

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène  
**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit  
**Band:** 92 (2001)  
**Heft:** 3

**Artikel:** Nachweis von Clenbuterol im Urin von Schlachttieren mit dem Biosensor BIACORE Q  
**Autor:** Guggisberg, Dominik / Widmer, Tanja / Koch, Herbert  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-981913>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 15.01.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# Nachweis von Clenbuterol im Urin von Schlachttieren mit dem Biosensor *BIACORE Q*

Dominik Guggisberg, Tanja Widmer\* und Herbert Koch, Bundesamt für Veterinärwesen, Liebefeld-Bern

Eingegangen 6. April 2001, angenommen 7. Mai 2001

## Einleitung

$\beta$ -Agonisten sind direkt wirksame Sympathomimetika mit vorwiegender Wirkung auf  $\beta$ -Adrenoceptoren. Clenbuterol und Salbutamol (Abb. 1) gehören zu den  $\beta_2$ -selektiven Sympathomimetika mit uterusrelaxierender und broncholytischer Wirkung. Clenbuterol wird vorwiegend beim Pferd zur Therapie chronischer Erkrankungen der Atemwege eingesetzt. Indikationen beim Rind sind akute bzw. subakute Atemwegserkrankungen.

Durch Verabreichung dieser Substanzen mit dem Futter kann das Wachstum von Tieren beeinflusst werden.  $\beta$ -Agonisten hemmen die Fettsäurenbildung und

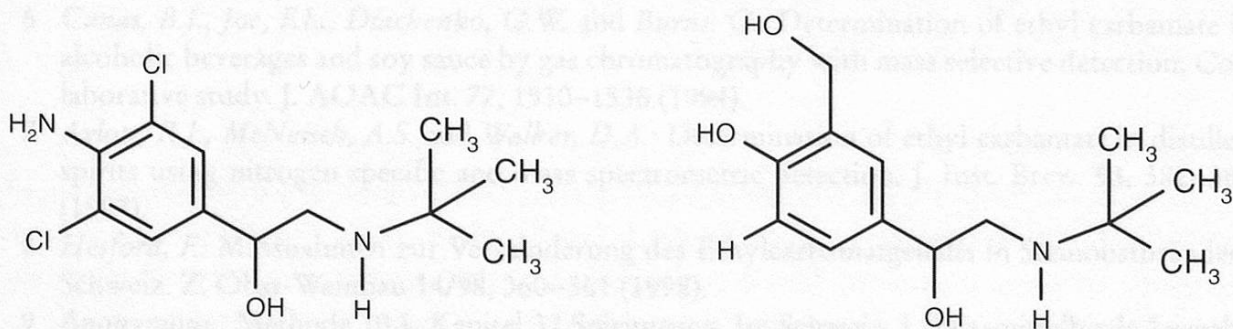


Abbildung 1 Chemische Strukturformel von Clenbuterol (links) und Salbutamol (rechts)

\* Teil der vet.-med. Dissertation von Tanja Widmer

fördern die Lipolyse, während die Proteinsynthese gesteigert und der Abbau von Muskelprotein gehemmt wird. Aufgrund der somit erheblich verbesserten Futterverwertung kommt es zu einer Zunahme des Wachstums mit erhöhtem Muskel- und vermindertem Fettansatz (1).

Seit einigen Jahren werden  $\beta$ -Agonisten illegal zur Steigerung der Mastleistung in 5- bis 10-fach höherer Dosierung als bei einer therapeutischen Anwendung eingesetzt. Der Fleischkonsum von Tieren, die mit erhöhten Dosen behandelt wurden, kann die Gesundheit der Konsumenten ernsthaft gefährden. In den neunziger Jahren wurden in Spanien, Frankreich und Italien mehrere solche Fälle registriert. Typische Symptome sind Tachykardie, Muskelzittern, Nervosität, Kopfschmerzen und seltener auch Übelkeit und Erbrechen (2–5).

In der Schweiz sind die Höchstkonzentrationen für Clenbuterolrückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in der Verordnung über Fremd- und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln festgelegt (6): Fleisch 1  $\mu\text{g/kg}$  und Milch 0,2  $\mu\text{g/kg}$ . In der EU gelten die folgenden Höchstkonzentrationen: Muskel 0,1 ppb, Leber und Nieren 0,5 ppb, Milch 0,05 ppb (7).

Am 10. Januar 2001 informierte das Bundesamt für Gesundheit (BAG) über eine neue Verordnung, welche die Verwendung von Tierarzneimitteln bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, regelt. Die neue Verordnung verbietet die Verabreichung folgender Stoffe und Zubereitungen an Tiere, die zur Lebensmittelgewinnung bestimmt sind: Stoffe mit östrogenen, androgenen oder gestagenen Wirkung sowie  $\beta$ -Agonisten zur Förderung der Mastleistung, soweit nicht bei der Registrierung von Tierarzneimitteln Ausnahmen gewährt werden (8).

Die EU-Mitgliedstaaten versuchen die illegale Anwendung mit Clenbuterol und anderen  $\beta$ -Agonisten unter Kontrolle zu bekommen und führen regelmässige Untersuchungen auf Rückstände durch. Seit 1990 werden in der EU zahlreiche Proben (z.B. 1992 und 1993 mehr als 50 000) von Schlachttieren und Frischfleisch auf Clenbuterolrückstände untersucht. Dabei werden verschiedene analytische Methoden eingesetzt. Da die Nachweisgrenze sehr tief liegen muss und zahlreiche Proben untersucht werden müssen, verwendet man meistens immunochemische Screeningmethoden und analytisch-chemische Methoden (LC-MS, GC-MS, HPLC) zur Bestätigung der positiven Resultate. Für die Rückstandskontrolle in der EU wird von einer Screeningmethode eine Nachweisgrenze von 1 ng Clenbuterol pro ml Urin verlangt. Eine beträchtliche Anzahl dieser Untersuchungen wurden mit ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) durchgeführt, welche sich durch ihre einfache Anwendung und hohe Sensitivität auszeichnen. ELISA eignet sich bestens als Screeningmethode, da in relativ kurzer Zeit eine grosse Anzahl Proben getestet werden kann. Mittlerweile sind verschiedene ELISA-Test-Kits zum Nachweis von Clenbuterol und anderen  $\beta$ -Agonisten im Handel erhältlich (9).

