

Methode zur quantitativen Bestimmung von Salbutamol im Kälberurin mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion = Method for quantitative determination of salbutamol in urine by HPLC and fluorescence detection

Autor(en): **Laska, Heinz / Berger, Michael / Camenzind, Rudolf**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **86 (1995)**

Heft 5

PDF erstellt am: **09.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983644>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Methoden zur quantitativen Bestimmung von Salbutamol im Kälberurin mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion

Method for Quantitative Determination of Salbutamol in Urine by HPLC and Fluorescence Detection

Key words: Salbutamol, Urine, Internal standard, Fluorescence detection

Heinz Laska, Michael Berger und Rudolf Camenzind
Interlabor Belp AG, Belp

Einleitung

Salbutamol (Abb. 1) ist ein in der Humanmedizin zugelassenes Arzneimittel, das als β_2 -Sympathomimetika bei der Behandlung von Asthma bronchiale Verwendung findet. Es wirkt auf die glatte Muskulatur der Bronchien krampflösend ein. Als Tierarzneimittel ist es nicht zugelassen. In der chemischen Struktur ähnelt es sehr stark dem ebenfalls illegal in Kälbermastbeständen angewandten Clenbuterol, welches in der Tiermedizin zur Behandlung von Erkrankungen der Atemwege zugelassen ist. Werden Mengen verabreicht, die weit über den therapeutisch vorgesehenen Dosen liegen, entfalten beide Substanzen eine mastfördernde Wirkung (1).

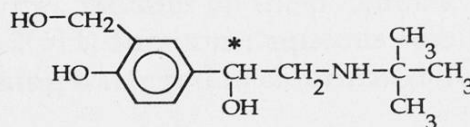


Abb. 1. Salbutamol

Salbutamol und Clenbuterol gehören zu der Gruppe der β -Agonisten. Eine gleichzeitige Bestimmung verschiedener β -Agonisten ist wegen der stark unterschiedlichen Basizität und Polarität kompliziert (2).

Kurzbeschreibung der Methode

Die Urinprobe wird zur Spaltung der Glukuronide hydrolysiert und das Hydrolyseprodukt auf einer Sep-Pack C₁₈-Kartusche angereichert. Die Wirkstoffe werden eluiert und über einer Si-Kartusche gereinigt. Das Eluat wird eingeeengt und an LiChrospher RP-18 chromatographiert. Die Endbestimmung erfolgt mittels Fluoreszenzdetektion bei 309 nm und einer Anregung von 230 nm (3).

Material und Methode

Geräte und Hilfsmittel

- Ultraschallbad (Sonorex TR 52)
- Injektionskanülen 0,80 x 50 mm (Semadeni)
- Acrodisc-Filter 0,45 µm (Scan)
- Hochdruckflüssigkeits-Chromatographiesystem mit FL-Detektion (Hewlett-Packard)
- 2-ml-Einwegspritzen
- Rotationsverdampfer (Büchi)
- Vortex Mixer (Bender & Hobein)
- pH-Meter (WTW)
- 20-ml-Bechergläser
- 10-ml-Reagenzgläser
- Sep-Pack C₁₈-Kartusche (Waters Art.-Nr. 51910)
- Vac-Elut-SPS 24 (ICT) mit Wasserstrahlvakuum
- Si-Kartusche Bond Elut (ICT Art.-Nr. 601 303)
- Reaktiblock (Ismatec SA)
- LiChrosorb RP 18, 250 – 4 mm, 7µm (Merck Art.-Nr. 230 686)
- Serumfläschchen

Chemikalien und Reagenzien

- ortho-Phosphorsäure (Fluka Nr. 79620)
- Salzsäure 37% (Merck Nr. 319)
- Natriumhydroxid (Fluka Nr. 71690)
- Methanol (Mächler Nr. 38916)
- Kaliumdihydrogenphosphat (Merck Nr. 4873)
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Fluka Nr. 71640)
- Salbutamol-Hemisulfat (Sigma S-5013), Reinheit 99%
- Terbutalin-Hemisulfat (Sigma T-2528), Reinheit 99,9%
- HPLC-Wasser (Milli Q-Plus 185)

Mobile Phase (Angabe in Volumenteilen):

A: 97 Teile HPLC-Wasser und 3 Teile Methanol werden mit konz. H_3PO_4 auf pH 2,5 eingestellt.

