 15 Probanden Haarproben genommen. Sechs Probanden nahmen Hustensaft (Spasmo-Mucosolvan^R) in einem nicht genauer definierten Ausmaß (was Zeitraum und Dosierung angeht) ein. Neun Haarproben stammten von Patienten, die Clenbuterol (2 x 5 ml Spasmo-Mucosolvan^R; = 2 x 5 µg pro Tag) über eine Dauer von 25 Tagen einnahmen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Pigmentabhängigkeit wurden die Konzentrationen von Clenbuterol bei diesen neun Probanden für die näherungsweise 1 cm langen Haarabschnitte umgerechnet (Tabelle 2), in die Clenbuterol während des Haarwachstums eingebaut wurde.

Haarproben: Von jedem Probanden wurde ein etwa 0,5 cm dicker Haarstrang direkt über der Kopfhaut des Hinterhauptshöckers abgeschnitten. Eine Haarprobe beinhaltete die gesamte Haarlänge vom Kopfansatz bis zur Haarspitze. In ihrer Form glichen die Haarproben Bündeln aus Haaren mit ungefähr 0,5 cm Durchmesser und einer Länge wie sie die Haarlänge des entsprechenden Probanden entsprach.

Vorbereitung der Haarproben: Die Haarproben wurden gewaschen, zu Pulver zermahlen und bei -25 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt [4, 5, 7].

Extraktion von Clenbuterol aus den Haaren: Zur Extraktion wurden 50 mg Haarpulver, 1 ml 50 mM wässriges 1,4-Dithiothreitol (DTT), 50 µl 5 M NaOH und 2,5 ml tertiärer Butylmethylether über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (Buchler Instruments Inc.) geschüttelt. Der Ether wurde durch Zentrifugation abgetrennt und die Extraktion 1 h lang mit tertiärem Butylmethylether wiederholt. Die beiden Etherphasen jeder Probe wurden vereint und eingedampft. Der Trockenrückstand wurde in 300µl KH_2PO_4 pH 4,0 aufgenommen und entsprechende Verdünnungen wurden als Doppelproben im Enzymimmuntest gemessen.

Clenbuterolmessung: Die Quantifizierung von Clenbuterol [11] erfolgte mit einem Enzymimmuntest (EIA). Zur Identifikation der Clenbuterolrückstände und zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem EIA wurden die positiven Proben mit einer Kombination von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Enzymimmuntest (HPLC/EIA) gemessen.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) für Clenbuterol: 100µl der in 300µl 20 mM KH_2PO_4 pH 4,0 aufgenommenen Trockenrückstände wurden mit Hilfe eines Proben-Injektionsventils Modell 210, Beckmann, München auf die HPLC-Säule aufgegeben. Zur Auftrennung von Clenbuterol wurde eine LiChrospher RP-select B Säule, 125 mm x 4 mm, 5 µm von Merck verwendet. Es wurde isokratisch mit 20 mM KH_2PO_4 pH 4,0 / Acetonitril im Verhältnis 80/20 (v/v) eluiert. Die Fließrate betrug stets 1 ml min^{-1} bei 25 °C. Um die bekannte [11] Retentionszeit von Clenbuterol herum (5 min) wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Pharmacia) das Eluens gesammelt. Diese Fraktionen wurden entweder direkt in den EIA eingesetzt oder mit einem Buchler Vortex Evaporator (Buchler Instruments Inc.) bis zur Trockene eingedampft. Der Trockenrückstand jeder Fraktion wurde in 20 mM KH_2PO_4 pH 4,0 aufgenommen und als Doppelprobe im EIA gemessen. Um die Spezifität der Ergebnisse aus HPLC/EIA für Clenbuterol zu belegen, wurden die Retentionszeiten für Terbutalin (2 min), Salbutamol (3 min) und Mabuterol (7 min) angegeben.