Als Probenmaterial für den Nachweis von Rückständen eignen sich neben Urin, Plasma, Muskel und Leber vor allem auch Haare und Augen. *L. Appelgren et al.* (10) konnten zeigen, dass es möglich ist, nach einer Woche Behandlung (5  $\mu\text{g}$  Clen-



butoerol/kg Körpergewicht, 2-mal täglich) Clenbuterol in Haarproben von Kälbern mit der GC/MS-Methode nachzuweisen. Der Nachweis gelang im pigmenthaltigen Haar bis zu 18 Wochen nach dem Ende einer dreiwöchigen Behandlungszeit.

In der Arbeit von *I. Nausch et al.* (11) wird eine einfache und schnelle 1-Schritt-Screeningmethode vorgestellt, bei der Netzhautgewebe oder Augenhornhaut mit Subtilisin in PBS-Puffer pH 7,0 verdaut und der Überstand direkt mit Enzyme Immunoassay (EIA) analysiert wird.

Es besteht eine immer grösser werdende Nachfrage nach schnellen, automatisierbaren Screeningsystemen, welche Vorteile in finanzieller und technischer Hinsicht mit sich bringen. Unter anderem werden durch die Automatisierung Personalkosten eingespart, was folglich auch die Gesamtkosten pro Probe reduziert. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass eine grössere Anzahl Proben in relativ kurzer Zeit analysiert werden kann. Wichtige Voraussetzungen für ein Detektionssystem, welches für den Online-Einsatz im Schlachthof geeignet sein soll, sind Eigenschaften wie Schnelligkeit und Zuverlässigkeit. Daneben muss ein solches Gerät auch genügend robust sein, um in der rauen Umgebung eines Schlachthofes bestehen zu können. Nur hoch automatisierbare Detektionssysteme sind diesen hohen Anforderungen am ehesten gewachsen. Die Aufarbeitung der Gewebeproben ist jedoch meist immer noch sehr zeitaufwendig (Stunden bis Tage), da die zu analysierenden Substanzen zuerst extrahiert, gereinigt und aufkonzentriert werden müssen. Die Probenaufarbeitung stellt also einen zeitlimitierenden Faktor dar, so dass auch Anstrengungen zur Entwicklung besserer und schnellerer «Clean up»-Methoden unternommen werden müssen (12).

Das Ziel dieser Arbeit war, den Biosensor *BIACORE Q* der Firma Biacore während sechs Monaten auszutesten und zu validieren («in-house»). Zudem wurden pro Woche 40 Urinproben im Schlachthof erhoben und mit Hilfe des Biosensors und dem dazu kommerziell erhältlichen *Qflex Kit Clenbuterol* analysiert. Es galt herauszufinden, ob das Biosensor-System für einen «Online»-Einsatz im Schlachthof zum Nachweis von Tierarzneimittelrückständen grundsätzlich geeignet wäre. Dabei stellten sich insbesondere folgende Fragen:

- Sind die Resultate genügend schnell vorhanden?
- Sind die Resultate zuverlässig?
- Wie hoch sind die Falschpositiv- und Falschnegativraten?
- Wie steht es mit den Kosten pro Probe?

Weiter wurde das Biosensor-System auch mit zwei ELISA-Screening-Methoden verglichen.

### **Kurzbeschreibung des Biosensor-Systems**

Der Biosensor *BIACORE Q* kann zur Messung von Antigen-Antikörper-Reaktionen eingesetzt werden. Auf der goldbeschichteten Oberfläche des Sensor-Chips werden die molekularen Bindungen detektiert. Die Detektion basiert auf dem optischen Phänomen «Surface Plasmon Resonance» (13), das die Änderung der

Konzentration der Biomoleküle an der Sensoroberfläche in Echtzeit und ohne die Benutzung von Markermolekülen in wenigen Minuten misst. Ein Mikrofluidsystem zur Handhabung kleinster Flüssigkeitsmengen transportiert die Proben an die Sensor-Chip Oberfläche. Der Sensor-Chip CM5 besteht aus einer dünnen Glasscheibe, welche einseitig mit Gold beschichtet ist. Der Goldfilm wiederum ist mit einer kovalent gebundenen Matrix (Carboxymethyl-Dextran) bedeckt, auf welcher Moleküle immobilisiert werden können. Die Oberfläche des Sensor-Chips kann regeneriert werden, indem gebundene Moleküle wieder dissoziieren. Somit kann ein Chip mehrmals für verschiedene Messserien verwendet werden (Abb. 2).

## The Technology behind BIACORE®

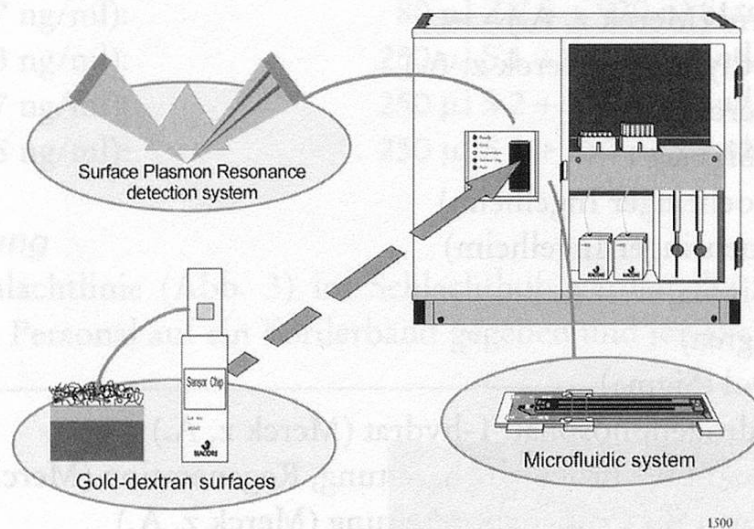


Abbildung 2 Die Biacore-Technologie

### Material und Methode

Der Qflex Kit Clenbuterol wird von der Firma Biacore produziert und ist kommerziell für ca. Fr. 2000 erhältlich. Der Kit ist für 160 Proben ausgelegt und beinhaltet folgende Produkte:

