



A. Gleixner,  
H. Sauerwein,  
H. H. D. Meyer

## Nachweis von Clenbuterol in Kopfhaar: eine Methode zur Trainingsdopingkontrolle

Detection of Clenbuterol in human scalp hair: a method for doping control during training

Institut für Physiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel  
Weihenstephan, Technische Universität München,

Diese Arbeit wurde finanziell durch das Bundesinstitut für  
Sportwissenschaft, Köln, unterstützt (VF 0407/08/02/95).

### Zusammenfassung

Mit Bekanntwerden der Anwendung von Clenbuterol zu Dopingzwecken, ist dieses Sympathomimetikum in die Schlagzeilen gerückt. In Blut oder Urin ist Clenbuterol nur kurze Zeit nach der Einnahme nachweisbar. Die vorliegende Untersuchung zielt darauf ab, den Nachweis der Einnahme von Clenbuterol mit Hilfe der Haaranalyse über einen längeren Zeitraum, als dies mit Urin oder Blut möglich ist, erbringen zu können. Kopfhaarproben von 67 freiwilligen Probanden wurden mit einem Enzymimmuntest (EIA) und zur Bestätigung der positiven Befunde mit einer Kombination aus Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und EIA auf Clenbuterolrückstände untersucht. Clenbuterol konnte in den Haaren von neun Probanden, die eine definierte Menge Clenbuterol zu therapeutischen Zwecken einnahmen, nachgewiesen werden. Die Konzentrationen lagen zwischen 25 und 160 ng Clenbuterol/g Haare. Die Anreicherung von Clenbuterol war in dunklen Haaren (150 ng/g) deutlich höher als in hellen Haaren (30 ng/g). Dies kennzeichnet den Einfluß der Haarfarbe auf die Höhe der Anreicherung von Clenbuterol in den Haaren. Clenbuterolrückstände konnten auch in Haarproben von sechs Probanden, die in der Vergangenheit unbekannte Mengen clenbuterolhaltigen Hustensafts einnahmen, gemessen werden. Die Konzentrationen lagen zwischen 3 und 8 ng/g. In Haarproben von

zwei Bodybuildern konnten 50 und 92 ng/g nachgewiesen werden. Clenbuterol konnte aber nicht in Haarproben von 50 Probanden, die einen Querschnitt durch die lokale Bevölkerung repräsentierten, gemessen werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Haaranalyse für Clenbuterol als Methode für Trainingskontrollen, im Rahmen des Sportdopings, geeignet ist.

**Schlüsselwörter:** Clenbuterol, Doping, Haaranalyse, Haarpigmentierung, Langzeitnachweis

### Summary

The objective of this study was to detect the intake of the anabolic agent Clenbuterol via hair analysis beyond the time of measurable concentrations in blood and urine. Hair samples from 67 volunteers were analyzed for Clenbuterol residues by Enzyme Immunoassay (EIA) and by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and for confirmation of positive results by a combination of both methods (HPLC/EIA). Clenbuterol residues could be detected in hair from nine volunteers who took a known dosage of Clenbuterol for therapeutic purposes. The Clenbuterol concentrations varied from 25 to 160 ng/g hair. The accumulation of Clenbuterol was markedly higher in dark hair (150 ng/g) than in fair hair (30 ng/g), demonstrating the importance of hair pigmentation for the binding of Clenbuterol to the hair matrix. Clenbuterol

residues could also be detected in hair from six volunteers who took a coughmixture in an unknown regimen. These residues varied from 3 to 8 ng/g. In hair samples obtained from two bodybuilders of unknown anamnesis 50 and 92 ng Clenbuterol/g hair were measured. No Clenbuterol residues could be detected in hair samples from 50 volunteers representing a cross-section of the local population. Our results show that hair analysis may serve as a powerful tool to detect and track the illegal use of Clenbuterol in sports doping.

**Keywords:** Clenbuterol, doping, hair analysis, hair pigmentation, long-term control

### Einleitung

Die verschiedenen hormonellen Leistungsförderer, von denen bekannt ist, daß sie zu Dopingzwecken im Sport, aber beispielsweise auch illegal in der Tiermast eingesetzt werden, sind in drei Verbindungsklassen einzuteilen (12): in die

- Proteohormone (z.B. Wachstumshormon),
- die sexualhormonwirksamen Anabolika und die
- adrenergen Agonisten.