B: 50 Teile HPLC-Wasser und 50 Teile Methanol werden mit konz. H_3PO_4 auf pH 2,5 eingestellt.

Die Fließmittel werden ca. 5 Minuten bei einem schwachen Heliumstrom entgast.

– 1 N Natriumhydroxidlösung:

40 g NaOH werden eingewogen, portionsweise in HPLC-Wasser gelöst und mit HPLC-Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

– 0,1 N Salzsäure:

9,8 ml konz. HCl werden zu etwas vorgelegtem HPLC-Wasser gegeben und mit HPLC-Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

– 0,01 N Salzsäure:

100 ml 0,1 N Salzsäure werden in etwas vorgelegtes HPLC-Wasser gegeben und auf 1000 ml aufgefüllt.

– Phosphatpuffer pH 7,9:

3,58 g KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat) und 7,26 g Na_2HPO_4 (Di-Natriumhydrogenphosphat) werden in HPLC-Wasser gelöst, mit 1 N NaOH auf pH 7,9 eingestellt und mit HPLC-Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

– Saure Methanollösung:

Methanol und 2 N HCl werden in einem Verhältnis von 4:1 gemischt.

Stamm- und Standardlösung

– Stammlösungen:

Je 12,1 mg Salbutamol und Terbutalin (ISTD) werden separat in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, in Methanol gelöst und mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt. Entspricht 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

– Verdünnungen I:

1 ml der Salbutamol-Stammlösung wird in einen 100-ml-Messkolben gegeben und mit 0,01 N HCl auf 100 ml aufgefüllt. Entspricht 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

– Verdünnungen II:

5 ml der Salbutamol-Stammlösung werden in einen 100-ml-Messkolben gegeben und mit 0,01 N HCl auf 100 ml aufgefüllt. Entspricht 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

– Interne Standardlösung (ISTD):

1 ml der Terbutalin-Stammlösung wird in einen 100-ml-Messkolben gegeben und mit 0,01 N HCl auf 100 ml aufgefüllt. Entspricht 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Jeder Standardlösung (vgl. Tabelle 1) werden 1 ml der internen Standardlösung (ISTD) zugegeben und mit 0,01 N HCl zur Marke aufgefüllt. Die Stammlösung und die Standards werden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und sind drei Monate haltbar.

Tabelle 1. Standards

Standards	Konz. der Standards in µg/ml	Menge der Wirksubstanz in 50 ml Lösung	Volumina der Verdünnung II mit 5,0 µg/ml
I	1,0	50 µg	10,00 ml
II	0,2	10 µg	2,00 ml
III	0,1	5 µg	1,00 ml
IV	0,02	1 µg	0,20 ml

Probenaufbereitung

Zur Extraktion der Probe werden 5 g Urin in ein Reagenzglas eingewogen, mit 1 ml ISTD-Lösung und 1 ml 1 N HCl versetzt und gut gemischt. Das Gemisch wird 60 Minuten bei 60 °C im «Reaktiblock» hydrolysiert. Je nach Verbindung werden im Harn unveränderte Muttersubstanzen, Metaboliten und konjugierte Metaboliten ausgeschieden. Zur Spaltung der Konjugate und Metaboliten dient die thermische Behandlung mit Salzsäure.

Anschliessend wird das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und in ein 50-ml-Becherglas überführt. Das Gemisch wird mit 5 ml Pufferlösung pH 7,9 versetzt und mit 1 N Natronlauge am pH-Meter auf pH 7,9 eingestellt.