- 1 Gefäß (2 ml) Clenbuterolantikörper, Stammlösung
- 1 Gefäß (260 µl) Clenbuterolderivat, gebrauchsfertig
- 4 Packungen (je 200 ml) Puffer HBS-EP<sup>1</sup>, gebrauchsfertig
- Sensor-Chip CM5
- Behälter zur Lagerung des geöffneten Sensor-Chips

<sup>1</sup> Zusammensetzung des HBS-EP Puffers: c(HEPES, pH 7,4) = 0,01 mol/l c(NaCl) = 0,15 mol/l, c(EDTA) = 3 mmol/l und 0,005 % Surfactant P20



- 4 Mikrotiterplatten (96 Kavitäten)
- 2 Folien für die Abdeckung der Mikrotiterplatten
- Leere Gefäße aus Plastik und Glas für die Reagenzien
- Gummiverschlüsse

### **Zusätzlich benötigtes Material**

- «Amine Coupling Kit» (Biacore)
- TurboVap® LV (Zymark)
- Vortex Genie 2 (Bender und Hobein AG)
- Reagenzgläser (16×100 mm)

### **Chemikalien**

- Kreatinin (Biacore)
- Kaliumchlorid (Merck z. A.)
- Natriumchlorid (Merck z. A.)
- tert.-Butylmethylether (Merck z. A.)
- Harnstoff (Merck z. A.)
- Clenbuterol (Sigma)
- Mabuterol (Boehringer Ingelheim)
- Cimaterol (Boehringer Ingelheim)
- Salbutamol (Sigma)
- Terbutalin (Sigma)
- Metaproterenol (Sigma)
- Natriumdihydrogenphosphat, 1-hydrat (Merck z. A.)
- Natriumhydroxid für Probenvorbereitung, Regeneration (Merck z. A.)
- Natriumcarbonat für Probenvorbereitung (Merck z. A.)
- Dimethylsulfoxid (Merck z. A.)
- di-Natriumhydrogenphosphat 2-hydrat (Merck z. A.)

### **Regenerationslösung**

- $c(\text{Natriumhydroxid}) = 0,1 \text{ mol/l}$

### **Vorbereitung der Standards**

#### **Phosphat-Puffer A**

$c(\text{Natriumphosphat}) = 20 \text{ mmol/l}$ ,  $c(\text{Natriumchlorid}) = 2 \text{ mol/l}$ ,  $c(\text{Kaliumchlorid}) = 2 \text{ mol/l}$ : 0,12 g Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat, 3,40 g Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat, 117 g Natriumchlorid, 149 g Kaliumchlorid in 1000 ml entionisiertem Wasser auflösen, der pH-Wert sollte  $7,2 \pm 0,1$  betragen, falls nötig pH einstellen mit Natriumhydroxid oder Phosphorsäure (zum Aufnehmen der Proben Phosphat-Puffer B vorbereiten: Phosphat-Puffer A 1:1 mit dest. Wasser verdünnt)

### Standard-Puffer

0,40 g Harnstoff und 0,027 g Kreatinin in 10 ml Phosphat-Puffer A auflösen.

### Vorbereitung von 10 ml Clenbuterolstammlösung (0,884 mg/ml)

10 mg Clenbuterolhydrochlorid einwiegen und in entionisiertem Wasser in einem 10-ml-Glasgefäß auflösen (die Endkonzentration bezieht sich auf freies Clenbuterol).

### Standards

Zwischenverdünnung 1 (8,84 µg/ml): 1000 µl Stammlösung in 100-ml-Glasgefäß pipettieren und mit entionisiertem Wasser auf 100 ml auffüllen

Zwischenverdünnung 2 (884 ng/ml): 80 µl ZV 1 + 920 µl Standard-Puffer

Zwischenverdünnung 3 (88,4 ng/ml): 100 µl ZV 2 + 900 µl Standard-Puffer

Standard 1 (7,07 ng/ml): 80 µl ZV 3 + 920 µl Standard-Puffer

Standard 2 (3,53 ng/ml): 250 µl S 1 + 250 µl Standard-Puffer

Standard 3 (1,77 ng/ml): 250 µl S 2 + 250 µl Standard-Puffer

Standard 4 (0,88 ng/ml): 250 µl S 3 + 250 µl Standard-Puffer

### Probenerhebung

An der Schlachtlinie (Abb. 3) im Schlachthof werden die Eingeweide samt Harnblase vom Personal auf ein Förderband gegeben und jeweils parallel zum ent-

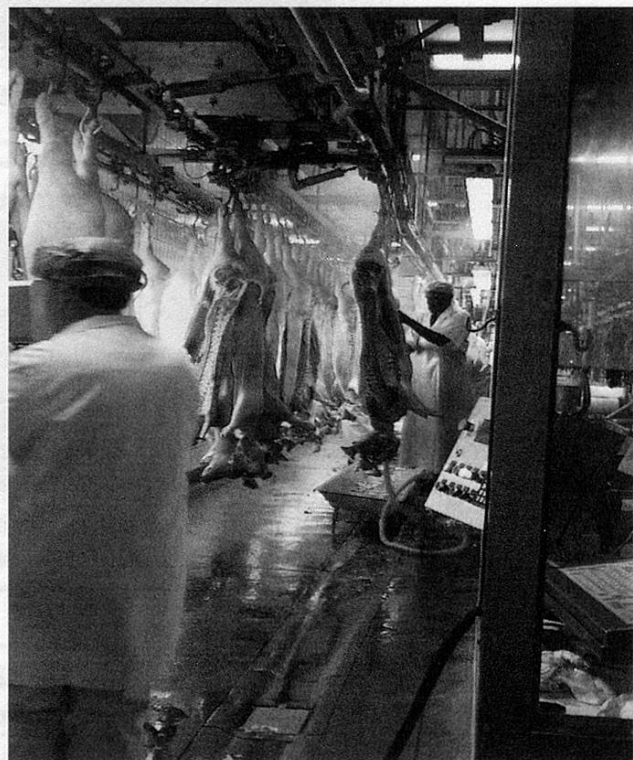


Abbildung 3  
**Schweine-Schlachtlinie**



sprechenden Schlachtkörper weitertransportiert. Am Ort der Eviszeration ist die sichere Zuordnung der Eingeweide zum entsprechenden Schlachtkörper am besten möglich. Die Harnblase wird direkt auf dem Förderband (Abb. 4) mittels einer 20-ml-Spritze (Typ: Luer-Lock) mit Kanüle punktiert. Anschliessend wird die Probe mit der entsprechenden Laufnummer, welche an jedem Schlachtkörper ersichtlich ist, sofort gekennzeichnet.