Beta-2-Agonisten sind synthetische Derivate der natürlichen Katecholamine



(z.B. Adrenalin) und werden als Sympathomimetika bezeichnet. In ihrer Grundstruktur handelt es sich um Phenylethylamine. Der bekannteste Beta-2-Agonist ist Clenbuterol. Clenbuterol wurde 1972 erstmals synthetisiert (13) und zeichnet sich durch eine sehr gute Beta-2-Rezeptor-Selektivität und geringe Beta-1-Nebenwirkung aus. Aufgrund seiner chemischen Struktur ist Clenbuterol hervorragend oral bioverfügbar (8). Der räumlich große Substituent (tertiäre Butylgruppe) am Stickstoff verhindert sterisch den Angriff der Monoaminoxidase (MAO). Wegen fehlender Hydroxygruppen am Benzolring kann die Katechol-O-methyltransferase dort keine Methylgruppe übertragen.

Clenbuterol ist in der Humanmedizin (Spiropent®, Spasmo-Mucosolvan®) als bronchospasmolytischer Wirkstoff zugelassen. In fünf- bis zehnfach höherer als der therapeutischen Dosierung ist in Tierexperimenten (19, als Übersicht) seine anabole Wirkung nachgewiesen. Auch für den Leistungssport ist Clenbuterol wegen seiner nährstoffumverteilenden Wirkung interessant. Aufgrund seiner Einflüsse auf den Stoffwechsel (Hemmung der Lipogenese, Steigerung der Lipolyse und Glykogenolyse bei gleichzeitiger Hemmung des Proteinabbaus) erhöht Clenbuterol letztendlich den Muskelanteil des Körpers und reduziert dafür den Fettanteil. Dies findet beim Athleten seinen Niederschlag in gesteigerter Muskelkraft (25).

#### Rückstandsanalytik

Für Clenbuterol wurde in Tierexperimenten gezeigt, daß nach therapeutischer Anwendung keine meßbaren Rückstände in eßbaren Geweben zurückbleiben. Auch nach höherer Dosierung läßt sich Clenbuterol nach wenigen Tagen im Urin z.B. von Kälbern nicht mehr nachweisen (18). Nach Behandlung in anabol wirksamer Dosierung sind Clenbuterolrückstände in den meisten Geweben der behandelten Versuchstiere vorhanden. In den Augen sind Clenbuterolrückstände bei Mastkälbern (5, 7, 18) und Hühnern (16) besonders lange Zeit nach dem Absetzen der Clenbuterolapplikation nachweisbar.

#### Haaranalyse

Haaranalysen für Spurenelemente und Drogen sind seit Jahrzehnten gängig und werden in der forensischen Toxikologie

als geeignetes diagnostisches Instrument eingesetzt (3, 14, 17, 24).

Im Gegensatz zu anderen Probenmatrices, wie z.B. Blut oder Urin, stellt das Haar Informationen über die Geschichte der Fremdstoffexposition eines Organismus zur Verfügung. Mit der Haaranalyse eröffnet sich die Möglichkeit, einen weiter zurückliegenden Mißbrauch z.B. von Drogen festzustellen. Mit konventionellem Probenmaterial (Urin oder Blut) ist dies hingegen nicht möglich (4). Da vor kurzem nachgewiesen werden konnte, daß die Anreicherung von Clenbuterol in Augen mit dem Melaningehalt im Pigmentepithel der Retina zusammenhängt (6, 18), lag es nahe, die ebenso Melanin als Farbstoff enthaltenden Haare (21) als Analysenmaterial in Betracht zu ziehen. Für eine Reihe von Xenobiotika, insbesondere aus der Drogenszene, wächst das Wissen über die Akkumulation in Haaren allmählich an (15). 1994 ist die Haaranalyse für anabol wirksame Substanzen eingeführt worden, als erstes für Clenbuterol. Die Haarproben stammten bis jetzt von Ratten (1) und Meer-schweinchen (20) bzw. von Rindern (2, 6, 10, 23). Bei ihrer erstmaligen Messung von Clenbuterol in Haaren von schwarzweiß gefleckten Kälbern fanden *Dürsch et al.* (6) einen deutlichen Unterschied zwischen dem Clenbuterolgehalt von schwarzen und von weißen Haaren. Die vorliegende Arbeit befaßt sich erstmals mit dem Nachweis von Clenbuterol in menschlichem Kopfhaar. Da Clenbuterol im Sport als Dopingmittel Anwendung findet, wäre eine nicht-invasive Analysenmöglichkeit für die Dopingkontrolle, insbesondere für Trainingskontrollen von großer Bedeutung. Deshalb wurde die von uns am Tiermodell für Rinderhaare entwickelte Analysenmethode zum Nachweis von Clenbuterol (9) im Hinblick auf menschliche Haare optimiert und validiert (11).