Ergebnisse

Anreicherung von Clenbuterol in menschlichem Kopfhaar: Der Gehalt an Clenbuterol in den Kopfhaaren der 15 Probanden, die Clenbuterol eingenommen hatten, ist in den Tabellen 1 und 2 angegeben. Die Werte wurden entsprechend der eingenommenen Clenbuteroldosis und der Haarfarbe zu Gruppen zusammengefaßt. Die Clenbuterolkonzentration in den Haaren der neun Probanden wurde für den 1 cm langen Haarabschnitt berechnet, in den Clenbuterol eingebaut wurde. Die Umrechnung erfolgte anhand der Länge und des Gewichtes der Gesamthaarprobe. Die Berechnung basierte auf dem aus der Literatur [2] bekannten durchschnittlichen menschlichen Kopfhaarwachstum von annähernd 1 cm pro Monat. Diese Berechnung erfolgte, um die Clenbuterolkonzentrationen in den Haaren (bei unterschiedlicher Probenmenge) und deren Abhängigkeit von der Haarfarbe besser vergleichen zu können. In den Haarproben der neun Probanden, die eine bekannte Menge Clenbuterol zu therapeutischen Zwecken eingenommen hatten, lagen die Konzentrationen von Clenbuterol zwischen 25 und 160 ng/g, berechnet auf 1 cm Haarlänge. Vor der Clenbuteroleinnahme konnte in Haarproben von diesen neun Probanden Clenbuterol nicht nachgewiesen werden. Die Clenbuterolkonzentrationen waren in hellen Haaren geringer (blond, grau: ~30 ng/g) als in dunklen Haaren (schwarz, braun: ~150 ng/g). In den Gesamthaarproben derjenigen Probanden, die in nicht näher bekanntem Ausmaß den clenbuterolhaltigen Hustensaft einnahmen, war der Clenbuterolgehalt deutlich niediger (3-8 ng/g). Der Clenbuterolgehalt wurde hier aber für die gesamte Haarprobe berechnet.

Tabelle 1: Konzentrationen von Clenbuterol in menschlichem Kopfhaar nach Einnahme von Clenbuterol in nicht näher bekannter Dosierung ("in der Vergangenheit ab und zu Spasmo-Mucosolvan^{R}")

Probanden-Nr.	Geschl.	Alter (Jahre)	Haarfarbe	ng Clenbuterol / g Haare
1	♂	30	schwarz	8
2	♂	2	blond	4
3	♂	5	blond	3
4	♂	6	blond	3
5	♂	35	blond	3
6	♀	45	braun	5

(Nachweisgrenze: 0,3 ng Clenbuterol / g Haare)

Bestätigung der Werte aus dem Enzymimmuntest: Mit Hilfe der kombinierten Analyse aus HPLC gefolgt von EIA konnte für die positiven Haarproben gezeigt werden, daß die im EIA gemessenen Clenbuterolkonzentrationen in den Haaren mit und ohne Vorreinigung der Proben durch die HPLC gleich waren. Die gesamte Immunoreaktivität befand sich nach der HPLC im Clenbuterolpeak.

Tabelle 2: Konzentrationen von Clenbuterol in menschlichem Kopfhaar nach Einnahme von 10 µg Clenbuterol/Tag über 25 Tage (10 ml Spasmo-Mucosolvan[R]). Die Konzentrationen wurden auf einen 1 cm langen Haarabschnitt umgerechnet. Die Mittelwerte der Probanden mit dunklem Haar (Nr. 7 - 11 120 ng/g) und der mit hellerem Haar (Nr. 12 - 15; 31 ng/g) unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$; zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

Probanden-Nr.	Geschl.	Alter (Jahre)	Haarfarbe	ng Clenbuterol / g Haare
7	♂	27	schwarz	126
8	♂	30	schwarz	80
9	♀	27	braun	161
10	♀	30	braun	120
11	♀	60	schwarz	114
12	♀	28	hellbraun	38
13	♀	60	grau	35
14	♀	60	grau	26
15	♀	27	blond	23

(Nachweisgrenze: 0,3 ng Clenbuterol / g Haare)

Diskussion

Ein Vergleich der im EIA gemessenen Clenbuterolwerte mit den Ergebnissen aus einer kombinierten Messung durch HPLC/EIA zeigte, daß die Clenbuterolquantifizierung im EIA nicht durch Substanzen aus den Haarextrakten oder durch Metaboliten gestört wurde. Nach der HPLC war die Immunoreaktivität auf die Fraktionen um den Clenbuterolpeak beschränkt. Beide Methoden (EIA bzw. HPLC/EIA) lieferten übereinstimmende Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, daß der hier verwendete EIA für das Screening von großen Probenmengen geeignet ist. Zur Bestätigung kann dann die HPLC oder MS herangezogen werden.

Mit der Analyse menschlichen Kopfhaares wurden die Vorteile der Haaranalyse gegenüber anderem Probenmaterial (Urin oder Blut) auch für die Dopingkontrolle auf Clenbuterol deutlich. Der Nachweis von Clenbuterol im Kopfhaar dürfte bis zum Ausfall der Haare möglich sein. Dafür sprechen auch die Clenbuterolkonzentrationen in Haaren von sechs Probanden, die irgendwann in der Vergangenheit clenbuterolhaltigen Hustensaft zu sich genommen hatten.

Die Tatsache, daß die Clenbuterolkonzentrationen in dunklen Haaren höher lagen als in hellen Haaren (Tabelle 2), deutet darauf hin, daß Clenbuterol bevorzugt an eine Komponente in dunklen Haaren gebunden wird. Dies entspricht den am Tiermodell gezeigten Befunden [4] und steht im Gegensatz zu den Steroidanabolika [8, 9].