Abbildung 4 **Punktion der Harnblase**

Unmittelbar nach dem Transport ins Labor werden die frisch erhobenen Urinproben bis zur Analyse im Kühlraum bei 4°C gelagert. Insgesamt wurden 500 Urinproben in zwei verschiedenen Schlachthöfen der Schweiz nach dem Zufallsprinzip erhoben (Tabelle 1). Dabei wurde darauf geachtet, dass pro Bestand etwa 5–10 % Proben erhoben wurden. Aus arbeitstechnischen Gründen wurden die Proben im Labor analysiert.

**Tabelle 1**  
**Probenerhebungen im Schlachthof**

<i>Tierart</i>	<i>Kälber</i>	<i>Grossvieh</i>	<i>Schweine</i>	<i>Schafe</i>
Anzahl Proben	255	116	86	43
Total	500			



## Vorbereitung der Urinproben

Der pH-Wert von Urin kann je nach Tierart stark variieren. Vor allem beim sauren Kälberurin ist es nötig, zusätzlich 500 µl c(Natriumcarbonat) = 1 mol/l zuzugeben, um den pH-Wert in den Soll-Bereich von pH = 9,5 zu bringen.

1. 2 ml Urin in Reagenzglas pipettieren, 500 µl c(NaOH) = 0,1 mol/l zugeben (falls nötig zusätzlich 500 µl c(Natriumcarbonat) = 1 mol/l)
2. pH-Kontrolle: der pH-Wert sollte  $9,5 \pm 0,5$  betragen
3. 4 ml tert.-Butylmethylether zur Probe pipettieren und mit dem «VORTEX» mischen, 3 mal 5 Sekunden
4. Proben zentrifugieren, 10 min bei 2000 rpm
5. Etherphase in separates Reagenzglas transferieren
6. Tert.-Butylmethylether mit dem TurboVap® LV bei 50°C während 20 min eingengen
7. Aufnehmen der Proben mit 250 µl Phosphatpuffer B, während einigen Sekunden auf dem Vortex® mischen

(Zeitaufwand für 40 Urinproben: 3–4 h)

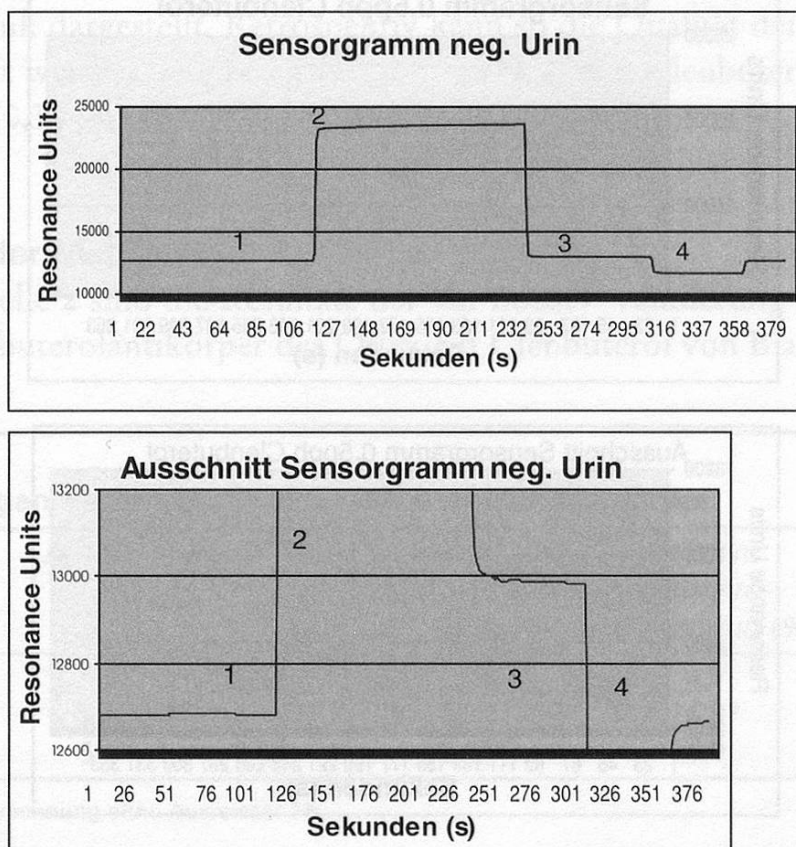


Abbildung 5 **Sensorgramm (Clenbuterol-Kit) neg. Urin, Differenz 1 und 3: 309 RU**  
 1 = Basislinie mit HBS-EP Puffer, 2 = Injektion der Urin-Probe (Bindung des Antikörpers auf der Sensoroberfläche), 3 = Messung der Differenz-Basislinie, 4 = Regeneration der Sensoroberfläche

## Messprinzip

In einem ersten Schritt wird ein Clenbuterolderivat auf der Sensor-Chip-Oberfläche immobilisiert. Für diese vorbereitende Arbeit, welche für jeden *Qflex Kit Clenbuterol* durchgeführt werden muss, ist ebenfalls ein Kit (*Amine Coupling Kit*) von Biacore erhältlich.

Eine bestimmte Menge spezifisches Protein, welches gegen Clenbuterol gerichtet ist (CBP, Clenbuterol binding protein) wird mit der Probe automatisch vermischt. Diese Mischung wird eingespritzt und kommt in Kontakt mit der Sensor-Chip-Oberfläche. Ist Clenbuterol in der Probe vorhanden, bindet das CBP daran und ist somit nicht mehr in der freien Form vorhanden. Gemessen wird die freie Menge des detektierenden Moleküls (CBP), welches an das Clenbuterolderivat auf der Chip-Oberfläche bindet. Danach wird die Sensor-Chip-Oberfläche wieder regeneriert und ist bereit für die Analyse einer weiteren Probe. Die Analyse von 40 Proben inkl. Kalibration und Regeneration dauert ca. 6 h. Beispiele von Sensorgrammen sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt.