Dazu wurden Haarproben von insgesamt 67 freiwilligen Probanden, z.T. von Patienten, die mit Clenbuterol therapiert worden waren ( $n = 17$ ), auf Clenbuterolrückstände untersucht.

#### Material und Methode

##### Haarproben

Von jedem Probanden wurde ein etwa 0,5 cm dicker Haarstrang direkt über der

Kopfhaut des Hinterhaupthöckers (Occiput) abgeschnitten. Eine Haarprobe beinhaltete daher die gesamte Haarlänge vom Kopfansatz bis zur Haarspitze (Gesamthaarprobe). In ihrer Form glichen die Haarproben Fasziendbündeln aus Haaren mit ungefähr 0,5 cm Durchmesser und einer Länge wie sie die Haarlänge des entsprechenden Probanden zuließ.

##### Probanden

Zur Bestimmung von Clenbuterol in menschlichen Kopfhaaren wurden von 67 Probanden Haarproben genommen. Proben von 50 zufällig ausgewählten Probanden, die einen Querschnitt durch die lokale Bevölkerung repräsentieren, wurden als negative Kontrollen verwendet. Diese 50 Probanden wurden nach Geschlecht, Alter, Haarfarbe und ihren Ernährungsgewohnheiten unterteilt. Neun Haarproben stammten von Patienten, die Clenbuterol (2 x 5 ml Spasmo-Mucosolvan® = 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 auch für die 1 cm langen Haarabschnitte umgerechnet (Tab. 1), in die Clenbuterol während des Haarwachstums eingebaut wurde. Von diesen neun Probanden wurden auch mehrere Monate nach Beenden der Clenbuteroleinnahme Gesamthaarproben genommen, um den Zeitraum der Nachweisbarkeit von Clenbuterol in menschlichem Kopfhaar abschätzen zu können. Zwei dieser neun Probanden hatten so lange Haare, daß eine sequentielle Analyse von 2 cm langen Haarabschnitten möglich war. Sechs Probanden nahmen den Hustensaft (Spasmo-Mucosolvan®) in einem nicht genauer definierten Ausmaß (was Zeitraum und Dosierung angeht) ein. Zwei Haarproben stammten von Bodybuildern, von denen angenommen wurde, daß sie Clenbuterol einnahmen.

##### Vorbereitung der Haarproben

Wie beschrieben (9) wurde etwa 1 g Haare gewaschen, zu Pulver zermahlen und bei -25°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

##### Extraktion von Clenbuterol aus den Haaren

50 mg Haarpulver, 1 ml 50 mM wässriges 1,4-Dithiothreitol (DTT), 50 µl 5



Tabelle 1a: nach Einnahme von 10 µg Clenbuterol/Tag über 25 Tage

Probanden-Nr.	Geschl.	Alter (Jahre)	Haarfarbe	ng Clenbuterol/g Haare
1	♂	27	schwarz	126
2	♂	30	schwarz	80
3	♀	27	braun	161
4	♀	30	braun	120
5	♀	60	schwarz	114
6	♀	28	hellbraun	38
7	♀	60	grau	35
8	♀	60	grau	26
9	♀	27	blond	23

Die Konzentrationen wurden auf einen 1 cm langen Haarabschnitt umgerechnet. Die Mittelwerte der Probanden mit dunklem Haar (Nr. 1-5; 120 ng/g) und der mit hellerem Haar (Nr. 6-9; 31 ng/g) unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ , zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

Tabelle 1b: nach Einnahme von Clenbuterol in nicht näher bekannter Dosierung

Probanden-Nr.	Geschl.	Alter (Jahre)	Haarfarbe	ng Clenbuterol/g Haare
10	♂	30	schwarz	8
11	♂	2	blond	4
12	♂	5	blond	3
13	♂	6	blond	3
14	♂	35	blond	3
15	♀	45	braun	5

Tabelle 1c: genaue Dosis unbekannt („Bodybuilder“)

16	♂	35	braun	92
17	♂	40	braun	50

Tabelle 1: Anreicherung von Clenbuterol in menschlichem Kopfhaar

M NaOH und 2,5 ml tertiärer Butylmethylether wurden über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei halbmaximaler Frequenz 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 bei 60°C im Wasserbad abgedampft. Der Trockenrückstand wurde in Wasser aufgenommen und entsprechende Verdünnungen wurden als Doppelproben im Enzymimmuntest gemessen. Die hier beschriebene Methode wurde ausführlich validiert (9).