Ein Vergleich der Konzentrationen verschiedener in menschlichen Haaren gemessenen Substanzen fällt schwer, da die aufgenommene Menge einer Substanz meist unbekannt ist. Dies trifft besonders für den Drogenmißbrauch zu. In der vorliegenden Untersuchung nahmen die meisten positiv befundenen Probanden therapeutische Dosen von Clenbuterol zu sich. Die Rückstände von Clenbuterol in menschlichem Kopfhaar nach im Sport üblicher anaboler Dosierung (ca. zehnmal höher), dürften deutlich höher liegen als die hier gemessenen Werte. Wie Versuche an Labortieren [1, 13] und Rindern [3, 17] zeigen, weisen Haare eine hohe Bindungskapazität für Clenbuterol auf (bis zu 1 µg/g). Dies deutet darauf hin, daß auch menschliches Haar höhere Mengen an Clenbuterol binden kann als die in dieser Arbeit gemessenen Werte. Folglich werden Clenbuterolrückstände in Haaren von Sportlern, die Clenbuterol in starkem Maße konsumieren, sehr viel höher liegen.

Literaturverzeichnis

[1] A. Adam, N. Gervais, A. Panoyan, H. Ong, L. Beliveau, C. Ayotte, P. Delahout: Detection of clenbuterol residues in hair. Analyst 119 (1994) 2663-2666.

[2] A. Chatt, S. A. Katz: Hair Analysis. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1988.

[3] I. Dürsch, H. H. D. Meyer, H. Karg: Accumulation of the ß-agonist clenbuterol by pigmented tissues in rat eye and hair of veal calves. J. Anim. Sci. 73 (1995) 2050-2053.

[4] A. Gleixner: Pharmakologische Untersuchungen zur Anreicherung von Clenbuterol und steroidalen Anabolika in pigmentierten Geweben. Herbert Utz Verlag Wissenschaft, München, 1996.

[5] A. Gleixner, H. Sauerwein, H. H. D. Meyer: Detection of the anabolic $ß_2$-adrenoceptor agonist Clenbuterol in human scalp hair by HPLC/EIA. Clin. Chem. (1996) 1869-1871.

[6] A. Gleixner, H. Sauerwein, H. H. D. Meyer: Accumulation of the $ß_2$-adrenoceptor agonist clenbuterol in calf hair of different pigmentation. Arch. f. Lebensmittelhyg. 47 (1996) 131-135.

[7] A. Gleixner, H. Sauerwein, H. H. D. Meyer: Nachweis von Clenbuterol in Kopfhaar: eine Methode zur Trainingsdopingkontrolle. Deutsche Zeitschrift f. Sportmed. 48 (1997) 50-55.

[8] A. Gleixner, H. H. D. Meyer: Detection of estradiol and testosterone in hair of cattle by HPLC/EIA. Fresenius J. Anal. Chem. (1997) im Druck.

[9] A. Gleixner, H. Sauerwein, H. H. D. Meyer: Accumulation of the xenobiotic anabolic steroids ethinylestradiol and methyltestosterone in calf hair. Food Agricul. Immunol. (1997) im Druck.

[10] B. S. Larsson: Interaction between chemicals and melanin. Pigment Cell Res. 6 (1993) 127-133.

[11] H. H. D. Meyer, L. M. Rinke: The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. J. Anim. Sci. 69 (1991) 4538-4544.

[12] Y. Nakahara, K. Takahashi, R. Kikura: Hair analysis for drugs of abuse. X. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair. Biol. Pharm. Bull. 18 (1995) 1223-1227.

[13] A. Polettini, J. Segura, G. Gonzalez, X. de la Torre, M. Montagna: Clenbuterol and ß-adrenergic drugs detected in hair of treated animals by ELISA. Clin. Chem. 41 (1995) 945-946.

[14] G. Prota: Melanins and melanogenesis. Academic Press, Inc., San Diego,1992.

[15] L. Pötsch, G. Skopp, H. P. Eser, M. R. Möller: Zum Suchtmittelnachweis in Haaren I. Rechtsmed. 6 (1996) 156-160.

[16] L. Pötsch, G. Skopp, M. R. Möller: Zum Suchtmittelnachweis in Haaren II. Rechtsmed. 7 (1996) 1-5.

[17] M. J. Sauer, S. P. L. Anderson: In vitro and in vivo studies of drug residue accumulation in pigmented tissues. Analyst 119 (1994) 2553-2556.

Dr. rer. nat. Andreas Gleixner
F. Hoffmann-La Roche AG
Vitamins Exploratory Research
CH-4070 Basel / Schweiz