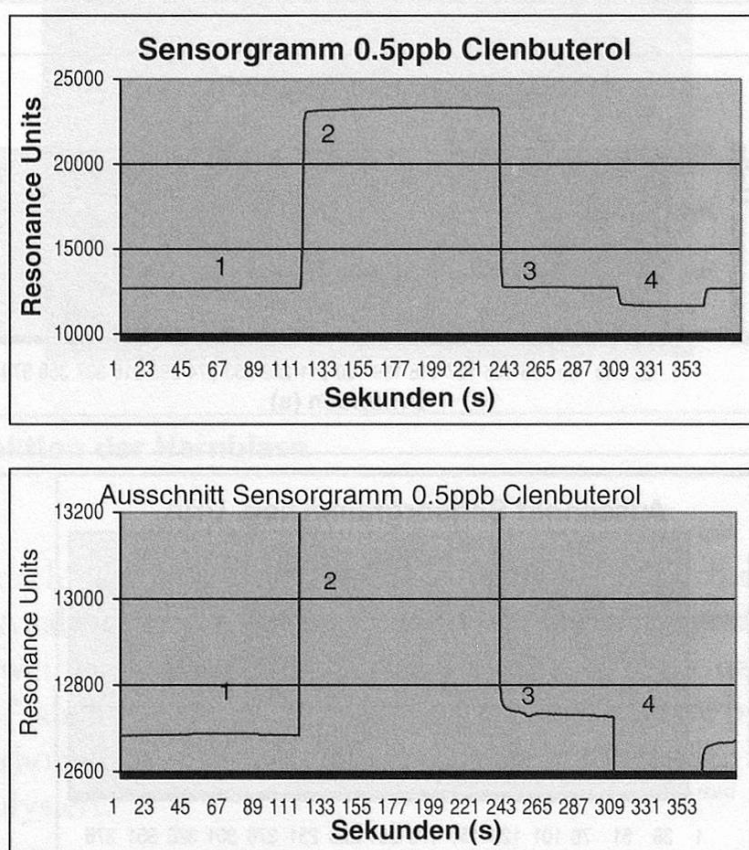


Abbildung 6 **Sensorgramm (Clenbuterol-Kit) Urin mit 0.5 ppb Clenbuterol dotiert, Differenz 1 und 3: 45 RU.** 1 = Basislinie mit HBS-EP Puffer, 2 = Injektion der Urin-Probe (Bindung des Antikörpers auf der Sensoroberfläche), 3 = Messung der Differenz-Basislinie, 4 = Regeneration der Sensoroberfläche



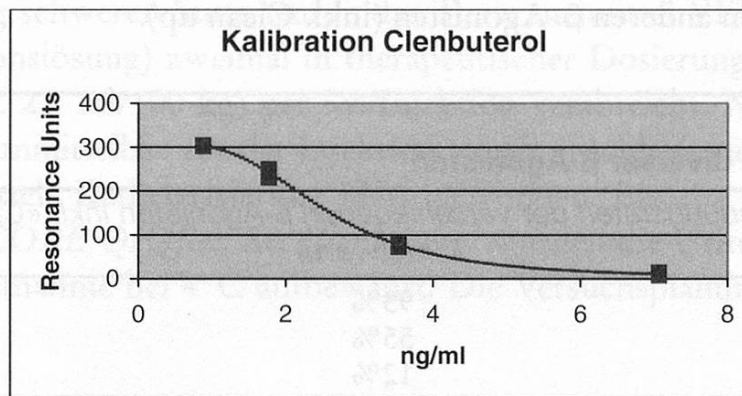


Abbildung 7 **Kalibration des Standards Clenbuterol (0,88–7,07 ng/ml Clenbuterol, entspricht umgerechnet 0,11–0,88 ppb Clenbuterol im Urin)**

Mit vier Standardlösungen (Doppelbestimmung) wird eine Kalibrationskurve (Abb. 7) generiert, welche zur Quantifizierung der Proben dient.

Als Qualitätssicherung wird die Basislinie nach jeder Messung kontrolliert und in einer Graphik dargestellt. Retrospektiv kann so die Qualität der Resultate einer Serie überprüft werden. Die Nachweisgrenze (NG) von Clenbuterol liegt im Urin bei 0,3 ng/ml (0,3 ppb).

### Validierung der Methode

In der Tabelle 2 sind die Resultate der «in-house»-Validierung mit dem monoklonalen Clenbuterolantikörper des Qflex Kit Clenbuterol von Biacore dargestellt.

Tabelle 2

#### Wiederfindungen bei dotiertem Urin mit dem Kit-Antikörper

Urin: dotierter Gehalt (ppb)	Anzahl	Mittelwert (ppb)	Standard-abweichung (ppb)	Relative Standard-abweichung (%)	Mittlere Wiederfindung (%)
0,3	5	0,26	0,01	4,1	85,3
0,4	5	0,39	0,07	16,8*	97,9
0,5	5	0,52	0,03	5,9	103,2

\* ein Ausreisser; Berechnung ohne Ausreisser 7%



Die Tabelle 3 veranschaulicht Mittelwerte der Wiederfindungen von Clenbuterol sowie von diversen anderen  $\beta$ -Agonisten (inkl. Clean up).

**Tabelle 3**  
**Wiederfindungen diverser  $\beta$ -Agonisten**

<i>Wiederfindungsraten der verschiedenen <math>\beta</math>-Agonisten inkl. «Clean up»</i>	
<i>Mittelwerte</i>	
1. Clenbuterol	95%
2. Mabuterol	55%
3. Cimaterol	12%
4. Salbutamol	6%
5. Terbutalin	0%
6. Metaproterenol	0%

Eine weitere Validierung wurde mit einem polyklonalen Salbutamol-Antikörper versucht (Tabelle 4), wobei sich aber Probleme mit der Regeneration des Sensor-Chips ergaben. Dieser polyklonale Antikörper liess sich nicht optimal von der Sensor-Chip-Oberfläche entfernen, selbst nach aufwendiger Reinigung mit Protein A.

