

Project 505.0623

Ontwikkeling methoden van onderzoek voor het aantonen en bepalen van β -agonisten

Projectleider drs. R. Schilt

Rapport 90.53 December 1990

Beta-agonisten:

stand van zaken en prognoses.

drs. R. Schilt en W. Haasnoot

Afdeling Biofarmaceutische Analyse

Goedgekeurd door: dr. F.A. Huf

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.

Uit deze uitgave mag niets worden gereproduceerd en/of openbaar gemaakt door middel van fotocopie, microfilm, foto-offset of welk ander medium dan ook, zonder schriftelijke toestemming van de directeur.

VERZENDLIJST

INTERN:

Directeur (ir. G.S. Roosje)

Sectorhoofden (dr. F.A. Huf)

Projectleider (drs. R. Schilt)

Afdeling Biofarmaceutische Analyse (W. Haasnoot, H. Hooijerink, A.R.M. Hamers)

Afdeling Organische Contaminanten (ir. L.G.M.Th. Tuinstra)

Programmabeheer en informatieverzorging (N.J.G. Broex; 2 x)

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek (ir. M. Heuver)

Directie Wetenschap en Technologie (Prof. dr. K. Verhoeff)

Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden (Mr. P. Ritsema en H.J. Mol)

Directie Veterinaire Dienst (drs. C.C.J.M. van der Meijs)

Directie Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees (drs. H.J. Tankink)

Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees - Centraal Laboratorium (L.M.H. Frijs)

Algemene Inspectiedienst (A.T. Hoekstra)

SAMENVATTING

Op dit moment zijn de β -agonisten clenbuterol, mabuterol, salbutamol, cimaterol en terbutaline zowel met een multi-screeningsmethode als met een multi-bevestigingsmethode te bepalen. Op korte termijn is te verwachten dat de β -agonisten bamethaan, orciprenaline (= metaproterenol) en isoproterenol aan de methoden kunnen worden toegevoegd.

Omdat begin 1991 het RIKILT Standaard Voorschrift (RSV A0622) voor de multi-bevestigingsmethode voor afstemming aan het RIVM wordt voorgelegd, kan de keuring door de RVV worden uitgebreid van clenbuterol en salbutamol tot het bovengenoemd vijftal, zonder bevestigingsonderzoek van het RIKILT. Te verwachten is dat binnen enkele maanden de keuring kan worden uitgebreid naar een achttal β -agonisten. Het maximaal haalbare aantal β -agonisten welke met behulp van de beide multi-methoden kan worden bepaald zal rond de tien β -agonisten liggen. Voor een verdere uitbreiding van het aantal te bepalen β -agonisten zullen nieuwe antilichamen moeten worden opgewekt. Daarnaast moet voor het onderzoek op langere termijn aandacht besteed worden aan de isolatie van een biomolecuul (i.c. de β -receptor), welke affiniteit heeft voor het farmacologisch actieve molecuulfragment dat in alle agonisten voorkomt.

Naast het analytisch ontwikkelingswerk is ten behoeve van onder andere surveys en keuringen dierexperimenteel onderzoek uitgevoerd en zijn/worden door de AID genomen monsters urine en veevoerders geanalyseerd waarbij regelmatig sprake is van positieve bevindingen welke duiden op misbruik in de praktijk.

()

()

Inhoudsopgave

SAMENVATTING	1
1 INLEIDING	5
2 HUIDIGE STAND VAN ZAKEN	5
2.1 Methodenontwikkeling	5
2.1.1 Multi-screeningsmethode	5
2.1.2 Multi-bevestigingsmethode	6
2.1.3 Overige methoden	7
2.2 Keuring	8
2.3 Dierexperimenten	9
3 TOEKOMSTIG ONDERZOEK	9
3.1 Methodenontwikkeling	9
3.2 Keuring	11
3.3 Surveys/dierexperimenten	11
4 CONCLUSIE	12
LITERATUUR	

x

()

()