**Einfluß von Wasserstoffperoxid auf den meßbaren Clenbuterolgehalt in den Haaren**

Es ist bekannt, daß Wasserstoffperoxid zum Bleichen von Haaren verwendet wird (22). Dabei wird der Haarfarbstoff zerstört. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Bleichen der Haare mit Wasserstoffperoxid den Clenbuterolgehalt in den Haaren beeinflußt. Dazu wurde Haarpulver von den neun Probanden mit definierter Clenbuteroleinnahme 2 h bei Raumtemperatur in 35%igem Wasserstoffperoxid inkubiert. Anschließend wurde das Wasserstoffperoxid dekantiert, das Haarpulver dreimal mit Wasser gewaschen und bei 60°C getrocknet. Diese Haarproben wurden dann wie oben beschrieben extrahiert.

**Sequentielle Analyse von Haarabschnitten**

Vier Monate nach Beenden der Clenbuteroleinnahme wurde von zwei Probanden mit langen Haaren eine weitere Haarprobe entnommen. Diese Haarproben von zwei Frauen mit definierter Clenbuteroleinnahme wurden vom Kopfansatz bis zur Haarspitze in ca. 2 cm lange Abschnitte geschnitten. Diese Abschnitte wurden getrennt analysiert. Die Clenbuterolkonzentrationen der einzelnen Abschnitte sind in Tabelle 2 gezeigt.

**Clenbuterolmessung**

Die Quantifizierung von Clenbuterol (18) in den extrahierten Haarproben 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**

Die ausgewählten Proben sowie die jeweils eingesetzten Probenmengen sind im Ergebnisteil dargestellt.

Die Trockenrückstände der Extrakte wurden in 300 µl 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 4,0 aufgenommen. 100 µl davon 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Ä pH 4,0 / Acetonitril im Verhältnis 80/20 (v/v) eluiert. Die Fließrate betrug stets 1 ml min<sup>-1</sup> bei 25°C. Um die bekannte (18) Retentionszeit von Clenbuterol (5 min) wurden die Fraktionen gesammelt. Diese Fraktionen wurden entweder direkt in den EIA eingesetzt oder mit einem Buchler-Vortex-Evaporator (Buchler Instruments Inc., Fort Lee, NJ, USA) bis zur Trockene eingedampft.

Tabelle 2: Clenbuterolkonzentration (ng/g) in Haarabschnitten, die vier Monate nach Beenden der Clenbuteroleinnahme gewonnen wurden.

cm vom Kopfansatz	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12
Frau 1, braun	<	2	16	8	<	<
Frau 2, blond	<	3	9	4	<	<

<: Unter der Nachweisgrenze (0,3 ng/g)



Der Trockenrückstand jeder Fraktion wurde in 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Ä 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 Kopfharen der Probanden, die Clenbuterol eingenommen hatten, ist in Tabelle 1 angegeben. Die Werte wurden entsprechend der eingenommenen Clenbuteroldosis, dem Geschlecht, dem Alter und der Haarfarbe zu Gruppen zusammengefaßt. Die Clenbuterolkonzentration in den Haaren dieser neun Probanden wurde für den 1 cm langen Haarabschnitt berechnet, in den das Clenbuterol eingebaut wurde. Die Umrechnung erfolgte anhand der Länge und des Gewichtes der

Gesamthaarprobe. Die Berechnung basierte auf dem aus der Literatur (3) bekannten durchschnittlichen menschlichen Kopfhaarwachstum von ungefähr 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).

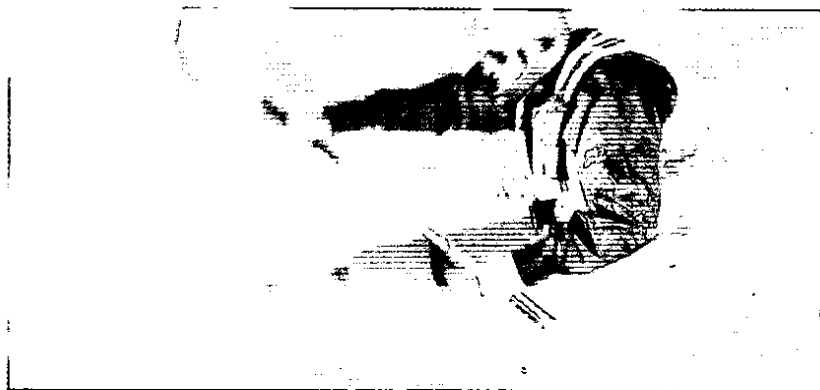
In den Gesamthaarproben derjenigen Probanden, die in nicht näher bekanntem