**Tabelle 4**  
**Wiederfindungen bei dotiertem Urin (polyklonaler Salbutamol-Antikörper)**

<i>Urin: dotierter Gehalt (ppb)</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert (ppb)</i>	<i>Standard- abweichung (ppb)</i>	<i>Relative Standard- abweichung (%)</i>	<i>Mittlere Wieder- findung (%)</i>
0,3	5	0,38	0,05	12,7	127
0,4	5	0,50	0,04	7,3	124
0,5	5	0,61	0,03	5,3	121

## Resultate

Von den insgesamt 500 erhobenen und mit dem Biosensor analysierten Urinproben waren drei positiv, ergaben also ein Resultat von mehr als 0,3 ppb Clenbuterol. Diese positiven Proben wurden ebenfalls mit LC-MS (14) gemessen und konnten als falschpositiv bestätigt werden. Auf 500 Proben berechnet, beträgt die Falschpositivrate somit 0,6 %. Alle 16 zufällig ausgewählten Proben, die mit dem Biosensor ein negatives Resultat gezeigt haben, ergaben bei Messung mit der LC-MS Methode ebenfalls ein negatives Resultat.

Da sich unter den 500 erhobenen Urinproben keine richtigpositiven Proben befanden, war noch nicht bewiesen, dass der Biosensor auch sog. «gewachsene» Urinproben als positiv erkennt. Mit Hilfe eines Tierversuchs konnte der Biosensor mit mehreren Urinproben eines behandelten Pferdes überprüft werden und zeigte durchwegs positive Resultate, welche ebenfalls mit LC-MS bestätigt wurden.

## Tierversuch

Einer 640 kg schweren Stute wurde das Tierarzneimittel VENTIPULMIN ad us. vet. (Injektionslösung) zweimal in therapeutischer Dosierung ( $0,8 \mu\text{g/kg}$  Körpergewicht bzw.  $2,7 \text{ ml}/100 \text{ kg}$ ) per i.v. Injektion verabreicht. Nebst einer ersten Harnentnahme unmittelbar vor der Injektion wurde anschliessend alle sechs weiteren Stunden mittels Katheterisierung Harn gewonnen. Bis zur Analyse mit dem Biosensor *BIACORE Q/Qflex Kit Clenbuterol* wurden die Urinproben unmittelbar nach der Entnahme bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Versuchsplanung ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5

### Die Behandlung einer Stute mit VENTIPULMIN (Versuchsplanung)

Tag 1	Eingriff	Stunden nach Beginn des Versuchs	Probennummer
12.00 Uhr	Entnahme von Harn	0	0
	1. Injektion		
18.00 Uhr	Entnahme von Harn	6	1
	2. Injektion		
24.00 Uhr	Entnahme von Harn	12	2
Tag 2			
06.00 Uhr	Entnahme von Harn	18	3
12.00 Uhr	Entnahme von Harn	24	4

### Resultate vom Pferdeurin mit dem *BIACORE Q* (positiv falls $> 0,3 \text{ ng/ml}$ )

Die Werte der Harnproben Nr. 1 bis Nr. 4 lagen alle oberhalb  $0,884 \text{ ng/ml}$ . Grössere Werte können vom Biosensor nicht berechnet werden.

- Harnprobe Nr. 0: negativ ( $< 0,110 \text{ ng/ml}$ )
- Harnprobe Nr. 1: positiv ( $> 0,884 \text{ ng/ml}$ )
- Harnprobe Nr. 2: positiv ( $> 0,884 \text{ ng/ml}$ )
- Harnprobe Nr. 3: positiv ( $> 0,884 \text{ ng/ml}$ )
- Harnprobe Nr. 4: positiv ( $> 0,884 \text{ ng/ml}$ )

Um die in der Harnprobe Nr. 4 enthaltene Menge Clenbuterol genau berechnen zu können, wurde die Probe anstatt in  $250 \mu\text{l}$  in  $6250 \mu\text{l}$  Phosphatpuffer B aufgenommen (entspricht einer Probenverdünnung von 1:25) und analysiert. Somit konnte berechnet werden, dass die Harnprobe Nr. 4 ca.  $21 \text{ ppb}$  Clenbuterol enthält.

### Berechnetes Resultat

Harnprobe Nr. 4 (1:25):  $0,852 \text{ ng/ml}^2$  ( $0,852 \text{ ng/ml} \times 25 = 21,3 \text{ ng/ml}$  oder  $21,3 \text{ ppb}$ )

<sup>2</sup> Berechnung:  $0,852 \text{ ng/ml} \times 25 = 21,3 \text{ ng/ml}$ ; dies entspricht  $21,3 \text{ ppb}$



Die 5 Urinproben wurden ebenfalls mit LC-MS gemessen. Der pharmakokinetische Verlauf ist in Abbildung 8 dargestellt.

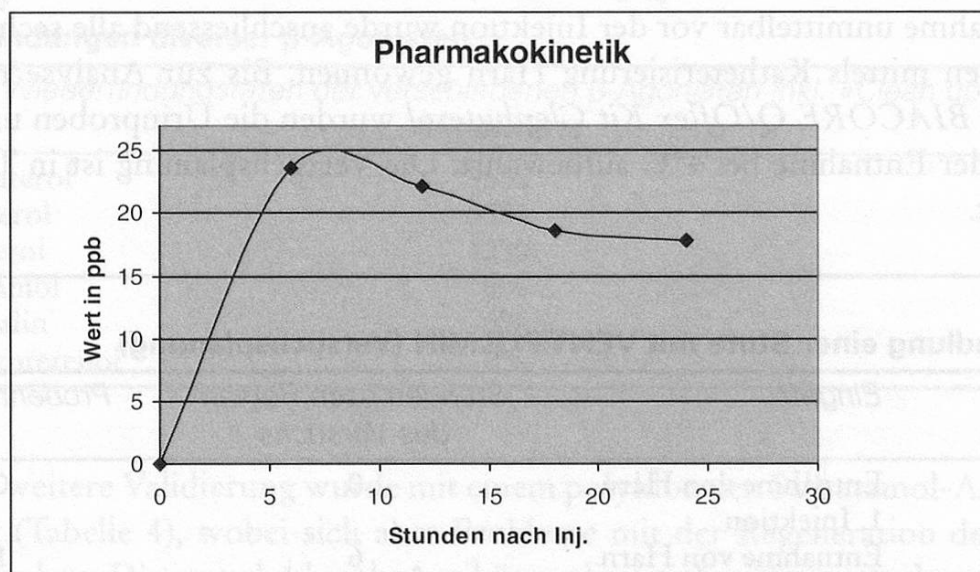


Abbildung 8 **Pharmakokinetik (Resultate der Pferdeharnproben mit LC-MS)**

### Methodenvergleich

Das Biosensor-System *BIACORE Q* wurde mit zwei verschiedenen ELISA-Testkits bezüglich Zeitaufwand, Nachweisgrenze, Falschpositivrate und Kosten pro Probe verglichen. Die Resultate des Methodenvergleichs sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6