Konditionieren der Sep-Pak C₁₈-Kartusche (immer das kurze Anschlussstück nach oben): Der «Vac-Elut» wird auf die Position «Wash» gestellt und nacheinander werden 5 ml Methanol, 5 ml HPLC-Wasser und 5 ml Pufferlösung pH 7,9 auf die Kartusche gegeben (Kartusche darf nicht mehr trocken laufen).

Das auf pH 7,9 eingestellte Gemisch wird auf die konditionierte Sep-Pak-Kartusche gegeben und tropfenweise bei leichtem Vakuum durchgesaugt (verwerfen). Die Kartusche wird nacheinander mit 4 ml Pufferlösung pH 7,9 und 4 ml HPLC-Wasser gespült (verwerfen). Anschliessend werden 100 µl Methanol auf die Kartusche gegeben und mit Vakuum von ca. 150 Torr 20–30 min trockengesaugt (4–5).

Der «Vac-Elut» wird auf die Position «Collect» gestellt und die Patrone mit 80 µl 0,01 N HCl benetzt. Hier werden die sekundären Wechselwirkungen an den noch freien Silanolgruppen der Kartusche, auf die ein Teil der nicht sehr selektiven Retention vom Salbutamol zurückzuführen ist, gebrochen. Hiernach wird die Wirksubstanz mit 6 ml Methanol von der Kartusche in ein Reagenzglas eluiert.

Reinigung des Probenextraktes

Zur Konditionierung der Si-Kartusche wird der «Vac-Elut» auf die Position «Wash» gestellt. Mit 10 ml Methanol wird die Si-Kartusche gespült, wobei dann die Kartusche nicht mehr trockenlaufen darf.

Das Eluat der Sep-Pak-Kartusche wird auf die Si-Kartusche gegeben und Tropfen für Tropfen bei leichtem Vakuum durchgesaugt (verwerfen). Die Kartusche wird mit 2 ml Methanol gespült und anschliessend bei vollem Vakuum ca. 20 min trockengesaugt. Der Vac-Elut wird auf die Position «Collect» gestellt und die Wirksubstanz mit 5 ml saurer Methanollösung eluiert. Hier liegen sehr selektive Wechselwirkungen (H-Brückenbindung) der Verbindungen mit den Silanolgruppen der Si-Kartusche vor, die nur durch Elutionslösungen mit hoher Ionenstärke aufgehoben werden können.

Das Eluat wird am Rotationsverdampfer bei 45 °C unter leichtem Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird sofort mit 1 ml 0,01 N HCl aufgenommen, kurz ultrageschallt und über ein Acrodisc-Filter in ein Serumfläschchen filtriert. Die Lösung wird bis zur Endbestimmung kühl und dunkel gelagert.

HPLC-Bedingungen

Stationäre Phase:	LiChrospher RP-18, 250-4 mm, 7 µm	
Ofentemperatur:	40 °C	
Einspritzvolumen:	25 µl	
Wellenlänge:	EX = 230 nm, EM = 309 nm	
Empfindlichkeit (Pmtgain):	12	
Fluss:	1,2 ml/min	
Fließmittelgradient:		
	<i>Zeit in Minuten</i>	<i>% B</i>
	0,01	2
	3,00	2
	10,00	20
	12,00	25
	15,00	25
Elutionszeit:	Salbutamol ca. 12 min	
	Terbutalin ca. 11 min	

Berechnung

Bestimmung der Responsfaktoren Q für die Eichpunkte

$$Q_{Salb.} = \frac{A_{ISTD} \cdot K_{Salb.}}{A_{Salb.} \cdot K_{ISTD}}$$

- $Q_{Salb.}$ = Responsfaktor Salbutamol
- A_{ISTD} = Fläche interner Standard
- $A_{Salb.}$ = Fläche Salbutamol
- K_{ISTD} = Konzentration interner Standard in µg/ml
- $K_{Salb.}$ = Konzentration Salbutamol in µg/ml