Ausmaß clenbuterolhaltigen Hustensaft einnahmen, war der Clenbuterolgehalt deutlich niedriger (3-8 ng/g, Tab. 1b). Der Clenbuterolgehalt wurde hier aber für die gesamte Haarprobe berechnet. Die Clenbuterolkonzentration in den Gesamthaarproben der zwei Bodybuilder (50 und 92 ng/g) lag im Bereich der Konzentrationen, die für die 1 cm langen Haarabschnitte der neun therapeutisch mit Clenbuterol behandelten Probanden berechnet wurden.

**Dauer der Nachweisbarkeit von Clenbuterol in menschlichem Kopfhaar**

In Tabelle 3 sind die Konzentrationen von Clenbuterol in Haarproben von neun Probanden nach definierter Clenbuteroleinnahme angegeben. Die Werte sind bezogen auf die gesamte Haarprobe angegeben, nicht für einen bestimmten Haarabschnitt. Die Probanden sind von 1 bis 9 durchnummeriert. Probanden 1 bis 5 hatten dunkle, Probanden 6 bis 9 helle Haare. Die Haarproben wurden an den angegebenen Tagen nach Beenden der Clenbuteroleinnahme genommen.

**Traumeel® S**



**Breitband-Antiphlogistikum**



- entzündlich-rheumatische Erkrankungen
  - Sportverletzungen
- kassenüblich

**-Heel**

Biologische Heilmittel Heel GmbH  
Baden-Baden

**Salbe**  
**Zusammensetzung:** 100 g enth.: Arnica D 3 1,5 g; Calendula Ø, Hamamelis Ø jeweils 0,45 g; Echinacea angustifolia Ø, Echinacea purpurea Ø, Chamomilla Ø jeweils 0,15 g; Symphytum D 4, Bellis perennis Ø jeweils 0,1 g; Hypericum D 6, Milletolium Ø jeweils 0,09 g; Aconitum D 1, Belladonna D 1 jeweils 0,05 g; Mercurius solubilis Hahnemannii D 6 0,04 g; Hepar sulfuris D 6 0,025 g; Salbengrundlage: wasserhaltige, hydrophile Salbe DAB 10, konserv. mit 12,5 Vol.-% Ethanol. **Anwendungsgebiete:** Verletzungen jeder Art (Sport, Unfall) wie Verstauchungen, Verrenkungen, Prellungen, Blut- und Gelenkergüsse, Knochenbrüche usw., entzündliche und mit Entzündungen verbundene degenerative Prozesse an den verschiedensten Organen und Geweben (z. B. Parodontitiden, Zahnfleischtascheneiterungen, Parodontosen), auch am Stütz- und Bewegungsapparat (Sehnenscheiden-, Schleimbeutelentzündungen, Tennisarm), Arthrosen der Hüft-, Knie- und kleinen Gelenke. **Gegenanzeigen:** Überempfindlichkeit gegen einen der Wirk- oder Hilfsstoffe, oder gegen Korbblütler (Arnika). **Nebenwirkungen:** In Einzelfällen können Überempfindlichkeitsreaktionen auftreten. Es wurden über lokale allergische Reaktionen (Entzündungen an der Haut) berichtet. **Wechselwirkungen mit anderen Mitteln:** Nicht bekannt. **Dosierungsanleitung:** Morgens und abends, bei Bedarf auch öfters, auf die betroffenen Stellen (auch auf Schürfwunden) auftragen, ggf. auch Salbenverband. **Hinweis:** Eine großflächige Anwendung von Traumeel S-Salbe ist zu vermeiden. **Darreichungsform und Packungsgrößen:** Tuben mit 50 (N1) DM 10,01 und 100 g (N2) Salbe DM 18,06. **Weitere Darreichungsformen:** Injektionslösung, Tropfen und Tabletten. Stand: 1. Februar 1997



Tabelle 3: Clenbuterolkonzentration (ng/g) in Haarproben von neun (# 1-9) Probanden

Tag a	dunkles Haar				helles Haar				
	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9
60	12	9	13	19	11	4	4	3	2
120	5	4	-	-	4	2	2	-	0,5
150	-	-	4	-	-	<	<	-	<
170	2	1	-	2	2	-	-	-	-

a: Tag 1-25 (Dauer der Clenbuteroleinnahme)  
 -: Es wurden keine Proben erhalten  
 <: Unter der Nachweisgrenze: 0,3 ng/g

Die Clenbuteroleinnahme erfolgte von Tag 1 bis 25.

**Einfluß von Wasserstoffperoxid auf den Clenbuterolgehalt von Haaren**

In den neun Haarproben, die mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden, war die Clenbuterolkonzentration um  $25 \pm 5 \%$  reduziert. Die Farbe des Haarpulvers hatte sich nicht merkbar aufgehellt.

**Bestätigung der Werte aus dem Enzymimmuntest**

Mit Hilfe einer 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. Das Verhältnis aus HPLC/EIA : EIA wurde berechnet und betrug  $0,9 \pm 0,1$ . Negative Proben lagen unter der Nachweisgrenze. Die gesamte Immunreaktivität befand sich nach der HPLC im Clenbuterolpeak.

**Diskussion**

Der wichtigste Bestandteil der Methode zur Extraktion von Clenbuterol aus Haaren ist das Reduktionsmittel DTT, das die Verbindungen zwischen den Längsketten des Keratinmoleküls in den Haaren durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücken aufricht. Es zeigte sich, daß dies der wichtigste Parameter war, um hohe Clenbuterolmengen aus den Haaren zu extrahieren. Alle anderen Aufschlußverfahren, die in dieser Arbeit getestet wurden (nicht im Detail aufgeführt), waren wenig erfolgreich. In der forensischen Chemie werden zum Haaraufschluß meistens

Laugen (v.a. NaOH) verwendet (3), da NaOH Haare teilweise auflösen kann. In der vorliegenden Untersuchung konnte mit NaOH nur wenig Clenbuterol aus den Haaren extrahiert werden. Außerdem beeinträchtigte ein aus stark alkalischem Milieu gewonnener Etherextrakt die immunologische Quantifizierung von Clenbuterol im EIA. Auch organische (z.B. Salicylsäure) und anorganische (z.B. Salpetersäure) keratolytische Säuren waren wenig geeignet, die Haarmatrix für die Extraktion von Clenbuterol aufzuschließen. Ein enzymatischer Aufschluß der Haare mittels Proteasen (z.B. Proteinase K) erwies sich als wenig effektiv. Mit all diesen Verfahren konnte höchstens die Hälfte des Clenbuterols aus Haaren extrahiert werden als dies mit DTT möglich war. Außerdem war es nötig, die Extraktion über einen längeren Zeitraum (15 h) durchzuführen, um Clenbuterol aus der Haarmatrix in die Etherphase zu überführen. Nur die Aufschlußmethode von Sauer und Anderson (23) enthielt DTT. Daher waren diese auch in der Lage, höhere Konzentrationen von Clenbuterol in Haaren zu messen als Adam et al. (1) bzw. Poletini et al. (20). Sie konnten die Clenbuterolapplikation auch längere Zeit mit Hilfe der Haaranalyse zurückverfolgen als letzere.

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 Immunreaktivität 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 bzw. die GC/MS herangezogen werden.