#### Methodenvergleich BIACORE Q und 2 ELISA-Test Kits

<i>BIACORE Q</i>	<i>ELISA (Firma A)</i>	<i>ELISA (Firma B)</i>
40 Proben	40 Proben	40 Proben
NWG: 0,3 ppb	NWG: ca. 1 ppb	NWG: ca. 0,2–1 ppb
Falschpositive: 0	Falschpositive: 5	Falschpositive: 1
Arbeitszeit: 4 h	Arbeitszeit: 1 h 15 min	Arbeitszeit: 4 h
Messzeit: 6 h 40 min	Messzeit: 2 h	Messzeit: 2 h
«Clean up»: tert.-Butylmethylether	Clean up: ohne «Clean up»	«Clean up»: Isobutanol
Kosten: 12.–/Probe	Kosten: 21.–/Probe	Kosten: 17.–/Probe

### Diskussion

Die zuverlässigen Resultate bei der Validierung des Biosensor-Systems und die Tatsache, dass sich unter 500 Urinproben nur gerade drei falschpositive befanden, spricht für den Einsatz des Biosensors als Screening-Methode zum Nachweis von



Tierarzneimittelrückständen mit den entsprechenden Kits von Biacore (Kits für weitere Tierarzneimittel sind in Entwicklung). Zukünftig soll ein Gerät entwickelt werden, mit dem möglichst viele verschiedene Tierarzneimittel gleichzeitig auf verschiedenen Kanälen des Sensor-Chip immobilisiert und nachgewiesen werden können (FoodSENSE Projekt).<sup>3</sup>

Es ist durchaus denkbar und technisch möglich, den Biosensor direkt im Schlachthof einzusetzen. Die Analyse der Proben direkt vor Ort würde den relativ grossen Zeitaufwand für den Transport der Proben ins Labor eliminieren und die Resultate wären noch schneller verfügbar. Die relativ einfache Handhabung und die Robustheit des Gerätes ermöglichen auch ungeübten Personen schnell mit dem Gerät umzugehen, während die Durchführung eines ELISA-Testkits für ungeübte Personen wesentlich problematischer ist.

Unter den 500 im Schlachthof erhobenen Urinproben fanden sich keine clenbuterolpositiven Proben. Deshalb wurde mit einem Tierversuch gezeigt, dass auch sogenannte «gewachsene» Urinproben vom Biosensor-System problemlos als positiv erkannt werden können. Bekanntlich liegen viele Tierarzneimittel im Urin in Form von Glucuroniden oder anderen Metaboliten vor. Offensichtlich ist es möglich, wie der Tierversuch mit dem Pferdeurin gezeigt hat, dass der monoklonale Antikörper sehr gut auf vorhandene Metaboliten von Clenbuterol anspricht. Möglicherweise ist die «wahre» Clenbuterolkonzentration tatsächlich noch höher, als mit der Methode analysiert wird, da nur ein Teil der Metaboliten vom Antikörper erkannt wird.

Versuche mit dem eigenen polyklonalen Salbutamol-AK zeigten etwas bessere Kreuzreaktionen mit anderen  $\beta$ -Agonisten, die Regeneration des Antikörpers von der Sensor-Chip Oberfläche war jedoch wesentlich schwieriger. Die Basislinie nahm stetig zu, was schliesslich zu zweifelhaften Resultaten führte. Aus diesem Grunde konnte der eigene polyklonale Antikörper nicht für Clenbuterol eingesetzt werden. Auch durch die Aufreinigung des polyklonalen Antikörpers auf der Basis von Protein A (Proteinreinigungskit der Firma Pierce) konnte das Regenerationsproblem nicht vermindert werden.

Die Anzahl der bekannten  $\beta$ -Agonisten wird jährlich erhöht. Eine gewünschte Screening-Methode sollte möglichst viele dieser  $\beta$ -Agonistenfamilie abdecken. Der gewählte Weg des Clenbuterolkits geht hier einen Kompromiss ein. Clenbuterol als der zur Zeit wichtigste Vertreter wird mit einer Kreuzreaktivität von 100 % gefunden. Dieser Kompromiss muss mit monoklonalem Antikörper zu Gunsten einer optimalen Regeneration eingegangen werden.

Da eine möglichst tiefe Nachweisempfindlichkeit für Clenbuterol und weitere  $\beta$ -Agonisten zu erfüllen war, musste auch das Clean up relativ aufwendig gestaltet werden. Nach der Einstellung des pH auf 9,5 (je nach Tierart einstellen!) wurden vorhandene  $\beta$ -Agonisten mit tert.-Butylmethylether extrahiert. Der Extrakt wurde

<sup>3</sup> <http://www.slv.se/foodsense2/>

anschliessend vollständig eingengt. Diese einzelnen Arbeitsschritte benötigen für eine einzelne Probe ca. 20 Minuten, für 40 Proben ca. vier Stunden. Es wäre zwar möglich, nur ein vereinfachtes Clean up einzusetzen (Ultrazentrifugation oder Immunofiltration), dabei könnte aber die tiefe Nachweisempfindlichkeit von 0,3 ppb nicht erreicht werden.

Der Zeitaufwand für die Vorbereitung und Analyse von 40 Urinproben ist mit dem ELISA-Testkit wesentlich geringer als mit dem Biosensor *BIACORE Q*. Dieser Vorteil gegenüber dem Biosensor verliert im Methodenvergleich jedoch stark an Bedeutung wegen der für ein Screening-System zu hohen Rate an falschpositiven Resultaten. Der Zeitaufwand für die Bestätigung so vieler falschpositiver Proben mit der LC-MS Methode wäre bei einer Routineanwendung sehr gross.