Bestimmung des Gehaltes an Salbutamol in der Probe

$$G_{Salb.} = \frac{A_{Salb.} \cdot Q_{Salb.} \cdot G_{ISTD}}{A_{ISTD} \cdot m_{Probe}} \cdot 1000$$

- $Q_{Salb.}$ = Mittelwert der Responsfaktoren aller Standardlösungen der Eichkurve
 A_{ISTD} = Fläche interner Standard
 $A_{Salb.}$ = Fläche Salbutamol
 m_{Probe} = Einwaage Probenmaterial in g
 G_{ISTD} = Gehalt interner Standard in μg in der Probe
 $G_{Salb.}$ = Gehalt Salbutamol in der Probe in $\mu\text{g}/\text{kg}$

Wiederfindung

Urin (5 g) wird in je fünfmaliger Ausführung mit 500 μl , mit 100 μl und mit 50 μl der Verdünnung I dotiert (entsprechend 100 ppb, 20 ppb und 10 ppb Salbutamol) (Tabelle 2, Abb. 2–4).

Tabelle 2. Wiederfindungen von dotierten Urinproben

Urin dotierter Gehalt (ppb)	Anzahl	Mittelwert (ppb)	Standardabweichung (ppb)	Relative Standardabweichung (%)	Vertrauensbereich (ppb)
10	$n = 5$	12	0,4	3,1	12 ± 1
20	$n = 5$	24	2,7	11,6	24 ± 3
100	$n = 5$	93	4,5	5,2	93 ± 6

Bestimmungs- und Detektionsgrenze

Die untere analytische Bestimmungsgrenze beträgt 5 ppb. Die Detektionsgrenze (Signal/Rauschen-3:1) beträgt 1 ppb.

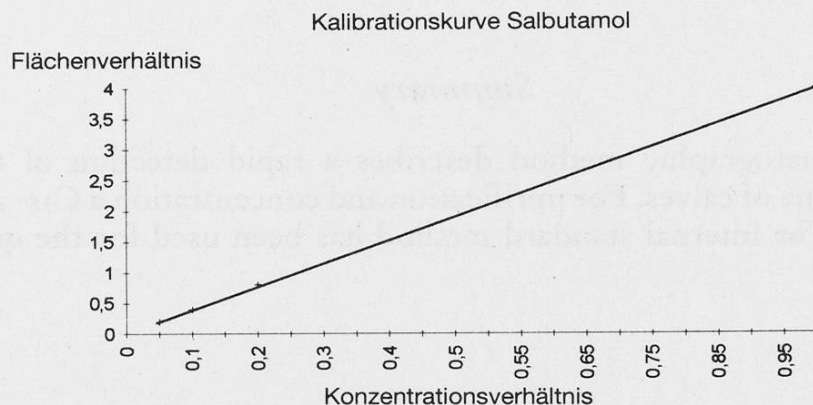


Abb. 2. Kalibrierung von Salbutamol zur Auswertung über den internen Standard

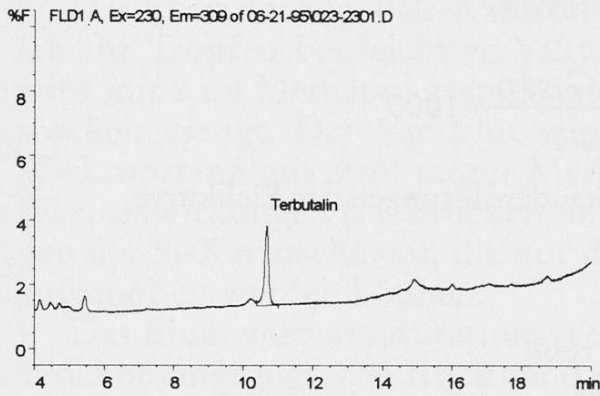


Abb. 3. Undotierte Urinprobe

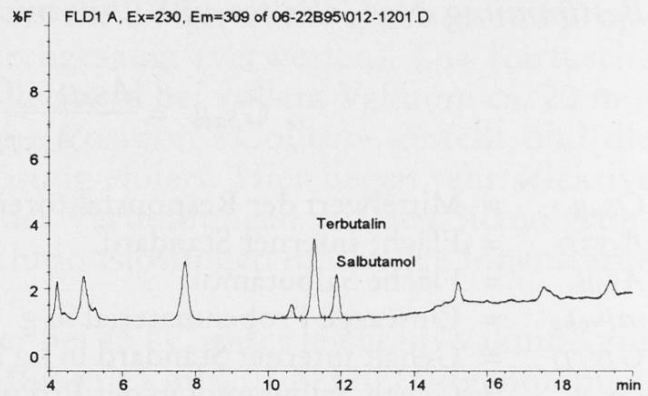


Abb. 4. Urinprobe dotiert mit 20 ppb Salbutamol

Resultate

Mit dieser Methode lassen sich Serien von 10 bis 20 Proben am Tag aufarbeiten und bestimmen. Die empfindliche und selektive Fluoreszenzdetektion ermöglicht eine niedrige Bestimmungs- und Detektionsgrenze. Ein wesentlicher Vorteil der Methode liegt in der Verwendung eines internen Standards für die Quantifizierung.

Zusammenfassung

Es wird eine schnelle flüssigchromatographische Rückstandsmethode zum Nachweis von Salbutamol im Kälberurin beschrieben. Für die Reinigung und Aufkonzentrierung wurde die Festphasenextraktion über C₁₈- und Si-Kartuschen gewählt. Die Quantifizierung des Salbutamols erfolgt über einen internen Standard.

Résumé

Cette méthode décrit la détection de salbutamol dans l'urine de veau. Pour purification et concentration on a utilisé des cartouches C₁₈-SPE et de silicagel. La quantification se fait par la méthode du standard intérieur.

Summary

This liquid-chromatographic method describes a rapid detection of the residues of salbutamole in the urine of calves. For purification and concentration a C₁₈- and Si-cartridge have been chosen. The internal standard method has been used for the quantification of salbutamol.

Literatur

1. *Layer, H. und Friedrich, A.*: Nachweis von Salbutamol im Urin von Kälbern. *Fleischwirtschaft* **12**, 1846–1848 (1989).
2. *Edelhäuser, M. und Scherbaum, E.*: Bestimmung analbol wirksamer β -Agonisten mit GC-MS-EI. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **2**, 37–40 (1991).
3. *Miller, L.G. and Greenblatt, D.J.J.*: Determination of salbutamol in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **54**, 205–208 (1986).
4. *Meyer, H.H.D., Rinke, L.J. and Duersch, I.*: Residue screening for the beta, agonists clenbuterol, salbutamol and cimaterol in urine using enzyme immunoassay and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **102**, 551–556 (1991).
5. *Bland, R.E., Tanner R.J.N., Chern, W.H., Lang, J.R. and Powell, J. R.*: Determination of salbutamol concentrations in human plasma using solidphase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**, 591–596 (1990).
6. *Van Horne, K.C.*: Handbuch zur Festphasenextraktion **1**, 90–93 und 107–109 ICT, Frankfurt 1993.
7. *Fürst, P., Fürdt, Ch. and Grobel, W.*: Evidence of the illegal application of salbutamol in stock-breeding. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **85**, 341–344 (1989).
8. *Hutchings, M.J., Paull, J.D. and Morgan, D.J.*: Determination of salbutamol in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **28**, 423–426 (1983).

Heinz Laska
Interlabor Belp AG
Abteilung HPLC
Birkenweg 6
CH-3123 Belp