1 INLEIDING

Hoewel binnen Nederland voor de humane CARA-therapie voornamelijk de β -agonisten salbutamol (Ventolin), terbutaline (Bricanyl) en fenoterol (Berotec) worden gebruikt en voor veterinaire toepassing (rund en paard) alleen clenbuterol is geregistreerd, is de mogelijke toepassing van andere β -agonisten dan clenbuterol niet uit te sluiten. Onderzoek binnen het RIKILT heeft aangetoond dat in de rundveehouderij in ieder geval de volgende vier β -agonisten worden gebruikt: clenbuterol, cimaterol, salbutamol en mabuterol. Tevens zijn er indicaties dat fenoterol en etilefrine illegaal toegepast worden bij de veehouderij. Het aantal stoffen met β -agonistische werking is echter veel groter. Er worden door J. von Keck e.a. (1972) alleen al 150 clenbuterolvarianten beschreven en voor humane toepassing is een twintigtal van dit soort stoffen geregistreerd (RIKILT rapport 89.47).

Om een adequate controle op een mogelijk illegaal gebruik van dit soort stoffen te kunnen uitvoeren zijn multi-analysemethoden noodzakelijk. In een eerder uitgevoerd literatuuronderzoek werd geconcludeerd dat deze multi-methoden niet beschikbaar zijn (RIKILT rapport 89.47). Om die reden wordt door het RIKILT sinds 1989 onderzoek uitgevoerd naar de ontwikkeling van dergelijke analysemethoden welke eventueel toepasbaar moeten zijn bij de invoering van tweetraps keuringssystemen. Bij dit soort keuringssystemen wordt het voor onderzoek aangeboden monstermateriaal eerst geanalyseerd met een snelle screeningsmethode, waarbij een (klein) percentage vals positieve resultaten acceptabel is. Vervolgens worden de verdachte monsters opnieuw geanalyseerd met een bevestigingsmethode waarbij vals positieve uitslagen niet mogen voorkomen. Dergelijke tweetraps keuringssystemen zijn noodzakelijk om bij gelijkblijvende of lagere keuringskosten een grotere effectiviteit te behalen.

Dit interim rapport beschrijft de huidige stand van zaken en de perspectieven van het op korte en lange termijn uit te voeren onderzoek.

2 HUIDIGE STAND VAN ZAKEN

2.1 Methodenontwikkeling

2.1.1 Multi-screeningsmethode

Sinds november 1990 is een multi-screeningsmethode voor β -agonisten in urinemonsters beschikbaar (RIKILT rapport 90.51). Deze methode is gebaseerd op een enzym-immunologische test (EIA). Hierbij worden (polyclonale) antilichamen gebruikt voor de herkenning van clenbuterol en kruisreagerende verbindingen (metabolieten en andere β -agonisten). Door gebruik te maken van een monstervoorbewerking op basis van immuno-affiniteitschromatografie (IAC), waarbij dezelfde antilichamen worden gebruikt als bij de EIA, wordt voor de β -agonisten **clenbuterol en mabuterol**

in urine een detectiegrens verkregen van ca. 0,1 ng/ml. Andere β -agonisten, zoals: **salbutamol, tulobuterol, terbutaline, cimaterol en carbuterol**, waarvoor de antilichamen een lagere kruisreactiviteit vertonen, kunnen met behulp van deze screeningstest worden gemeten vanaf het 2 ng/ml niveau. Bovenstaande waarden voor de detectiegrenzen zijn gebaseerd op standaardadditie-metingen. Gebleken is dat de test in de urine van behandelde dieren, vermoedelijk door de aanwezigheid van kruisreagerende metabolieten, op een lager niveau tot positieve resultaten leidt. In de periode november - december 1990 is deze test getoetst aan de bevestigingsmethode (GC-MS (zie 2.1.2)). Hierbij zijn ca. 230 urinemonsters onderzocht. Uit een nog uit te voeren evaluatie van de resultaten moet blijken in welke mate de screeningsmethode vals positieve en vals negatieve resultaten oplevert. Bovendien moet hieruit blijken of de test kan worden uitgevoerd zonder voorbereiding van de urinemonsters. In het laatste geval is de test geschikt voor het analyseren van grote aantallen monsters (tot ca. 100 monsters per analist per dag). De rapportage omtrent dit vergelijkend onderzoek volgt in januari 1991.

2.1.2 Multi-bevestigingsmethode

Bij de op GC-MS gebaseerde multi-bevestigingsmethode wordt gebruik gemaakt van immuno-affiniteitschromatografie (gebruik makend van dezelfde antilichamen als bij de screeningsmethode; zie 2.1.1) in combinatie met Solid Phase Extractie (SPE) als monstervoorbereiding. Sinds mei 1990 wordt deze methode door het CLRVV toegepast voor de analyse van urinemonsters in het kader van de keuring en ten behoeve van het Nationaal Plan Overige Stoffen. Hierbij wordt gekeken naar de β -agonisten clenbuterol, cimaterol, salbutamol en terbutaline en sinds september 1990 ook naar mabuterol.

Door het RIKILT wordt deze methode toegepast voor de analyse van urine- en veevoedermonsters in het kader van de opsporing door de Algemene Inspectie Dienst (AID) (zie 2.2).

Voor de β -agonisten clenbuterol en salbutamol zijn voor de GC-MS geschikte interne standaarden (gedeuteerde verbindingen) gesynthetiseerd (project in samenwerking met de LUW) waardoor de methode geschikt is voor een kwantitatieve analyse. Voor de overige β -agonisten betreft het een kwalitatieve methode.

Voor een eventuele uitbreiding van het met deze methode te analyseren aantal β -agonisten zijn een viertal stappen essentieel:

- 1 de bij de IAC-kolom gebruikte antilichamen moeten voor de component enige mate van kruisreactiviteit vertonen,
- 2 op de SPE-kolom moet de component voldoende retentie vertonen,
- 3 de component moet tot een vluchtige verbinding kunnen worden gederiviseerd (met de nu gebruikte derivatiseringsprocedure),

- 4 karakteristieke massafragmenten moeten worden gedefinieerd (zowel met electron impact als in chemische ionisatie).

Onderzoek naar de mogelijke inpassing van de hierna weergegeven β -agonisten is/wordt uitgevoerd:

- bamethaan
- orciprenaline (metaproterenol)
- isoproterenol
- carbuterol
- tulobuterol
- pirbuterol

Alleen van de eerste drie β -agonisten zijn momenteel voldoende gegevens bekend om aan te nemen dat zij aan de lijst van analyseerbare stoffen kunnen worden toegevoegd. Een validatieprocedure dient nog te worden uitgevoerd.

Alvorens voor de laatste drie β -agonisten een validatieprocedure te kunnen opstarten moeten nog de karakteristieke massafragmenten worden vastgesteld (in overleg met het RIVM).

Het ziet er naar uit dat de huidige methode niet geschikt is voor de analyse van fenoterol, ractopamine (referentiestandaard ontbreekt), isoxuprine, tetroquinol, L640,033, L644,969 en metaraminol.

Een concept RIKILT Standaard Voorschrift (RSV A0622) zal eind 1990 gereed zijn. Gezien de gezamenlijke verantwoordelijkheid van LNV en WVC moet met het RIVM overeenstemming worden verkregen over met name de identificatiecriteria.

2.1.3 Overige methoden

Naast de hiervoor beschreven multi-screenings- en -bevestigingsmethode is tevens een methode ontwikkeld voor de directe bepaling van clenbuterol in urinemonsters (Haasnoot e.a. 1990). Hierbij wordt een immuno-affiniteitskolom "on-line" gekoppeld aan een HPLC-systeem. Met deze methode kunnen urinemonsters worden onderzocht zonder enige monstervoorbewerking te hoeven toepassen. De methode is in een later stadium ook geschikt bevonden voor de analyse van mabuterol. Deze methode wordt, ter ontlasting van de GC-MS faciliteiten van het RIKILT, onder andere gebruikt voor inventariserend onderzoek en in sommige gevallen (niet voor keuringsdoeleinden) als bevestigingsmethode voor resultaten verkregen met de screeningsmethode (EIA).

De onder 2.1.1 beschreven screeningsmethode is toegepast voor de analyse van organen van kuikens welke behandeld waren met clenbuterol (zie 2.3). Hiervoor werd een

monstervoorbewerkingsprocedure (met behulp van IAC) aan de test toegevoegd. Deze test is tevens toegepast voor de analyse van door het CLRVV aangeboden verdachte runderlevermonsters. Voor de bevestiging van clenbuterol in lever werd een concept protocol aan het CLRVV overgedragen.

Voorts is een inleidend onderzoek uitgevoerd naar de mogelijkheid om de screeningstest (EIA) zo uit te voeren dat deze buiten het laboratorium kan worden toegepast (strip-test; Ploum e.a. 1991). Uit dit onderzoek is gebleken dat het principe van zo'n test-strip werkt echter er dient nog gezocht te worden naar een meer handzame vorm.

2.2 Keuring

Keuring van monstermateriaal op de aanwezigheid van β -agonisten wordt in Nederland uitgevoerd binnen het CLRVV en het RIKILT. Tot nu toe gebruiken beide laboratoria alleen de onder 2.1.2 beschreven multi-bevestigingsmethode. Door het CLRVV worden urinemonsters onderzocht welke zijn genomen in het kader van het Nationaal Programma Overige Stoffen en in verdachte situaties aangetroffen in de slachtfase. Een overzicht van de bevindingen wordt door de RVV gerapporteerd. Het RIKILT analyseert monstermateriaal in het kader van opsporing door de AID. Hierbij worden zowel diervoeders en premixen als urinemonsters aangeboden voor onderzoek.

Tot nu toe werden in 1990 in totaal 140 diervoeders (+ premixen) aangeboden. Hierbij werden 21 monsters positief bevonden waarvan 6 voor de aanwezigheid van clenbuterol en 15 voor salbutamol. Clenbuterol werd aangetoond in monstermateriaal met de volgende omschrijvingen: gemengd stiervoeder, meststierbrok, mestbrok voor rundvee, veevoer/mais (2x) en kuilvoer (snijmais). Salbutamol werd aangetoond in kalvermest (gier, 2x) en in electrolytenmengsels (13x).

In 1990 stuurde de AID 137 urinemonsters in voor onderzoek naar de aanwezigheid van β -agonisten. Daarnaast zijn een nog nader te bepalen aantal urinemonsters aangeboden voor onderzoek op hormonen waarin achteraf alsnog verzocht werd deze te onderzoeken op de aanwezigheid van β -agonisten.

Tot begin december 1990 werden in totaal 17 urinemonsters (waarvan 14 afkomstig van vrouwelijke runderen, 2 van mannelijke runderen en 1 onbekende) positief bevonden voor clenbuterol. Salbutamol werd niet aangetoond en een drietal monsters werd verdacht bevonden voor mabuterol (voldeden niet aan de EG criteria).

Van een zestigtal in november/december ontvangen monsters zijn de definitieve resultaten nog niet aan de AID doorgegeven.

Naast deze AID-monsters zijn vijf urinemonsters verkregen van het CLRVV voor de bevestiging van de aanwezigheid van salbutamol. In deze monsters werd salbutamol aangetoond in concentraties variërend van 3 tot 115 ng/ml.

2.3 Dierexperimenten

Tot nu is monstermateriaal uit een drietal dierexperimenten onderzocht om inzicht te verkrijgen in het uitscheidingspatroon van β -agonisten.

- De resultaten verkregen met urinemonsters uit een onderzoek waarbij aan mannelijke kalveren clenbuterol was toegediend staan vermeld in RIKILT rapport 89.47.
- De resultaten verkregen met urinemonsters uit een onderzoek waarbij aan kalveren salbutamol was toegediend staan vermeld in RIKILT rapport 90.51. Dit monstermateriaal werd onderzocht met behulp van de screeningsmethode (zie 2.1.1) en hierbij werden hoge gehalten aan salbutamol (tot ca. 500 ng/ml) gevonden.
- In samenwerking met het COVP werd een proef uitgevoerd waarbij aan kuikens (n=20) gedurende vijf dagen clenbuterol houdend voeder (1 mg/kg) werd toegediend. De helft van de kuikens werd direct daaropvolgend gedood en aan de andere helft van de kuikens werd gedurende 1 dag blanco voeder verstrekt en vervolgens gedood. Van de kuikens werden monsters vlees, lever, nier, maaginhoud en darminhoud genomen. Dit monstermateriaal werd geanalyseerd met de screeningsmethode in combinatie met een IAC-opzuivering. Uit deze proef werd geconcludeerd dat voor een eventuele controle op het gebruik van clenbuterol lever de meest geschikte matrix is omdat clenbuterol hieruit het minst snel verdwijnt.
De volledige resultaten van deze proef worden gerapporteerd in januari 1991

3. TOEKOMSTIG ONDERZOEK

3.1 Methodenontwikkeling

A. Op korte termijn (ca. 1 maand):

- het concept-RSV voor de multi-bevestigingsmethode (5-tal β -agonisten) moet worden afgerond. Over de te hanteren GC-MS criteria moet worden overgelegd met het RIVM.
- afronden van een tweetal RIKILT-rapporten:
 - vergelijkend onderzoek tussen de screenings- en bevestigingsmethode,
 - ontwikkeling screeningsmethode in weefsel en de resultaten van de "kippenproef".

B. Op middellange termijn (ca. 3 maanden):

- valideren van het concept-RSV voor de multi-bevestigingsmethode in samenwerking met het CLRVV,

- onderzoek naar het mogelijk uitbreiden van de multi-bevestigingsmethode met de β -agonisten bamethaan, orciprenaline, isoproterenol, carbuterol, tulobuterol en pirbuterol,
- automatiseren van de bij de multi-bevestigingsmethode gebruikte monstervoorbewerking met behulp van de ASPEC,
- het opstellen van een concept-RSV van de multi-screeningsmethode voor β -agonisten in urinemonsters.

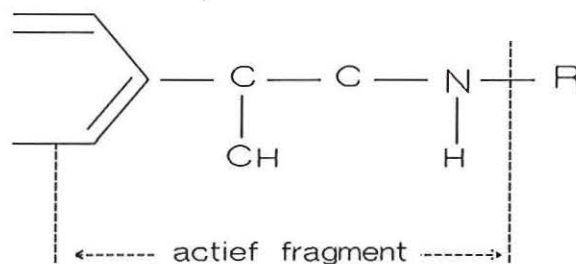
C. Op langere termijn (1 tot 2 jaar):

- Het onderzoek op korte en middellange termijn is gericht op de in de humane therapie bruikbare β -agonisten. De methodeontwikkeling voor zowel de screenings- als de bevestigingsmethode is o.a. gebaseerd op het gebruik van antilichamen die eigenlijk voor 1 stof (clenbuterol) worden opgewekt maar door kruisreactiviteit met andere stoffen toch voor een groepje β -agonisten bruikbaar zijn.

Voor eerder genoemde stoffen als fenoterol, ractopamine (referentiestandaard ontbreekt), isoxuprine, tetroquinol, L640,033, L644,969 en metaraminol vertonen de anti-clenbuterol antilichamen geen affiniteit zodat nieuwe antilichamen nodig zijn om ook die β -agonisten te kunnen aantonen volgens de huidige werkwijze. De noodzaak hiervan wordt onderstreept door de bevindingen in België waar de laatste tijd regelmatig fenoterol wordt aangetoond.

In RIKILT-rapport 90.51 wordt voorgesteld om antilichamen op te wekken tegen norepinefrine en octopamine. Deze antilichamen vertonen mogelijkwerwijs affiniteit voor een groot deel van de hiervoor genoemde stoffen en op deze wijze zou op redelijk korte termijn het aantal te bepalen β -agonisten fors kunnen worden uitgebreid.

- Bovenstaande onderzoekstrategie voortzetten voor alle mogelijke β -agonisten is een heilloze weg (de lijst van 150 stoffen is eenvoudig verder uit te breiden). In plaats van een individuele stofgerichte benadering kan het onderzoek gericht worden op het farmacologisch actieve molecuulfragment dat in alle β -agonisten voorkomt.



Op grond van deze structuur-activiteitsrelatie moet met β -receptoren in plaats van antilichamen worden gewerkt. Het onderzoek zal zich richten op de isolatie van de β -receptor en immobilisatie hiervan of affiene fragmenten hiervan op een kolom om een multimethode voor alle β -agonisten mogelijk te maken.

Een groot probleem bij een dergelijke veel omvattende multi-methode wordt de detectie. Er moet onderzoek worden gedaan naar derivatiseringen en ionisatietechnieken om in bijvoorbeeld één uur in ieder geval een indicatie, bij voorkeur echter ook confirmatie, te verrichten op de aanwezigheid van een β -agonist.

In overleg met VKA heeft dit laatst genoemde onderwerp binnen de beschreven aanpak voor alsnog de laagste prioriteit gekregen.

3.2 Keuring

- Op korte termijn moet in samenwerking met het RIVM een borgingsprogramma worden opgezet.
- Op middellange termijn moet bekeken worden in hoeverre de multi-screeningsmethode (EIA) aan het RVV kan worden overgedragen waarna eventueel het voorgestelde tweetraps keuringsstelsel kan worden ingesteld.
- Op middellange termijn moet de keuring worden uitgebreid tot een achttal β -agonisten en op wat langere termijn naar zo mogelijk ca. tien. Een verdere uitbreiding (op langere termijn) van het aantal analyseerbare β -agonisten is onder meer afhankelijk van de te verkrijgen antilichamen.
- Naast een nationale afstemming van de analysemethoden en criteria is de internationale harmonisatie in de Beneluxwerkgroep en binnen de EEG (BCR), van groot belang.

3.3 Surveys/dierexperimenten

- Door gebruik te maken van de screeningsmethode kan op relatief snelle wijze een inventariserend onderzoek worden uitgevoerd naar het gebruik van β -agonisten in bijvoorbeeld de pluimveehouderij of bij speciale doelgroepen zoals mannelijke runderen of afgemolken koeien of dikbillen.
- Het uitvoeren van dierexperimenten is van belang ter verkrijging van controle/referentiematerialen en om na te kunnen gaan welke residuen in welke matrices voorkomen (ter ondersteuning van de keuring).

4. CONCLUSIE

Hoewel nu vijf en op korte termijn mogelijk acht β -agonisten zijn te bepalen met de multi GC-MS methode, blijven nog veel β -agonisten buiten het keuringssysteem. Zo wordt in België de laatste tijd regelmatig fenoterol aangetroffen en met de huidige multi-methoden kan deze stof niet geanalyseerd worden. Onderzoek naar de mogelijke uitbreiding van de multi-methoden blijft daarom noodzakelijk. Hiervoor zijn met name standaarden, antilichamen en mankracht nodig en op relatief korte termijn nieuwe strategieën.

Binnen de huidige mogelijkheden biedt de introductie van de multi-screeningsmethode de mogelijkheid om op middellange termijn een tweetraps keuringssysteem in te voeren, waarbij een groter aantal monsters in de keuring kan worden opgenomen. Deze screeningsmethode kan ook worden ingezet om surveys uit te voeren om signalen uit de praktijk, zoals de mogelijke "veelvuldige" toepassing van β -agonisten bij afgemolken koeien, dikbillen, stieren of pluimvee, te kunnen toetsen.

LITERATUUR

- Van Ginkel L.A., Stephany R.W. en Van Rossum H.J., Mabuterool identified as an illegally used beta-agonistic growth promotor for slaughter animals, RIVM rapport 388701 009, juni 1990.
- Haasnoot W, Ploum M.E, Paulussen R.J.A, Schilt R en Huf F.A, Rapid determination of clenbuterol residues in urine by high-performance liquid chromatography with on-line automated sample processing using immunoaffinity chromatography, J. Chrom. 519 (1990) 323.
- Ploum M.E, Haasnoot W, Paulussen R.J.A, van Bruchem G.D, Hamers A.R.M, Schilt R en Huf F.A, Test-strip enzyme immunoassays and the fast screening of nortestosterone and clenbuterol residues in urine samples at the parts per billion level, geaccepteerd voor publicatie in J. Chrom. (mei) 1991.
- Schilt R, Farmacologie en analysemethoden voor de residu-bepaling van beta(2)-agonisten, RIKILT rapport 89.47, september 1989.
- Hooijerink H, Schilt R, Haasnoot W en Courtheijn D, Determination of clenbuterol in urine of calves by HPLC with sequential ultraviolet and electrochemical detection, aangeboden voor publicatie in J. Pharm. An. (1991).
- W. Haasnoot, G.D. van Bruchem, A.R.M. Hamers en drs R.Schilt, De ontwikkeling van een multi-screeningsmethode voor β -agonisten in urine, RIKILT rapport 90.51, december 1990.
- J. Von Keck, G. Krüger, K. Noll en H. Machleidt, Synthesen von neuen amino-halogen-substituierten phenyl-aminoäthanolen, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 22 (1972) 861.