Mit der Analyse menschlichen Kopfhaares wurden die Vorteile der Haaranalyse gegenüber anderem Probenmaterial (Urin oder Blut) für die Dopingkontrolle auf Clenbuterol deutlich. Einmal in das Haar eingebautes Clenbuterol bleibt dort eingeschlossen und wird im Gegensatz zu anderen Matrices kaum eliminiert. Wie gezeigt (Tab. 3), wird die Höhe der gemessenen Clenbuterolrückstände in einer Gesamthaarprobe (direkt über der Kopfhaut genommen), die lange nach dem Beenden der Verabreichung von Clenbuterol abgeschnitten wurde, durch nachwachsende Haare, in die kein Clenbuterol mehr eingebaut wurde, reduziert (quasi „verdünnt“). Ein Nachweis von Clenbuterol dürfte bis zum Ausfall des Haares möglich sein. Aus den in dieser Arbeit ermittelten Werten von neun Probanden nach definierter Clenbuterolaufnahme (Tab. 3) wird deutlich, daß der Nachweis von Clenbuterol mit Hilfe der Haaranalyse mehrere Monate nach Beenden der Clenbuterolaufnahme möglich ist. Dafür sprechen auch die Clenbuterolkonzentrationen in Haaren von sechs Probanden, die irgendwann in der Vergangenheit clenbuterolhaltigen Hustensaft zu sich genommen hatten. Von zwei Probanden mit ausreichend langen Haaren konnten die Haare, vom Kopfansatz bis zur Haarspitze, abschnittsweise untersucht werden (Tab. 2). Es zeigte sich, daß der Einbau von Clenbuterol auf die Haarabschnitte beschränkt war, die während der Applikation von Clenbuterol gewachsen sind. Bei einem durchschnittlichen menschlichen Kopfhaarswachstum von 1 cm pro Monat (22), müßte das innerhalb von 25 Tagen aufgenommene Clenbuterol in einem ca. 1 cm langen Haarabschnitt eingebaut sein. Dies trifft für die hier untersuchten Haarproben näherungsweise zu. Die zeitliche Einordnung der Clenbuterolaufnahme anhand der Haaranalyse ist wegen einiger Unsicherheitsfaktoren nur innerhalb gewisser Grenzen möglich. So können beispielsweise nahe beieinander wachsende Haare unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten aufweisen. Das Zerschneiden einer Haarprobe in Ab-



schnitte ohne den Haarstrang zu verschieben ist zudem nur innerhalb gewisser Grenzen möglich.

Der in Haarproben von neun Probanden gemessene Clenbuterolgehalt wurde durch eine zweistündige Inkubation des Haarpulvers in 35 %igem Wasserstoffperoxid (vor dem Analysengang) um 25 % reduziert. Die Farbe des Haarpulvers hellte sich nicht auf. Es wird angenommen, daß Wasserstoffperoxid nur die äußersten Schichten des Haares angreifen kann. Ein Teil des hier an Melanin gebundenen Clenbuterols könnte dabei ausgewaschen bzw. zerstört werden. Es ist unwahrscheinlich, daß die generelle Nachweisbarkeit von Clenbuterol in Haaren durch Bleichen der Haare mit Wasserstoffperoxid verhindert wird. Färben der Haare mit üblichen Haarfärbemitteln (mündliche Mitteilungen der Probanden) störte den Nachweis von Clenbuterol in den in dieser Arbeit untersuchten Proben nicht.

Die Tatsache, daß die Clenbuterolkonzentrationen in dunklen Haaren höher lagen als in hellen Haaren (Tab. 1), deutet darauf hin, daß Clenbuterol bevorzugt an eine Komponente in dunklen Haaren gebunden wird. Dies entspricht den am Tiermodell gezeigten Befunden (9).

#### Bedeutung der Haaranalyse für die Dopingkontrolle

Ein Vergleich der Konzentrationen verschiedener in menschlichen Haaren gemessener 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.

Dies läßt sich aus den bei Labortieren (1, 20) gemessenen Clenbuterolrückständen in Haaren schließen. Es gab bei Ratten und Meerschweinchen eine Dosisabhängigkeit der Anreicherung von Clenbuterol in den Haaren. Beide Arbeiten verwendeten zwei verschiedene anabole Dosierungen (15 µg/kg vs. 120 µg/kg bei Ratten bzw. 10 µg/kg vs. 100 µg/kg bei Meerschweinchen). Die Clenbuterolrückstände in den Haaren waren am Ende der Behandlung in den Versuchsgruppen, die die höheren Dosen erhielt-

ten, deutlich erhöht (7 ng/g vs. 40 ng/g bei Ratten bzw. 30 ng/g vs. 400 ng/g bei Meerschweinchen). Versuche an Rindern (6, 23) zeigten, daß Haare eine hohe Bindungskapazität für Clenbuterol aufweisen (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. Der Clenbuterolnachweis ist daher mit Hilfe der Haaranalyse voraussichtlich sehr lange möglich und das ist der entscheidende Vorteil der Haaranalyse.

#### Literatur

1. Adam A., N. Gervais, A. Panoyan, H. Ong, L. Beliveau, C. Ayotte, P. Delahout: Detection of clenbuterol residues in hair. *Analyst* 119 (1994), 2663-2666.
2. Appelgren L.-E., U. Bondesson, E. Fredriksson, C.-I. Larsson, D.-S. Jansson: Untersuchung von Haarproben von Kälbern auf Clenbuterol. *Die Fleischwirtschaft* 76 (1996), 314-316.
3. Chatt A., S.A. Katz: *Hair Analysis*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1988
4. DuPont R.L., W.A. Baumgartner: Drug testing by urine and hair analysis: complementary features and scientific issues. *Forensic Sci. Inter.* 70 (1995), 63-76.
5. Dürsch I., H.H.D. Meyer, S. Jäger: In vitro investigation of beta-agonist accumulation in the eye. *Analytica Chim. Acta* 275 (1993), 189-193.
6. Dürsch I., H.H.D. Meyer, H. Karg: Accumulation of the beta-agonist clenbuterol by pigmented tissues in rat eye and hair of veal calves. *J. Anim. Sci.* 73 (1995), 2050-2053.
7. Elliott C.T., J.D. McEvoy, W.J. McCaughey, S.R.H. Crooks, S.A. Hewitt: Improved detection of the beta-agonist clenbuterol by analysis of retina extracts. *Vet. Record* 132 (1993), 301-302.
8. Engelhardt G.: Pharmakologisches Wirkungsprofil von NAB 365 (Clenbuterol) einem neuen Broncholytikum mit einer selektiven Wirkung auf die adrenergen beta-2-Rezeptoren. *Arzneiforschung (Drug Res.)* 26 (1976), 1404.
9. Gleixner A.: Pharmakologische Untersuchungen zur Anreicherung von Clenbuterol und steroidalen Anabolika in pigmentierten Geweben. Herbert Utz Verlag Wissenschaft, München, 1996.
10. Gleixner A., H.H.D. Meyer: Hair analysis for monitoring the use of growth promoters in meat production. *Die Fleischwirtschaft* 76 (1996), 637-638.
11. Gleixner A., H. Sauerwein, H.H.D. Meyer: Detection of the anabolic beta-2-adreno-

ceptor agonist Clenbuterol in human scalp hair by HPLC/EIA. *Clinical Chemistry* (1996), 1869-1871.

12. Karg H.; H.H.D. Meyer, B. Hoffmann: Hormonale Leistungsförderer bei lebensmittelliefernden Tieren. *Dtsch. Ärztebl. - Ärztl. Mitteil.* 87 (1990), 667-674.
13. Keck I., G. Krüger, K. Noll, H. Machleidt: Synthesen von neuen Amino-Halogen-substituierten Phenylaminoäthanolen. *Arzneiforschung (Drug Res.)* 22 (1972), 861.
14. Laker M.: *On determining trace element levels in man: the uses of blood and hair*. *Lancet* 8292 (1982), 260-262.
15. Larsson B.S.: Interaction between chemicals and melanin. *Pigment Cell Res.* 6 (1993), 127-133.
16. Malucelli A., F. Ellendorff, H.H.D. Meyer: Tissue distribution and residues of clenbuterol, salbutamol, and terbutaline in tissues of treated broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 72 (1994), 1555-1560.
17. Maugh H.T.: Hair: a diagnostic tool to complement blood serum and urine. *Science* 202 (1978), 1271-1273.
18. Meyer H.H.D., L.M. Rinke: The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.* 69 (1991), 4538-4544.
19. National Research Council: *Metabolic modifiers: effects on the nutrient requirements of food-producing animals*. National Academy of Science, 1994.
20. Poletti A., J. Segura, G. Gonzalez, X. de la Torre, M. Montagna: Clenbuterol and beta-adrenergic drugs detected in hair of treated animals by ELISA. *Clin. Chem.* 41 (1995), 945-946.
21. Prota G.: *Melanins and melanogenesis*. Academic Press, Inc., San Diego, 1992.
22. Robbins C.R.: *Chemical and Physical Behavior of Human Hair*. (2. Aufl.), Springer Verlag, New York, 1988.
23. Sauer M.J., S.P.L. Anderson: In vitro and in vivo studies of drug residue accumulation in pigmented tissues. *Analyst* 119 (1994), 2553-2556.
24. Schütz H., B. Ahrens, F. Erdmann, G. Rochholz: Nachweis von Arznei- und anderen Fremdstoffen in Haaren. *Pharmazie in unserer Zeit* 22 (1993), 65-78.
25. Spann C., M.E. Winter: Effect of Clenbuterol on athletic performance. *Annals Pharmacother.* 29 (1995), 75-77.

#### Korrespondenzführender Autor:

Prof. Dr. H. H. D. Meyer  
Institut für Physiologie  
Forschungszentrum  
für Milch und Lebensmittel  
Weihenstephan  
Technische Universität München  
Vöttinger Straße 45  
D-85350 Freising  
Tel. +49/8161/71-3508