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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 86 (1995)

Heft: 5

Artikel: 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: Laska, Heinz / Berger, Michael / Camenzind, Rudolf

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-983644

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: 11.12.2025

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

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **86**, 526–533 (1995)
Eingegangen 6. Juli 1995. Angenommen 13. Juli 1995

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

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).

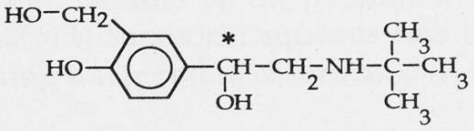

Abb. 1. Salbutamol

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 C_{18}-Kartusche angereichert. Die Wirkstoffe werden eluiert und über einer Si-Kartusche gereinigt. Das Eluat wird eingeengt 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 C_{18}-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 µg/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 µg/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 µg/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 µg/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 C_{18}-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 eingeengt. 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:

Zeit in Minuten	*% B*	*% A*
0,01	2	98
3,00	2	98
10,00	20	80
12,00	25	75
15,00	25	75

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 µg/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)	Standard-abweichung (ppb)	Relative Standard-abweichung (%)	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.

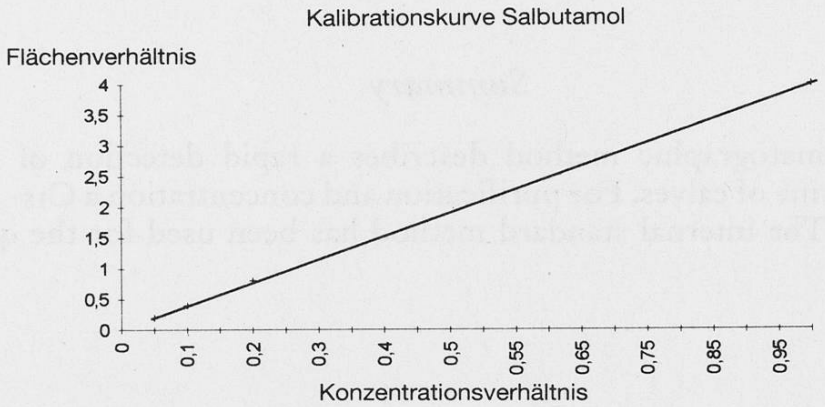

Abb. 2. Kalibrierung von Salbutamol zur Auswertung über den internen Standard

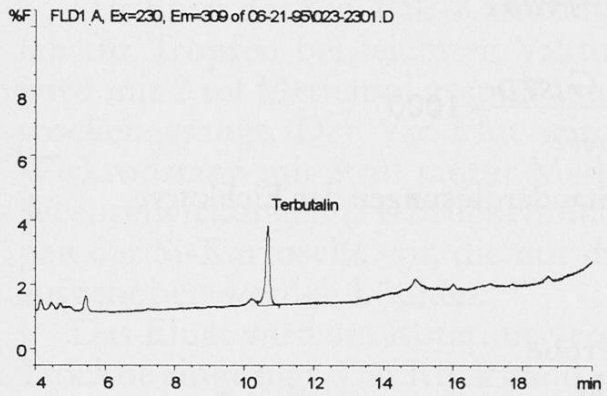

Abb. 3. Undotierte Urinprobe

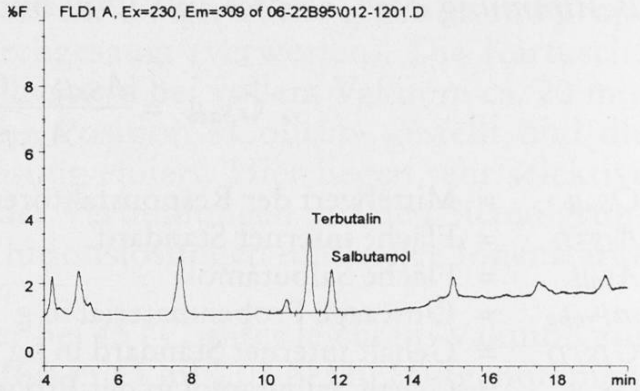

Abb. 4. Urinprobe dotiert mit 20 ppb Salbutamol

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 C_{18}- 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 C_{18}-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 C_{18}- and Si-cartridge have been choosen. 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 b-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, slabutamol 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-breending. 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