Es ist unmöglich und wahrscheinlich wenig sinnvoll, sämtliche Tiere flächendeckend auf Clenbuterol kontrollieren zu wollen. Realistisch wäre eine 5–10%ige Stichprobenzahl/Bestand. Die probenerhebende Person muss über die jeweils zu schlachtenden Bestandesgrössen und über den Bestandeswechsel an der Schlachtlinie informiert sein.

## **Zusammenfassung**

Der Biosensor *BIACORE Q* wurde während eines Projektes ausgetestet und validiert. Es galt insbesondere herauszufinden, ob das Biosensor-System für einen «Online»-Einsatz im Schlachthof zum Nachweis von Tierarzneimittelrückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs grundsätzlich geeignet wäre.

Diese Machbarkeitsstudie wurde anhand der Beispiele Clenbuterol und anderer  $\beta$ -Agonisten durchgeführt. Es wurden insgesamt 500 Urinproben in zwei Schlachthöfen erhoben und mit Hilfe des Biosensors und dem dazu kommerziell erhältlichen *Qflex Kit Clenbuterol* analysiert.

Die Bestätigungsmethode positiver Proben war LC-MS. Weiter wurde das Biosensor-System mit zwei ELISA-Testkits bezüglich Zeitaufwand, Nachweisgrenze, Falschpositivrate und Kosten pro Probe verglichen.

Es ist durchaus denkbar und technisch möglich, den Biosensor direkt im Schlachthof einzusetzen. Wie die Validierungs- und Untersuchungsergebnisse für Clenbuterol gezeigt haben, ist die Analysenmethode mit dem *BIACORE Q* rasch und zuverlässig.

## **Résumé**

Le biosenseur *BIACORE Q* a été testé et validé avec la possibilité d'une utilisation «online» dans les abattoirs pour la détermination de résidus de médicaments vétérinaires.

Cette étude a été effectuée avec des  $\beta$ -agonistes, entre autre le clenbuterol. 500 échantillons d'urines ont été collectés dans deux différents abattoirs et analysés à l'aide du biosenseur *BIACORE Q* et avec le «*Qflex Kit Clenbuterol*». Tous les échantillons testés positifs ont été confirmés par LC-MS. Le biosenseur a aussi été



comparé avec deux tests ELISA. Ceci dans le but de comparer la rapidité du test, la limite de détection, le rapport des échantillons faux positifs et le coût par échantillon.

Il est techniquement possible d'utiliser le biosenseur directement à l'abattoir. La méthode d'analyse est rapide et fiable.

### **Summary "Detection of Clenbuterol in Urine of Meat Stock by Biosensor BIACORE Q"**

The biosensor *BIACORE Q* was tested and validated with the aim to find out if it is possible to use the biosensor online in the slaughterhouse for analysis of drug residues.

This study was accomplished with the example of clenbuterol and other  $\beta$ -agonists. A total of 500 urine samples were collected in the slaughterhouse and analysed by biosensor *BIACORE Q* and *Qflex Kit Clenbuterol*. All samples tested positive were confirmed with LC-MS. The biosensor system was also compared with other screening methods like ELISA-testkits relating to time spent, detection limit, false positive rate and costs per sample.

From a technical point of view it is possible to use the biosensor directly at the slaughterhouse. The analysis method is rapid and reliable.

### **Key words**

Clenbuterol, Biosensor, Urine, Slaughterhouse, Drug residues

### **Literatur**

- 1 Frey, H. und Löscher, W.: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 116–118. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1996.
- 2 Salleras, L., Dominguez, A., Mata, E., Taberner, J., Moro, I. and Salva, P.: Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public Health Reports* **110**, 338–342 (1995).
- 3 Maistro, S., Chiesa, E., Angeletti, R. and Brambrilla, G.: Beta blockers to prevent clenbuterol poisoning. *Lancet* **346**, 180 (1995).
- 4 Pulce, C., Lamaison, D., Keck, G., Bostvironnois, C., Nicolas, J. and Descotes, J.: Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver. *Vet Hum. Toxicol.* **33**, 480–481 (1991).
- 5 Brambilla, G., Cenci, T., Franconi, F., Galarini, R., Macri, A., Rondoni, F., Strozzi, M. and Loizzo, A.: Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicology Letters* **114**, 47–53 (2000).
- 6 Verordnung über Fremd- und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln vom 26. Juni 1995. EDMZ, Bern 1995.
- 7 Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, Verordnung (EG) Nr. 2391/2000 der Kommission vom 27. Oktober 2000 zur Änderung der Anhänge I, II und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs.
- 8 Neue Verordnung über die Verwendung von Tierarzneimitteln bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen. Mitteilungen des Bundesamtes für Veterinärwesen **2**, 24 (2001).



- 9 Hahnau, S. and Jülicher, B.: Evaluation of commercially available ELISA tests for the detection of clenbuterol and other beta2-agonists. Food Addit. Contam. 13, 259 (1996).
- 10 Applegren, L., Bondesson, U., Frederiksson, E., Ingvast, C., Jansson, L. und Jansson, D.: Untersuchung von Haarproben von Kälbern auf Clenbuterol. Fleischwirtschaft 76, 314–316 (1996).
- 11 Nausch, I. and Galley, K.: Fast screening of beta-agonist residues in eyes of meat stock by enzyme immunoassay (EIA). Archiv für Lebensmittelhygiene 50, 104–105 (1999).
- 12 Elliot, C.: Fast automated screening systems for veterinary drug residues. EuroResidue 5, 54–62 (2000).
- 13 Schindler, F.: Surface plasmon resonance – was steckt dahinter? Laborpraxis, 38–42 (Oktober 2000).
- 14 Leicht modifizierte und adaptierte Methode von: Van Vyncht, G., Preece, S., Gaspar, P., Maghuin-Rogister, G. and DePauw, E.: Gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the multiresidue analysis of  $\beta$ -agonists in biological matrices. J. Chromatogr. A. 750, 43–49 (1996).

Korrespondenzadresse: Dr. Dominik Guggisberg, Bundesamt für Veterinärwesen, Sektion Chemie, Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern