

Project 505.0623

Ontwikkelen van (residu)methoden voor beta-agonisten

Projektleider: drs R. Schilt

Rapport 89.47

6 September 1989

Farmacologie en analysemethoden voor  
de residu-bepaling van beta(2)-agonisten

drs R. Schilt

Afdeling Biofarmaceutische Analyse (BFA)

Goedgekeurd door: dr F.A. Huf

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Telefoon 08370-19110  
Telex 75180 RIKIL  
Telefax 08370-17717

Copyright 1989, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding

#### VERZENDLIJST

##### INTERN:

Directeur  
Hoofden hoofdafdelingen  
Produktcoördinator dierlijke produkten  
Programmabeheer en informatieverzorging  
Afdeling Biofarmaceutische Analyse (10x)  
Afdeling Diergeneesmiddelen  
Afdeling Organische Contaminanten  
Afdeling Toxicologie  
Circulatie  
Bibliotheek

##### EXTERN:

Dienst landbouwkundig onderzoek  
Directie voedings- en kwaliteitsaangelegenheden  
Directie veterinaire dienst  
Directie veehouderij en zuivel  
Directie juridische en bedrijfsorganisatorische zaken  
Directie voorlichting en externe betrekkingen  
Directie rijksdienst voor de keuring van vee en vlees  
Directie algemene inspectiedienst  
Directie centrum voor onderzoek en voorlichting voor de pluimveehouderij "Spelderholt"  
Directie instituut voor veevoedingsonderzoek  
Directie instituut voor veeteeltkundig onderzoek "Schoonoord"  
Directie centraal diergeneeskundig instituut  
Bureau registratie diergeneesmiddelen  
Veterinaire hoofdinspectie  
Directie rijksinstituut voor volksgezondheid en milieuhygiëne  
Benelux Economische Unie, Werkgroep SP/Lab/h Hormonen en Anti-hormonen  
Overleggroep residuanalyse  
Veevoederoverleg orgaan  
Agralin

ABSTRACT

Farmacologie en analysemethoden voor de residu-bepaling van beta(2)-agonisten

Pharmacology and methods for residue analysis for beta(2)-agonistic drugs

Report 89.47

September 6, 1989

drs R. Schilt

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)  
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

10 figures, 9 tables, 3 annexes, 85 references

In this report the results of a survey of literature concerning methods of analysis for beta(2)-agonistic drugs in biological matrices of human and veterinary origin is given. No multi-methods capable of detecting more than 4 beta(2)-agonistic drugs, fulfilling EC quality criteria 87/410, were found. Possibilities for the development of screening- and confirmation methods are given.

Based on for example human farmaco-therapy predictions are made on metabolism, farmacokinetics and residue levels in cattle.

Keywords: beta-agonistic drugs, analysis, determination, cattle, metabolism, farmacokinetics, residue

## Inhoudsopgave

Samenvatting . . . . .	3
1. Inleiding . . . . .	5
2. Farmacologie . . . . .	5
2.1 Inleiding . . . . .	5
2.2 Beta(2)-agonisten . . . . .	6
2.3 Gebruik . . . . .	7
2.4 Overige (humane) geneesmiddelen met een beta-agonistische werking . . . . .	7
2.5 Farmacokinetiek en metabolisme . . . . .	8
2.5.1 Clenbuterol . . . . .	8
2.5.2 Cimaterol . . . . .	11
2.5.3 Carbuterol . . . . .	11
2.5.4 Fenoterol . . . . .	12
2.5.5 Pirbuterol . . . . .	12
2.5.6 Salbutamol . . . . .	13
2.5.7 Terbutaline . . . . .	13
2.6 Conclusie en discussie . . . . .	14
3. Analytiek . . . . .	17
3.1 Inleiding . . . . .	17
3.2 Gaschromatografie-massaspectrometrie . . . . .	17
3.2.1 <u>Groep I</u> . . . . .	19
3.2.1.1 Clenbuterol . . . . .	19
3.2.1.2 Cimaterol . . . . .	21
3.2.2 <u>Groep II</u> . . . . .	21
3.2.2.1 Terbutaline . . . . .	21
3.2.2.2 Salbutamol . . . . .	24
3.2.2.3 Fenoterol . . . . .	25
3.2.2.4 Pirbuterol . . . . .	26
3.2.2.5 Carbuterol . . . . .	27
3.3 Vloeistofchromatografie . . . . .	27
3.3.1 <u>Groep I</u> . . . . .	27
3.3.1.1 Clenbuterol . . . . .	27
3.3.1.2 Cimaterol . . . . .	28
3.3.2 <u>Groep II</u> . . . . .	28
3.3.2.1 Salbutamol, Terbutaline, Fenoterol . . . . .	28
3.4 Overige technieken . . . . .	28
3.5 Conclusie en discussie . . . . .	29
4. Generale conclusie en discussie . . . . .	30
5. Aanbevelingen . . . . .	30
Bijlage I . . . . .	32
Bijlage II. . . . .	34
Bijlage III. Lijst van gebruikte afkortingen . . . . .	36
Literatuur . . . . .	37



## Samenvatting

In de humane CARA-therapie worden allerlei beta(2)-agonisten gebruikt. Deze groep van verbindingen kan ook worden gebruikt als "herverdeler" bij het dier.

Voor de bepaling van beta-agonisten in materialen van voornamelijk humane oorsprong is in de literatuur een aantal methoden beschreven. Naast vloeistofchromatografische (HPLC), dunnelaag (TLC) en immunochemische methoden betreft het voor een belangrijk deel gaschromatografie-massaspectrometrische (GC-MS) methoden voor onderzoek van met name humane bloed- en urinemonsters.

Met geen der methoden is het mogelijk de beta(2)-agonisten, clenbuterol, cimaterol, salbutamol, terbutaline, fenoterol, carbuterol, pirbuterol, etc. in één analysegang aan te tonen. Uitgaande van een gerichte vraag of een bepaalde beta(2)-agonist, bijvoorbeeld salbutamol, aan een dier is toegediend, zijn in de literatuur methoden gevonden met een gevoeligheid van ca 1  $\mu\text{g}/\text{l}$  (ppb) in humaan bloedplasma en urine. In hoeverre deze methoden direct toepasbaar zijn voor onderzoek van monsters van dierlijke oorsprong is niet direct voorspelbaar.

Doordat in principe een ruime verscheidenheid aan verbindingen met een beta(2)-agonistische werking kan worden toegepast, moet worden gestreefd naar een screeningsmethode waarmee een zo breed mogelijk spectrum kan worden opgespoord. Aangezien de variëteit in de chemische structuur binnen de groep van de beta(2)-agonisten relatief groot is (functionele groepen, zuur-base eigenschappen, polariteit) is het niet eenvoudig één multi-extractieprocedure voor het brede scala aan beta(2)-agonisten te ontwikkelen t.b.v. de residu-analyse (met gehalten van 1 tot 10  $\mu\text{g}/\text{l}$  of kg). De gemeenschappelijke basisstructuur geeft wel de mogelijkheid tot een groepspecifieke massaspectrometrische detectie. Als monstervoorbewerking moet dan een niet te selectieve extractie worden toegepast. Voor gericht onderzoek of bevestigingsonderzoek kan wel een meer specifieke monsteropzuivering worden toegepast.

Met betrekking tot de GC-MS bevestiging is het in veel gevallen noodzakelijk dat, om bij de gewenste concentratierange aan de EEG criteria (87/410) te kunnen voldoen, een aantal GC-MS analyses wordt gecombineerd (verschillende ionisatietechnieken en/of verschillende derivatiseringstechnieken).

Naast de genoemde, meer "traditionele", analysemethoden is het zinvol onderzoek uit te voeren naar de bruikbaarheid van screeningsmethoden, zoals immunochemische methoden, omdat het aantal te bemonsteren dieren groot is en een voorselectie gewenst is teneinde de analysekosten begrenst te houden.

Over de residu-analytische aspecten van het gebruik van beta(2)-agonisten bij mestdieren, zoals uitscheidingssnelheid, metabolisme en gehalten in de verschillende matrices, zijn weinig gegevens bekend. Uitgaande van o.a. uit de humane farmacotherapie verkregen gegevens is m.b.t. deze aspecten een aantal voorspellingen gemaakt. De benodigde informatie moet worden verkregen m.b.v. dierexperimenteel onderzoek, waardoor tegelijkertijd kwaliteitscontrolemonsters beschikbaar komen.

## 1. Inleiding

In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de in de literatuur beschreven analysemethoden voor een aantal beta(2)-agonisten. In het overzicht is de nadruk, op grond van informatie uit het beleid, gelegd op analysemethoden voor de beta-agonisten clenbuterol, cimaterol, salbutamol, terbutaline, fenoterol, carbuterol en pirbuterol in biologisch materiaal, bloedplasma of serum, urine en (eetbare) weefsels. Uitgaande van zowel een gerichte (is een bepaalde stof toegediend) als een brede vraagstelling (zijn er beta-agonisten toegepast) is een inventarisatie gemaakt van methoden die zijn toegespitst op één beta(2)-agonist en multi-methoden die bruikbaar zijn voor de analyse van een aantal beta(2)-agonisten.

Vanwege de achtergrond van het onderzoek naar de aanwezigheid van beta-agonisten in biologisch materiaal, de opsporing door de AID (en/of RVV) en een eventuele vervolging, speelt bevestigingsonderzoek met gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS) een belangrijke rol. Om deze reden is de onderverdeling bij de bespreking van de analytiek gebaseerd op de analysetechnieken.

Naast de analytiek wordt aandacht besteed aan farmacokinetische (uitscheidingsnelheid) en metabole (eventuele metabolieten) aspecten, die van groot belang zijn voor het residu-onderzoek.

## 2. Farmacologie

### 2.1 Inleiding

Clenbuterol, cimaterol, salbutamol, terbutaline, fenoterol, carbuterol en pirbuterol behoren tot de groep van de  $\beta_2$ -selectieve agonisten of mimetica. De werking wordt uitgeoefend door stimulatie van specifieke receptoren, die in het gehele lichaam aanwezig zijn. Normaliter worden deze receptoren gestimuleerd door de hormonen adrenaline en noradrenaline, die door de bijnieren worden gesynthetiseerd en afgegeven, na stimulatie door het sympathisch zenuwstelsel. Doordat het effect via het zelfde mechanisme wordt veroorzaakt als bij adrenaline en noradrenaline het geval is, kunnen de beta(2)-agonisten worden beschouwd als stoffen met een hormonale werking, vergelijkbaar aan de situatie met de synthetische steroidhormonen.

De receptoren kunnen worden onderverdeeld in  $\alpha$ - en  $\beta$ -receptoren, waarvan de laatste groep kan worden onderverdeeld in  $\beta_1$  en  $\beta_2$ . Er kan nog een meer verfijnde indeling worden gemaakt ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  en een complexe  $\alpha$ - $\beta$  regulatie), maar voor het dagelijks gebruik kan worden volstaan met  $\alpha$ ,  $\beta_1$  en  $\beta_2$ .

Na binding van de agonisten aan de receptoren, die zich bevinden op de



celmembraan, vindt een aantal vervolgreacties plaats. Na stimulatie van de  $\beta$ - (en waarschijnlijk ook  $\alpha$ -) receptoren wordt cyclisch-AMP (c-AMP) aangemaakt dat in de cel als een "second messenger" fungeert en door beïnvloeding van het metabolisme in de cel een bepaald effect bewerkstelligt. Na toediening van beta(2)-agonisten is een verhoogde c-AMP concentratie in het bloed gevonden [Van der Vet et al., 1986]. Over de waarde van de c-AMP bepaling als maat voor de effectiviteit van een (humane) therapie met beta(2)-agonisten (in dit geval fenoterol) bestaat nog geen volledige duidelijkheid [Kaukel et al., 1978]. Alhoewel de vorming van c-AMP bij vele lichaamsprocessen een rol speelt, kan de c-AMP concentratie mogelijk toch een indicatie geven over het gebruik van beta-agonistische geneesmiddelen. Naast de aanwezigheid van receptoren in het centrale zenuwstelsel kan de volgende indeling van de receptoren in de verschillende weefsels worden gegeven (tabel 1):

Tabel 1. Locatie en effect van  $\alpha$ ,  $\beta_1$  en  $\beta_2$  receptoren

receptor	effect
$\alpha$	vernaauwing bloedvaten, met name in huid en splanchnicus (darm) gebied stimulatie iris verwijdende spier (midryasis)
$\beta_1$	verhoging frequentie hart vergroting slagvolume en geleidingssnelheid hart verkorting refractaire periode hart toename glycogenolyse en lipolyse
$\beta_2$	ontspanning spieren bronchiën ontspanning uterus spier (baarmoeder)

## 2.2 Beta(2)-agonisten

De genoemde beta-agonisten (clenbuterol, cimaterol, salbutamol, terbutaline, fenoterol, carbuterol en pirbuterol) zijn aan (lichaamseigen) adrenaline en noradrenaline verwante verbindingen, waarbij door chemische modificaties de  $\beta_2$ -werking is versterkt t.o.v. de  $\beta_1$ - en de  $\alpha$ -effecten. De  $\beta_1$ -werking blijft bij de meeste verbindingen aanwezig. Vooral bij hogere doseringen of een frequenter gebruik kunnen bijwerkingen optreden die hierop zijn terug te voeren. Het betreft meestal effecten op het hart (zie tabel 1).

Tevens is de werkingsduur verlengd, door een veranderde, minder snelle metabolisering (mono amino oxidase (MAO) en catechol O-methyl transferase (COMT) zijn niet of nauwelijks in staat deze stoffen te metabo-



liseren) zodat kan worden volstaan met ca. 4 tot 5 doseringen per dag.

Clenbuterol en cimaterol (Groep I, te beschouwen als "primaire aromatische amines") enerzijds en salbutamol, terbutaline, fenoterol, carbuterol en pirbuterol (Groep II, te beschouwen als "fenolen") anderzijds hebben een gemeenschappelijke fenylethylamine- basistructuur. Het verschil tussen de groepen I en II is niet erg groot, maar speelt een belangrijke rol bij zowel de farmacokinetiek als de analytiek (zie de structuurformules in paragraaf 3).

### 2.3 Gebruik

Naast het oorspronkelijke therapeutische gebruik, voornamelijk als bronchospasmolyticum (verwijderen van de bronchiën) bij astmatische aandoeningen en als uterusrelaxans (tegengaan contracties baarmoeder bij dreigende abortus), is bij gebruik bij landbouwhuisdieren een (positief) effect gevonden op de groei en de vet/vleesverhouding, het zogenaamde "herverdelende" effect.

Voor humaan gebruik worden op het moment in Nederland voornamelijk salbutamol (Ventolin), terbutaline (Bricanyl) en fenoterol (Berotec) toegepast. Carbuterol (Bronsecur) is enige tijd geleden teruggetrokken van de Nederlandse markt. Pirbuterol en clenbuterol zijn niet op de Nederlandse markt beschikbaar geweest.

Voor veterinaire toepassing (rund en paard) is clenbuterol voorlopig geregistreerd in afwachting van de definitieve registratie. Cimaterol is specifiek voor veterinaire doeleinden ontwikkeld maar als zodanig (nog) niet geregistreerd. Naast de genoemde beta(2)-agonisten wordt in de literatuur ook melding gemaakt van dierexperimenten met ractopamine en L-644,969.

### 2.4 Overige (humane) geneesmiddelen met een beta-agonistische werking

Naast de genoemde verbindingen is nog een aantal andere beta(2)-agonisten beschikbaar voor humaan gebruik: bamethaan, bufenine, isoetarine, isoxuprine, rimiterol, ritodrine, tretoquinol.

Eveneens zijn er beta-agonisten die naast de  $\beta_2$ -werking ook een duidelijker  $\beta_1$  effect uitoefenen: isoprenaline en orciprenaline. Daarnaast heeft een aantal stoffen naast een  $\beta$ -werking een matig tot sterk  $\alpha$ -effect: dipiverine, dopamine, efedrine, epinefrine (adrenaline), etilefrine, fenylpropanolamine, mefentermine, oxedrine, pseudoefedrine. Op grond van het werkingsprofiel en het optreden van bijwerkingen wordt de laatst genoemde groep bij voorkeur niet toegepast als bronchieverwijder.

Op het moment zijn, t.b.v. de CARA-therapie en het gebruik als uterus-relaxans, de  $\beta_2$ -agonisten iso-etharine, isoprenaline, fenoterol, orciprenaline, rimiterol, ritodrine, salbutamol en terbutaline in Nederland geregistreerd en verkrijgbaar [Repertorium 1989].

Een groot aantal stoffen is in de jaren '50 en '60 ontwikkeld en op de markt gekomen, zodat de geldigheidsduur van de toen verleende patenten inmiddels is verstreken en deze stoffen derhalve relatief eenvoudig zijn te synthetiseren en verkrijgbaar zijn op de wereldmarkt.

## 2.5 *Farmacokinetiek en metabolisme*

Vanuit residu-analytisch oogpunt is het van belang over gegevens te beschikken m.b.t. de dosering, de farmacokinetiek en het metabolisme van de genoemde farmaca. Vanuit het oogpunt van de volksgezondheid is de aanwezigheid van residuen (en eventuele werkzame of toxische metabolieten) in eetbare weefsels (vlees en organen) van belang. Voor het merendeel van de farmacologisch zeer actieve, laag gedoseerde dierbehandelingsmiddelen met een hormonale werking (zoals anabole steroidhormonen en beta-agonisten) is bekend of kan met enige zekerheid worden aangenomen dat de concentraties laag ( $\mu\text{g}/\text{l}$  (ppb) niveau) tot zeer laag (ppt niveau) zijn. Voor bloedplasma (of serum) geldt ook dat de concentraties, zeker enige tijd na toediening, laag zijn. In de uitscheidingsproducten, zoals urine, gal en faeces en de organen die bij het metabolisme en de uitscheiding zijn betrokken, zoals lever en nier, zijn de concentraties in het algemeen hoger.

De snelheid waarmee een verbinding wordt gemetaboliseerd en uitgescheiden kan worden uitgedrukt als een halfwaardetijd (tijd waarin de helft van de in het lichaam aanwezige hoeveelheid wordt geëlimineerd). Door het vergelijken van gegevens verkregen bij mens en dier, kan mogelijk een verband worden gelegd, zodat humane gegevens heel grof kunnen worden vertaald naar de te verwachten situatie bij het dier.

Voor wat de beta-agonisten betreft zijn er weinig gegevens bekend over de metabolisering en uitscheiding bij landbouwhuisdieren. De best bestudeerde stof is in dit opzicht clenbuterol. Een aantal gegevens over de experimentele toepassing als mestbevorderaar is weergegeven in tabel 2.

### 2.5.1 *Clenbuterol*

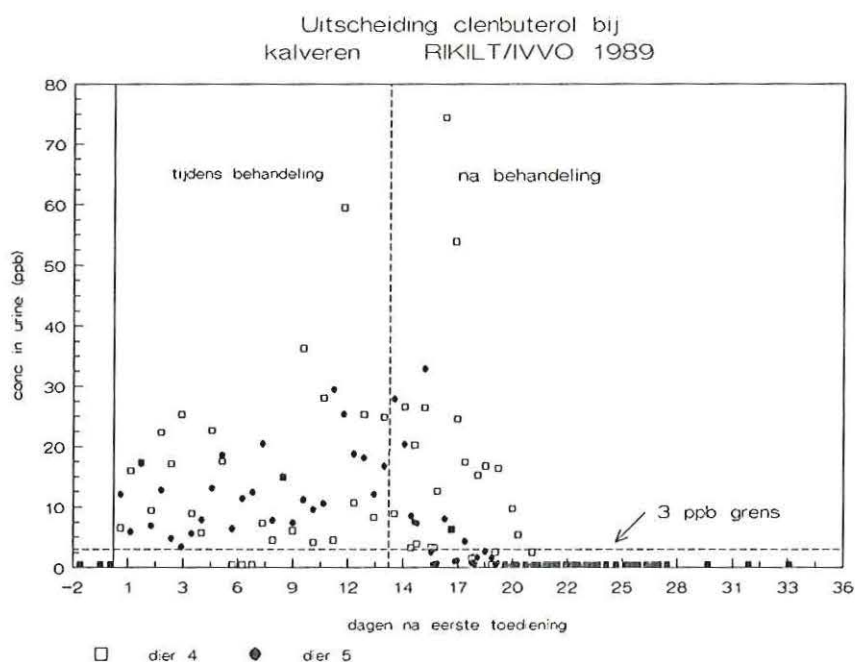
Clenbuterol is als enige beta(2)-agonist (voorlopig) geregistreerd op de Nederlandse markt voor toepassing bij paarden en, op attest van een dierenarts, bij runderen tot en met een leeftijd van 14 weken. Het kunnen aantonen van een mogelijk niet wettelijk gebruik als anabolicum



wordt hierdoor bemoeilijkt, omdat de keuring nu een kwantitatief karakter krijgt. Naast het gemeten gehalte speelt de leeftijd van het dier een rol en moet de vraag worden beantwoord of een bepaald, bijvoorbeeld in de urine gemeten, gehalte niet afkomstig kan zijn van een wettelijk toegestane behandeling.

Diverse onderzoeksgroepen, waaronder het RIKILT, hebben één of meerdere uitscheidingsexperimenten uitgevoerd, voornamelijk met kalveren, paarden (in kader dopingonderzoek) en varkens. Ook is de farmacokinetiek bij mensen bestudeerd.

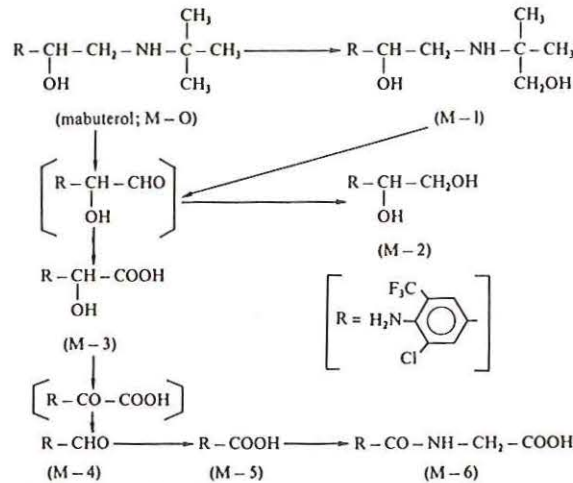
Uit de experimenten bleek dat clenbuterol voor een nog niet nader bepaald percentage onveranderd in de urine en de faeces wordt uitgescheiden. Uit door het RIKILT uitgevoerd onderzoek bij mestkalveren (ca 12-15 weken oude mannelijke dieren) bleek dat de halfwaardetijd



Figuur 1

ca. 24 tot 36 uur bedraagt. Ca. 7 dagen na stoppen van een twee weken durende toediening van twee maal daags  $0.8 \mu\text{g}$  clenbuterol HCl per kilo lichaamsgewicht waren de gehalten aan (onconjugueerd) clenbuterol in de urine lager dan  $3 \mu\text{g}/\text{l}$ . Tijdens de behandeling werden gehalten gemeten tot ca.  $70 \mu\text{g}/\text{l}$ . Het verloop van de gehalten in de tijd was zeer grillig (figuur 1). Opmerkelijk was het verschil tussen de gehalten van de nacht/ochtend (17:00 - 6:30) en ochtend/avondurines (6:30 - 17:00); in de nacht/- ochtendurinemonsters werden aanzienlijk hogere (factor 2 tot 3) gehalten gemeten.

Op grond van de structuur en gegevens verkregen met de nauw verwante stof mabuterol bij de rat, is de mogelijke vorming van een aantal metabolieten te voorspellen. Bij de rat zijn na toediening van mabuterol 6 metabolieten geïdentificeerd (figuur 2), een gehydroxyeerde tertiaire butyl metaboliet (M 1, farmacologisch actief), een glycol metaboliet (M 2), een amandelzuur metaboliet (M 3), een benzoëzuur metaboliet (M 5) en een hippuurzuur metaboliet (M 6) [Horiba et al, 1984].



Scheme 2: Biotransformation pathways for mabuterol.

1. Oxidation of the methyl of tert.-butyl group to the alcohol ( $\omega$ -oxidation: formation of M-1).
2. Oxidative deamination (major pathway: formation of M-2 and M-3).
3. Further oxidation of the secondary alcohol (formation of M-4 and M-5).
4. Conjugation with glycine to hippuric acid (formation of M-6).

Figuur 2

Hiernaast is op grond van de structuurovereenkomst met de sulfonamiden de vorming van een N4'-acetyl metaboliet (geacetyleerd aromatisch amine) niet onwaarschijnlijk. Door de aanwezigheid van een hydroxylgroep in clenbuterol is een conjugatie met glucuronzuur of sulfaat mogelijk. Collega onderzoekers hebben de aanwezigheid van deze conjugaten in de urine genoemd, maar deze bevindingen konden door het RIKILT in urine-monsters o.a. verkregen bij de dierexperimenten niet worden bevestigd.

Voor de toepassing van clenbuterol als bronchospasmo-lyticum zijn de volgende doseringen beschreven:

mens: 20  $\mu\text{g}$  (HCl zout) oraal [Förster 1988]  
rond: 0.8  $\mu\text{g}$  (HCl zout) per kilo lichaamsgewicht 2 maal daags  
oraal [Repertorium Diergeneesmiddelen 1985/1986]  
paard: 0.8  $\mu\text{g}$  (HCl zout) per kilo lichaamsgewicht 2 maal daags  
oraal [Repertorium Diergeneesmiddelen 1985/1986]



In tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de in de literatuur beschreven doseringen bij landbouwhuisdieren gericht op de anabole werking. In een aantal gevallen is de voor mestdoeleinden toegepaste dosering veel hoger (tot 1 mg/kg lichaamsgewicht per dag) dan de dosering als bronchospasmolyticum. De kans op hogere residugehalten wordt hierdoor groter.

Met betrekking tot de uitscheidingsnelheid zijn de volgens halfwaardetijden bekend:

mens:      halfwaardetijd ca. 60 uur [Yamamoto 1982], na toediening van  
            20  $\mu$ g oraal, maximale plasmaconcentratie ca. 100 pg/ml.  
            halfwaardetijd ca. 48 uur [Förster 1988], na toediening van  
            20  $\mu$ g (HCl zout) oraal, maximale plasmaconcentratie ca. 120  
            pg/ml  
            halfwaardetijd ca. 35 uur [Kopitar 1976a]  
rat:        halfwaardetijd ca. 26 uur [Kopitar 1976a]  
konijn:     halfwaardetijd ca. 10 uur [Zimmer 1976, Kopitar 1976b]  
hond:       halfwaardetijd ca. 10 uur [Zimmer 1976, Kopitar 1976b]  
hond:       halfwaardetijd ca. 16 uur [Saux 1986]  
rund/kalf halfwaardetijd ca. 24 tot 36 uur [RIKILT, 1989]

#### 2.5.2 *Cimaterol*

Over de uitscheiding van cimaterol zijn in de literatuur geen gegevens aangetroffen. Overeenkomstig de wijze zoals bij clenbuterol is beschreven, kunnen mogelijk vergelijkbare metabolieten worden gevormd. De uitscheidingsnelheid zal waarschijnlijk groter zijn dan de beta-agonisten van groep II ("fenolen") maar kleiner dan de halfwaardetijd van clenbuterol, op grond van de hogere polariteit (halfwaardetijd ca. 16 uur of hoger).

In tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de in de literatuur beschreven doseringen bij landbouwhuisdieren gericht op een anabool effect. De dosering varieert per publicatie, overeenkomstig het geval bij clenbuterol rol.

#### 2.5.3 *Carbuterol*

Naast gegevens over de humane dosering is over carbuterol weinig bekend.

Gebruik bij de mens [Informatorium 1985]:

- oraal: 1 - 3 mg (HCl zout), 3 - 4 maal daags, effect na 30 - 60 minuten, totale werkingsduur 2 - 4 uur.
- inhalatie: 0.1 mg, maximaal 12 maal daags, effect na 5 minuten, totale werkingsduur ca 4 uur.

De totale werkingsduur is iets korter in vergelijking tot salbutamol, fenoterol, terbutaline en pirbuterol.

#### 2.5.4 Fenoterol

Fenoterol wordt op het moment nog frequent in de humane therapie toegepast. Over het gebruik bij landbouwhuisdieren zijn geen gegevens beschikbaar.

Gebruik bij de mens [Informatorium 1985]:

- oraal: 1.25 - 5 mg (bromide zout), 3 maal daags, effect maximaal na 1 - 2 uur, totale werkingsduur 5 - 7 uur.
- inhalatie: 0.2 mg (bromide) 3 - 4 maal daags, effect na 5 minuten totale werkingsduur 4 - 8 uur.

Na orale toediening wordt de stof niet volledig geabsorbeerd uit het maagdarmkanaal; er is een groot first-pass effect (conjugatie met sulfaat); de stof wordt binnen 24 uur als sulfaatconjugaat uitgescheiden in urine (35%) en gal/faeces (40%) en ca. 2% als onveranderd fenoterol [Martindale 1982, Clarke 1986].

#### 2.5.5 Pirbuterol

Pirbuterol wordt in Nederland niet voor de humane therapie toegepast.

Gebruik bij de mens [Informatorium 1985]:

- oraal: 10 - 15 mg (HCl zout) 3 - 4 maal daags, max. 60 mg per dag, effect aanwezig na 45 - 60 minuten, totale werkingsduur ca. 6 uur.
- inhalatie: 0.4 mg (acetaat) 3 - 4 maal daags, effect na 5 minuten, totale werkingsduur ca. 5 uur.

De maximale plasmaconcentratie wordt bereikt na 2 - 3 uur en bedraagt na inname van 10 mg 6 ng/ml of na inname van 15 mg 10 ng/ml. De halfwaardetijd is 2.2 uur. Ca. 50% van de dosis wordt binnen 8 - 24 uur in de urine uitgescheiden.

### 2.5.6 *Salbutamol*

Van de momenteel humaan toegepaste beta-agonisten is het gebruik van salbutamol t.b.v. mestdoeleinden de enig genoemde [Cole et al., 1987]. M.b.t. de uitscheiding en eventuele metabolisering bij landbouwhuisdieren zijn geen gegevens bekend.

Gebruik bij de mens [Informatorium 1985]:

oraal: 2 - 4 mg (sulfaat) 3 - 4 maal daags.

inhalatie: 0.1 mg (sulfaat) maximaal 8 maal daags, effect treedt snel in en houdt 4 - 6 uur aan.

Na orale toediening wordt de stof snel geabsorbeerd door het maagdarmkanaal; er is een groot first-pass effect (conjugatie met sulfaat in de lever, niet in de darm); binnen 24 uur wordt de stof 50% als onveranderd en voor 50% als 4'-O-sulfaatconjugaat in de urine uitgescheiden. Ca. 12% wordt in de faeces aangetroffen. De halfwaardetijd is 2 - 7 uur [Martindale 1982, Clarke 1986].

Het metabolisme verschilt tussen diverse diersoorten. Het percentage aan glucuronideconjugaat varieerde van 10% bij de hond, 40% bij de rat en 90% bij het konijn [Aboul-Enein et al., 1981].

### 2.5.7 *Terbutaline*

Ook terbutaline is een in Nederland veelvuldig toegepast bronchospasmolyticum. Een veterinaire toepassing is niet beschreven.

Gebruik bij de mens [Informatorium 1985]:

oraal: 2.5 - 5 mg (sulfaat) 2 - 3 maal daags.

inhalatie: 0.25 - 0.5 mg (sulfaat), maximaal 16 maal daags, effect na 5 minuten, totale werkingsduur 4 - 5 uur.

Na orale toediening is er na een onvolledige opname een groot first-pass effect in de darmwand en de lever. Naast de vorming van een sulfaatconjugaat wordt ook een klein percentage tot glucuronideconjugaat omgezet. Slechts 15% van de orale dosis wordt in het plasma aangetroffen. In de urine, waarin tot 50% van de dosering wordt uitgescheiden, is naast de conjugaten ook een klein deel onveranderde stof (maximaal 10%) aanwezig. Tot 60% van de dosis wordt onveranderd in de faeces gevonden [Martindale 1982, Clarke 1986].



## 2.6 Conclusie en discussie

Over de residu-analytische aspecten van toepassing van beta(2)-agonisten bij landbouwhuisdieren en pluimvee is weinig bekend. Van de in de humane therapie gangbare beta(2)-agonisten is alleen het gebruik van salbutamol bij varkens beschreven [Cole et al., 1987].

T.a.v. gegevens van de te verwachten concentraties in de urine van landbouwhuisdieren kan, uitgaande van een aantal gegevens over metabolisme en uitscheiding bij mens en dier, een aantal voorspellingen worden gemaakt.

1. In de urine zullen de beta-agonisten van groep II ("fenolen") voor een belangrijk deel als sulfaat- en/of glucuronideconjugaten voorkomen. Bij de analyse moet hiermee rekening worden gehouden omdat dit consequenties heeft voor de gemeten gehalten (in relatie tot de gehanteerde actiegrenzen). Dit kan mogelijk een reden tot (inter)nationale disputen vormen.

Naast de geconjugeerde metabolieten kunnen ook andere metabolieten voorkomen. Omdat deze metabolisering wordt bepaald door de aanwezigheid van functionele groepen zullen er verschillen bestaan tussen de metabolieten van beta-agonisten uit groep I (waarschijnlijk voor het merendeel oxydatieve reacties, zoals deaminering) en groep II (voornamelijk conjugatiereacties).

2. Door de lagere farmacologische activiteit van de meeste beta-agonisten t.o.v. clenbuterol moeten hogere doseringen worden toegepast. Aangezien ook de uitscheidingssnelheid van de beta-agonisten uit groep II hoger zal zijn, zullen tijdens de behandeling hogere concentraties in de urine kunnen worden verwacht (10 - 500  $\mu\text{g}/\text{l}$ ). De uitscheiding van cimaterol is naar verwachting iets sneller tot vergelijkbaar met die van clenbuterol op grond van de sterke mate van structuurovereenkomst.

3. Ophoping van de beta-agonisten van groep II in vet en spierweefsel is door het meer hydrofiele karakter t.o.v. clenbuterol minder waarschijnlijk. De concentraties in spierweefsel zullen naar verwachting laag zijn (< 0.1 - 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Door de hogere omzettingssnelheid kunnen de concentraties in lever en nier hoger zijn in vergelijking tot clenbuterol.

Het farmacologisch effect van de beta(2)-agonisten wordt uitgeoefend door een verhoogde c-AMP concentratie in de cel als gevolg van een stimulatie van de  $\beta_2$ -receptoren. Mogelijk kan de hoeveelheid c-AMP in het bloedplasma een indicatie geven van het gebruik van stoffen met



een beta(2)-agonistische werking.

Hiernaast bestaat eventueel de mogelijkheid om aan de hand van de eigenschappen van het karkas, de spiersamenstelling en histologische parameters een uitspraak te doen over de toepassing van beta(2)-agonisten. Als een eerste screeningsonderzoek zou een dergelijke test een effectieve controle mogelijk maken.

Tabel 1

In de literatuur beschreven doseringen van beta-agonisten t.b.v. mest-doeleinden bij landbouwhuisdieren.

Stof	dier	gewicht (kg)	dosering	literatuur
cimaterol	stier	± 500	0, 33, 49.5, 66 mg/dier per dag ± 100 µg/kg lg /dag	Allen '87
cimaterol	stier	± 350	4 ppm in voer, ca 40 mg/dag, ± 110 µg/kg lg/dag	Boucqué '87
cimaterol	schaap	± 40	0, 0.57, 2.29, 11.24 mg/kg in voer, ± 500 µg/kg lg/dag (voor hoogste dosering)	Hanrahan '87
cimaterol	varken	30 - 100	1 ppm in voer, ca. 25µg/kg lg/dag	Bekaert '87
cimaterol	kip	± 1,2	0, 0.25, 0.5, 1, 2 ppm in voer, ± 4 mg/kg lg/dag (voor hoogste dosering)	Dalrymple '87
cimaterol	kip	± 1,2	0.25, 0.5 ppm in voer, ± 1 mg/kg lg/dag (hoogste dosering)	Scholtyssek '87
clenbuterol	lam	35	10 mg/kg dieet, ± 50 µg/kg lg/dag	Buttery '87
clenbuterol	stier	± 400	10, 500 mg/dag, 25 resp. 1250 µg/kg lg/dag	Boucqué '87
clenbuterol	varken	70 - 100	1 ppm in voer 27 µg/kg lg/dag	Van Weerden '87
L-640,033	kip	± 1,2	0, 0.25, 1, 4 ppm in voer, 6 mg/kg lg/dag (voor hoogste dosering)	Duquette '87a
L-644,969	lam	± 34	0, 0.25, 1, 4 ppm in voer, ± 210 µg/kg lg/dag (hoogste dosering)	Duquette '87b
L-644,696	varken	± 65	0, 0.25, 1, 4 ppm in voer, ± 120 µg/kg lg/dag (hoogste dosering)	Wallace '87
salbutamol	varken	30 - 80	2, 4, 8 ppm voer ca. 80 µg / kg lg, 2 maal daags	Cole '87

### 3. Analytiek

#### 3.1 Inleiding

In het eind van de jaren zeventig is veel onderzoek gedaan naar de optimalisering van de dosering van salbutamol en terbutaline bij mensen. Door de lage concentraties (lage  $\mu\text{g/l}$  niveau) in bloedplasma schoten veel van de toen gebruikelijke analysemethoden te kort m.b.t. de gevoeligheid. In deze tijd zijn analysemethoden ontwikkeld die voornamelijk gebruik maakten van vloeistofchromatografie, veelal in combinatie met préconcentratietechnieken en (gevoelige) electrochemische detectie. Hiernaast zijn methoden ontwikkeld op basis van gaschromatografie-massaspectrometrie. De genoemde methoden zijn gebruikt voor het bepalen van de concentraties in plasma tijdens de therapie. Bij het massaspectrometrisch onderzoek is om deze reden meestal 1 ionfragment gemeten. Voor keuringsonderzoek is dit, sinds het accepteren van de criteria voor analysemethoden (87/410), niet meer mogelijk. Minimaal 2 en bij voorkeur 4 ionfragmenten moeten worden gemeten en de onderlinge verhoudingen moeten aan bepaalde eisen voldoen (maximale variatie  $\pm 10\%$ ). Bij een analyse in het kader van keuring of opsporing moet rekening worden gehouden met een mogelijke juridische vervolging. Om deze reden moet de bevestiging bij voorkeur met gaschromatografie-massaspectrometrie worden uitgevoerd.

In dit rapport is op grond van de chemische structuur onderscheid gemaakt tussen groep I ("primaire aromatische amines": clenbuterol en cimaterol) en groep II ("fenolen": salbutamol, terbutaline, fenoterol, carbuterol en pirbuterol. Het verschil tussen de groepen is niet erg groot, maar de verschillen in polariteit en het aantal functionele groepen speelt een belangrijke rol bij de analytiek, zeker in het geval van een zogenaamde "multi-methode".

#### 3.2 Gaschromatografie-massaspectrometrie

Door de hoge polariteit van de beta-agonisten moeten deze stoffen, voorafgaande aan de gaschromatografische scheiding, worden gederivatiiseerd tot meer vluchtige verbindingen. Bij de derivatisering worden hydroxyl- en, afhankelijk van het gebruikte reagens, aminegroepen omgezet tot minder polaire en reactieve derivaten. Voor dit type verbindingen zijn trimethylsilyletherderivaten, fluoroacylderivaten, combinaties van beide voorgaande derivaten, alkylderivaten en cyclische derivaten gebruikelijk.

In de literatuur is een aantal mogelijke derivatiseringstechnieken beschreven. Een silylering van de hydroxylgroepen tot een O-trimethyl-



silylether (O-TMS) of een O-tertiair butyl dimethylsilyl ether (O-TBDMS) is het meest toegepast. Verder zijn mogelijk een acylering (van zowel de hydroxyl als de aminegroepen) bijvoorbeeld tot een trifluorazijnzuur- (TFA), een heptafluorboterzuur- (HFB) of een pentafluorpropyl-derivaat (PFPA). Ook een combinatie van silylering en acylering zijn toegepast, hierbij worden O-TMS/N-TFA derivaten gevormd. Interessant is de vorming van cyclische boorzuurderivaten van in structuur overeenkomende beta-antagonisten, zoals door Leloux et al. [1989] zijn beschreven. De fragmentatie van de zijketen wordt hierdoor bemoeilijkt zodat fragmenten met hogere massawaarden ontstaan.

Naast het verhogen van de vluchtigheid speelt de derivatisering een belangrijke rol bij de fragmentatie. Door het inbouwen van verschillende groepen verandert het molecuul zodanig, dat bij fragmentatie in de massaspectrometer (vooral bij de "hardere" electron impact ionisatie) bepaalde brokstukken beter worden gestabiliseerd en in een hogere intensiteit in het massaspectrum voorkomen. Dit biedt in principe de mogelijkheid de fragmentatie zodanig te beïnvloeden dat op massaspectrometers met uitsluitend electron impact ionisatie meer specifieke ionfragmenten te detecteren bij een voldoende lage detectiegrens.

Bij chemische ionisatie kan onderzoek worden gedaan naar positieve of negatieve ionen en fragmenten. Uitgezonderd Girauld et al. [1988] wordt door alle auteurs positieve chemische ionisatie toegepast.

Afhankelijk van het bij chemische ionisatie gebruikte reactiegas (meestal ammoniak) en de overige parameters (o.a. het type apparaat), wordt een bepaald fragmentatiepatroon verkregen. Naast het quasi-molecuulion ( $[M+H]^+$ ) ontstaat een klein aantal ionen, waarvan een deel structuurinformatie biedt. Er bestaat echter een optimum tussen de informatierijkdom en de te bereiken gevoeligheid. In het merendeel van de gevallen werd terwille van een zo gunstig mogelijke detectiegrens genoeg genomen met zo min mogelijk fragmentatie en werd uitsluitend het quasi-molecuulion gedetecteerd.

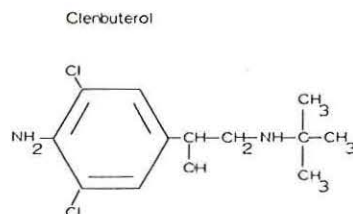
Om aan de EEG criteria 87/410 te kunnen voldoen moet, indien één GC-MS analyse (met de normale lage resolutie apparatuur) onvoldoende structuurspecifieke informatie oplevert door een onvoldoende aantal ionen, een combinatie worden gemaakt van meerdere GC-MS analyses, waarbij verschillende derivaten of verschillende ionisatietechnieken worden gebruikt. Door de combinatie, zoals beschreven in de draft criteria voor referentiemethoden [EEG, VI/5150/87-NL Herz. 3, 1989], wordt de bewijskracht groter.

Op het moment wordt door het RIKILT voor de bevestiging van de aanwezigheid van clenbuterol in urine- en weefselmonsters een dergelijke combinatie, GC-MS-electron impact en GC-MS positieve chemische ionisatie, toegepast [RIKILT A 546, 1989].



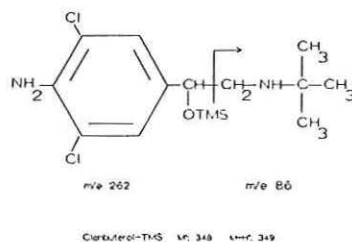
### 3.2.1 Groep I

#### 3.2.1.1 *Clenbuterol*



Figuur 3. Structuurformule van clenbuterol

Door de aanwezigheid van uitsluitend een basische aminegroep kan clenbuterol (fig. 3) relatief eenvoudig uit een matrix worden geëxtraheerd. Beschreven zijn vloeistof-vloeistof extracties, waarbij een opzuivering wordt verkregen door verschillende extracties na elkaar uit te voeren in alkalisch en zuur milieu. Door het RIKILT [RIKILT A546, 1989] en Schmidt et al. [1988] worden solid-phase extracties toegepast. Als derivaat wordt een O-TMS ether gevormd (fig. 4). Bij electron-impact massaspectrometrie treedt een hoge mate van fragmentatie op. Het massaspectrum vertoont 1 dominante massa (m/e 86) door breken van de zijketen. Het andere brokstuk (m/e 262) en de overige fragmenten met hogere massawaarden komen slechts met lage intensiteit voor (maximaal ca. 5%, fig. 4).



Figuur 4. Fragmentatie van clenbuterol-O-TMS

Het bij de chemische ionisatie gebruikte reactiegas speelt een rol bij te mate van fragmentatie. Het merendeel van de laboratoria gebruikt ammonia op grond van de hiermee verkregen gevoeligheid. Fürst et al. (1989) gebruiken methaan als reactiegas en krijgen meer structuurin-

formatie door de hogere mate van fragmentatie. Als interne standaard wordt door een groot deel van de laboratoria een door Boehringer-Ingelheim gesynthetiseerde gedeutereerde standaard,  $d_9$ -clenbuterol, toegepast. Inmiddels heeft het RIKILT, onafhankelijk van een fabrikant, een andere gedeutereerde standaard,  $d_6$ -clenbuterol, laten synthetiseren

Een aantal voor de analyse van belang zijnde stappen is samengevat in tabel 9. De toegepaste massaspectrometrische condities, met name derivatisering, het type ionisatie en gegevens m.b.t. de fragmentatie, zijn meer gedetailleerd weergegeven in tabel 3.

Tabel 3.

Massaspectrometrische condities, zoals derivatisering, ionisatie en gemeten fragmenten, bij de bepaling van clenbuterol

---

GC-MS-EI in combinatie met GC-MS-PCI [RIKILT A 546]

O-TMS:  $M^+$  m/e 348 (0%), m/e 86 (100%), m/e 262 (3%), m/e 243 (3%), m/e 274 (1%) (EI)

O-TMS:  $M+H^+$  m/e 349 (100%), chloorisotoop m/e 351 (70%), ammonia (PCI)

---

GC-MS-PCI [Förster et al., 1988, Schmidt et al., 1988]

O-TMS:  $M+H^+$  m/e 349 (100%), chloorisotoop m/e 351 (70%), ammonia

---

GC-MS-PCI, [Fürst et al., 1989]

O-TMS:  $M+H^+$  m/e 349 (100%), chloorisotoop m/e 351 (67%), m/e 333 (28%), m/e 335 (20%), m/e 353 (13%)

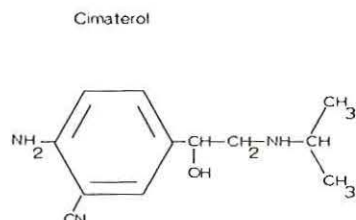
---

GC-MS-NCI [Girault et al., 1989]

PFPA:  $M-HCl^-$  m/e 368

---

### 3.2.1.2 Cimaterol

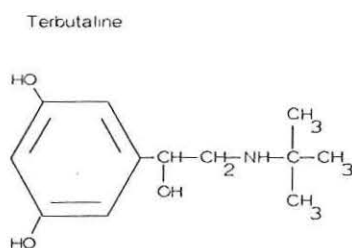


Figuur 5. Structuurformule van cimaterol

Voor de analyse van cimaterol zijn, naast de publicaties van Courtheyn et al. [1988 a,b,c] en hiervan afgeleid werk [Degroot et al., 1988] voor een HPLC en HPTLC bepaling, geen methoden in de open literatuur beschreven. Door de structuurovereenkomst met clenbuterol, kan, door relatief kleine aanpassingen van de GC-MS analysemethoden voor clenbuterol, cimaterol hiermee in combinatie worden bepaald.

### 3.2.2 Groep II

#### 3.2.2.1 Terbutaline



Figuur 6. Structuurformule van terbutaline

In een aantal publicaties is de analyse van terbutaline met GC-MS beschreven. In het merendeel werd gebruik gemaakt van (positieve) chemische ionisatie, waardoor de verkregen specificiteit van de ionfragmenten toeneemt. Voor de kwantificering werd gebruik gemaakt van een ge-deutereerde of getritieerde standaard of van het sterk structuur verwante salbutamol.

Bij de bepaling van terbutaline in plasma werd uitsluitend gekeken naar de niet-geconjugeerde fractie. In urine is onderzoek gedaan naar



zowel de niet-geconjugeerde als de som van niet-geconjugeerd en geconjugeerd (vnl sulfaat) terbutaline [Clare et al., 1979].

In tabel 9 is een aantal aspecten van de analysemethoden weergegeven. M.b.t. de extractie en clean-up is een aantal principes mogelijk: vloeistof-vloeistof extractie, ionpaarextractie, ionuitwisselingschromatografie en solid-phase extracties.

Voor plasma, een relatief schone matrix, is een eenvoudige clean-up procedure voldoende. Voor urinemonsters, zeker na hydrolyse van geconjugeerde metabolieten, is in het algemeen een meer uitgebreide monsteropzuivering noodzakelijk om een voldoende lage detectiegrens mogelijk te kunnen maken.

De toegepaste massaspectrometrische condities, met name derivatisering, het type ionisatie en gegevens m.b.t. de fragmentatie, zijn meer gedetailleerd samengevat in tabel 4.

Tabel 4.

Massaspectrometrische condities, zoals derivatisering, ionisatie en gemeten fragmenten, bij de bepaling van terbutaline

---

GC-MS-EI [Clare et al., 1979]

tri O-TMS:  $M^+$  m/e 441 (0%), m/e 86 (100%), m/e  $(M-86)^+$  356 (50%)

tri O-TMS/

N-TFA:  $M^+$  m/e 537 (0%), m/e 355 (100%)

---

GC-MS-EI [Martin et al., 1979]

tri O-TBDMS:  $M+H^+$  m/e 568 (0%),  $(M-86)^+$  m/e 482 (50%), m/e 86 (100%)

---

GC-MS-PCI [Jacobsson et al., 1980]

tri O-TMS:  $M+H^+$  m/e 442 (100%),  $(M-15)^+$  m/e 426 (0%),  $(M-86)^+$  m/e 356 (0%), ammonia

tri O-TMS:  $M+H^+$  m/e 442 (100%),  $(M-15)^+$  m/e 426 (0%),  $(M-86)^+$  m/e 356 (20%), isobutaan

tri O-TMS:  $M+H^+$  m/e 442 (100%),  $(M-15)^+$  m/e 426 (95%),  $(M-86)^+$  m/e 356 (50%), methaan

De gevoeligheid is bij het gebruik van ammonia als reactiegas ca. 10 maal groter.

---

GC-MS-PCI [Leferink et al., 1977]

tri O-TMS:  $M+H^+$  m/e 442 (12%),  $(M-15)^+$  m/e 426 (25%),  $(M-86)^+$  m/e 356 (6%), m/e 86 (100%), methaan

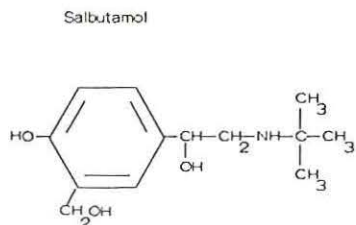
---

GC-MS-PCI [Leferink et al., 1982, Lindberg et al., 1982]

tri O-TMS:  $M+H^+$  m/e 442 (100%), ammonia

---

### 3.2.2.2 Salbutamol



Figuur 7. Structuurformule van salbutamol

Salbutamol komt qua structuur en fysisch-chemische eigenschappen sterk overeen met terbutaline (fig. 7). De gepubliceerde GC-MS-methoden vertonen derhalve veel overeenkomst met die voor terbutaline en kan in de meeste gevallen salbutamol in combinatie met terbutaline worden bepaald. Ook hier geldt dat rekening gehouden moet worden met de aanwezigheid van geconjugeerde metabolieten in urine. Een aantal voor de analyse van belang zijnde stappen is weergegeven in tabel 9. De toegepaste massaspectrometrische condities, met name derivatisering, het type ionisatie en gegevens m.b.t. de fragmentatie, zijn meer gedetailleerd samengevat in tabel 5.

Tabel 5. Massaspectrometrische condities, zoals derivatisering, ionisatie en gemeten fragmenten, bij de bepaling van salbutamol

---

GC-MS-PCI [Leferink et al., 1982, Powell et al., 1985 en 1986]

tri O-TMS:  $M+H^+$  m/e 456 (100%), ammonia

---

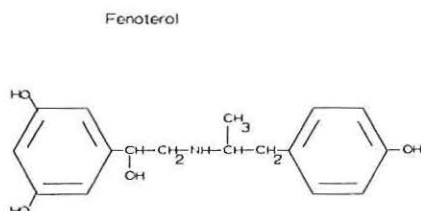
GC-MS-EI [Martin et al., 1979]

tri O-TBDMS:  $M+H^+$  m/e 568 (0%),  $(M-86)^+$  m/e 482 (50%), m/e 86 (100%)

---



### 3.2.2.3 Fenoterol



Figuur 8. Structuurformule van fenoterol

Fenoterol is m.b.t. de chemische structuur iets afwijkend van terbutaline en salbutamol, wel zijn zuur en basisch reagerende groepen aanwezig en zijn de overall eigenschappen vergelijkbaar (fig. 8). Het aantal publicaties is beperkt tot een gecombineerde methode voor terbutaline, salbutamol en fenoterol [Leferink et al., 1982].

Een aantal voor de analyse van belang zijnde stappen is weergegeven in tabel 9. De toegepaste massaspectrometrische condities, met name derivatisering, het type ionisatie en gegevens m.b.t. de fragmentatie, zijn meer gedetailleerd samengevat in tabel 6.

#### Tabel 6.

Massaspectrometrische condities, zoals derivatisering, ionisatie en gemeten fragmenten, bij de bepaling van fenoterol.

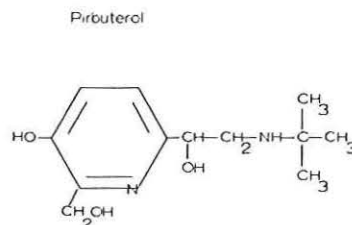
---

GC-MS-PCI [Leferink et al., 1982]

tri O-TMS:  $M+H^+$  m/e 592 (100%), ammonia

---

### 3.2.2.4 Pirbuterol



Figuur 9. Structuurformule van pirbuterol

Pirbuterol lijkt qua structuur zeer op salbutamol met dien verstande dat de aromatische ring vervangen is door een pyridinegroep. Voor de analyse lijkt dit geen complicaties op te leveren, zodat pirbuterol analoog aan salbutamol kan worden bepaald.

Een aantal voor de analyse van belang zijnde stappen is weergegeven in tabel 9. De toegepaste massaspectrometrische condities, met name derivatisering, het type ionisatie en gegevens m.b.t. de fragmentatie, zijn meer gedetailleerd samengevat in tabel 7.

#### Tabel 7.

Massaspectrometrische condities, zoals derivatisering, ionisatie en gemeten fragmenten, bij de bepaling van pirbuterol

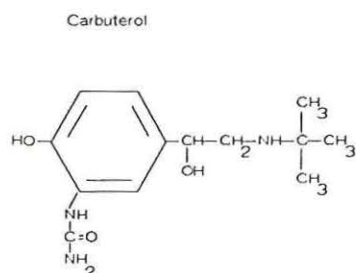
---

GC-MS-EI (20 eV) [Falkner et al., 1976]

tri-trimethylacetyl derivaat:  $M^+$  m/e 492 (10%), m/e 322 (100%), m/e 390 (30%), m/e 407 (20%)

---

### 3.2.2.5 Carbuterol



Figuur 10. Structuurformule van carbuterol

Tijdens het literatuuronderzoek zijn geen gegevens gevonden over de analyse van carbuterol in plasma en urine. Op grond van de structuur kan wel worden afgeleid dat de fysisch-chemische eigenschappen grotendeels overeenkomen zullen komen met bijvoorbeeld salbutamol.

## 3.3 Vloeistofchromatografie

Naar analogie van het keuringsonderzoek voor residuen van anabole steroïdhormonen en afgeleiden kunnen HPLC-methoden uitsluitend nog worden gebruikt bij de eerste screening of als methode voor de opzuivering van extracten van biologisch materiaal. Voor het bevestigingsonderzoek moet een GC-MS-analyse worden uitgevoerd.

### 3.3.1 Groep I

#### 3.3.1.1 *Clenbuterol*

Voor de bepaling van clenbuterol in plasma (muis, humaan, varken), urine (rund, varken, paard), weefsels (rund), veevoeder en preparaten is een aantal methoden beschreven (zie tabel 8). Het betreft voor het merendeel van de gevallen reversed-phase ionpaar-chromatografie in combinatie met electrochemische detectie. Courteyn et al. (1988) passen een selectieve post column derivatisering toe in de vorm van een Bratton Marshall reactie (diazotering en vorming van een diazokleurstof). Bij deze reactie worden alleen verbindingen met een primair aromatisch amine gedetecteerd (clenbuterol, cimaterol en bv. sulfonamiden). Voor de overige beta-agonisten is deze reactie niet bruikbaar.



De isolatie en clean-up is gebaseerd op vloeistof-vloeistof- en solid-phase extracties, met variaties in de pH-waarde.

### 3.3.1.2 *Cimaterol*

M.b.v. de bepalingsmethode van Courtheyn et al. [1988] (tabel 8) kunnen cimaterol en clenbuterol tegelijkertijd worden bepaald in urine, plasma, veevoeder en eventueel faeces. Hiernaast zijn in de open literatuur geen publicaties gevonden.

### 3.3.2 Groep II

#### 3.3.2.1 *Salbutamol, Terbutaline, Fenoterol*

Voor de "fenolische" beta-agonisten zijn meerdere analysemethoden gepubliceerd. Het betreft de analyse van preparaten, serum of plasma (humaan), urine (humaan) en weefsel (humaan). De isolatie en clean-up is meer bewerkelijk in vergelijking tot clenbuterol en cimaterol, als gevolg van de aanwezigheid van zowel zure als basische groepen in het relatief polaire molecuul. Bij een vloeistof-vloeistof extractie moeten derhalve polaire oplosmiddelen worden gebruikt hetgeen leidt tot coëxtractie van storende verbindingen uit de matrix. Een alternatief is de al eerder genoemde ionpaar-extractie en ionuitwisselingschromatografie.

Door de lage concentraties en de relatief lage extinctiecoëfficiënt is UV-detectie onvoldoende gevoelig. Voor salbutamol is (natieve) fluorescentie-detectie beschreven. Het merendeel van de auteurs gebruikt electrochemische detectie, veelal in combinatie met een kolomschakelsysteem voor opzuivering en préconcentratie.

De voor de analyse van belang zijnde stappen zijn weergegeven in tabel 8.

### 3.4 Overige technieken

Naast de genoemde GC-MS- en HPLC-methoden is voor salbutamol, fenoterol en terbutaline een aantal dunnelaagchromatografie (TLC) en immunoassay's (RIA en ELISA) beschreven (tabel 8).

De gevoeligheid van de dunnelaagmethoden is relatief laag waardoor de detectiegrenzen hoog zijn. Een voordeel is dat door de specifieke kleuringen structuurinformatie wordt verkregen en ook in structuur overeenkomende verbindingen kunnen worden gesignaleerd. Dit betekent dat dunnelaagchromatografie vooral geschikt is voor screeningsonder-

zoek.

De immunoassay's kunnen voor dit zelfde doel worden ingezet. Door een geschikte keuze van het gebruikte antilichaam is een analyse van meerdere verbindingen in één bepaling mogelijk.

Een logische vervolg op de toepassing van antilichamen is het gebruik in de immunoaffiniteitschromatografie. Alhoewel hierover nog niet gepubliceerd is, wordt op het moment zowel binnen het RIKILT als het RIVM van deze techniek gebruik gemaakt bij de analyse van een serie beta(2)-agonisten in o.a. urinemonsters. Een nadeel hierbij is dat de kans zeer groot is dat door het toegepast antilichaam een selectie wordt gemaakt, waardoor niet alle van belang zijnde beta(2)-agonisten kunnen worden geëxtraheerd.

### 3.5 Conclusie en discussie

In de literatuur zijn geen analysemethoden beschreven waarmee tegelijkertijd clenbuterol, cimaterol, salbutamol, terbutaline, fenoterol, carbuterol, pirbuterol en andere beta(2)-agonisten in biologisch materiaal, bloedplasma of serum, urine en (eetbare) weefsels kunnen worden bepaald. Met de gepubliceerde methoden kan ten hoogste een aantal beta-agonisten worden geanalyseerd met een kwalitatieve betrouwbaarheid die op het moment, ook gezien de EEG criteria (87/410), niet voldoende is, uitgezonderd de door het RIKILT [RIKILT A546, 1989] en de door Fürst et al. [1989] ontwikkelde GC-MS-methoden voor clenbuterol.

Dit betekent dat voor bevestigingsdoeleinden methoden moeten worden ontwikkeld die wel aan de gestelde eisen voldoen. In principe is het mogelijk een "multimethode" waarmee alle genoemde verbindingen kunnen worden bepaald te ontwikkelen. De extractie en opzuivering zijn in dat geval redelijk gecompliceerd om de in polariteit uiteenlopende verbindingen zo selectief mogelijk te extraheren. Hierbij kan worden gedacht aan (immuno)affiniteitschromatografie eventueel in combinatie met andere opzuiveringsstappen.

Voor een algemene screening moet een zo breed mogelijk scala aan beta(2)-agonisten kunnen worden bepaald. Immunoaffiniteitschromatografie kan voor dit doel te selectief zijn en waarschijnlijk zijn minder specifieke extractietechnieken (solid-phase of ionpaarextractie) meer geschikt. Indien de detectie in dit geval met massaspectrometrie zou plaatsvinden kan gebruik gemaakt worden van de overeenkomst in structuur van de beta(2)-agonisten. Een deel van de verbindingen met een tertiaire butylgroep geeft bij electron-impact massaspectrometrie aanleiding tot de vorming van m/e 86. Bij cimaterol en aanverwante verbindingen met een isopropylgroep ontstaat door breuk van de zijketen een fragment met massa m/e 72. Dit biedt de mogelijkheid tot een



groepspecifieke massaspectrometrische detectie.

Naast GC-MS methoden is de ontwikkeling van screeningsmethoden zinvol. Hierbij kan bijvoorbeeld worden gedacht aan immunochemische methoden.

#### 4. Generale conclusie en discussie

Op grond van het onderzoek blijkt dat het aantal in de literatuur beschreven multi-methoden zeer beperkt is, waarbij het met deze methoden te onderzoeken scala aan beta(2)-agonisten erg klein is. Doordat deze methoden ontwikkeld zijn voor toepassing voor onderzoek van humaan bloedplasma en urine, zijn aanpassingen noodzakelijk voor het gebruik als residuemethoden voor monsters van dierlijke oorspong. In de literatuur is echter wel een aantal aanknopingspunten gevonden die bij het ontwikkelingsonderzoek naar methoden kunnen worden gevolgd. Gezien de grote variëteit aan beta(2)-agonisten is het gebruik van screeningsmethoden aan te bevelen. Deze methoden kunnen worden gebaseerd op immunochemische methoden of bijvoorbeeld fysiologische parameters.

T.b.v. het bevestigingsonderzoek moeten criteria en actiegrenzen nog nader worden vastgesteld.

M.b.t. gegevens over de farmacologie, met name de farmacokinetiek, het metabolisme en mogelijke residu-niveaus van beta(2)-agonisten bij landbouwhuisdieren en pluimvee blijken weinig gegevens bekend te zijn. Aan de hand van bij de mens verkregen gegevens zijn voorspellingen te maken over bijvoorbeeld de uitscheidingsnelheid en de metabolisering. Op grond van de chemische structuur zijn geconjugeerde metabolieten te verwachten van bijvoorbeeld salbutamol.

#### 5. Aanbevelingen

##### - *Metabolisme*

Als gevolg van het feit dat slechts weinig gegevens over het metabolisme en de uitscheiding van de beta(2)-agonisten bij landbouwhuisdieren beschikbaar zijn, moet de kennis hierover worden uitgebreid. Dit betekent dat dierexperimenteel onderzoek verricht moet worden om keuring en opsporingsonderzoek efficiënt uit te kunnen voeren. Voor die beta(2)-agonisten die ter registratie worden aangeboden zou de fabrikant deze gegevens kunnen of moeten verstrekken.

##### - *Screening*

Om adequaat te kunnen controleren op de aanwezigheid van residuen van allerlei mogelijke beta(2)-agonisten zijn screeningsmethoden noodzakelijk die snel, goedkoop en eenvoudig uit te voeren zijn en geschikt zijn voor de gehele groep van beta(2)-agonisten. In principe moeten



deze methoden zo dicht mogelijk bij de slachtlijn of in de bedrijfsfase kunnen worden toegepast. Hierbij kan worden gedacht aan:

- fysiologische parameters of indicatoren
- immunochemische methoden

Voor beide punten is het uitvoeren van nader onderzoek zinvol om de mogelijkheden vast te stellen.

*- Criteria*

Omdat bij het onderzoek naar beta(2)-agonisten niet altijd aan de EEG criteria kan worden voldaan is het, om problemen bij keuring/herkeuring te voorkomen, noodzakelijk om binnen Nederland en de EEG, voorafgaande aan monsteronderzoek in het kader van de keuring, de massaspectrometrische criteria en de te hanteren actiegrenzen vast te stellen. Aan deze aspecten wordt binnen het RIKILT aandacht besteed. Op korte termijn moet er tenminste overleg plaatsvinden tussen beleidsdirecties (VD, VKA, VHI) en de in Nederland betrokken onderzoeksinstituten (RIKILT en RIVM).

*- Structureel overleg*

Er is structureel overleg gewenst om een korte lijn tussen het beleid en het onderzoek te creëren. Deze korte lijn is noodzakelijk om het beleid te kunnen laten beschikken over voldoende en ook actuele informatie.

Bijlage I

Tabel 8.

Overzicht analysemethoden beta-agonisten gebaseerd op HPLC, TLC en immunoassay.

Verbinding(en)	Matrix	Extractie Clean-up	Techniek	Mdh	Literatuur
Clenbuterol	urine (kalf)	alkalische extractie	TLC, detectie diazotering	20-50 µg/l	Brunn '88
Clenbuterol	urine/weefsel rund	extractie resp. enz. hydrolyse/ extractie (alk.)	HPLC-PCD en TLC	0.25 resp 0.5 µg/l of g	Degroodt '88
Clenbuterol	plasma (muis)	alk. extractie	HPLC-ECD	3 µg/l	Diquet '84
Clenbuterol	urine (paard)	extractie m.b.v ClinElut	HPLC-UV CN en SDS	2 µg/l	Eddins '85
Clenbuterol	preparaten	zuur	HPLC-UV CN/heptaansulfonzuur	-	Hamann '85
Clenbuterol	serum/plasma humaan, varken paard	SPE C-18	HPLC-ECD C-8 (4.1)	5-10 µg/l	Hauck '89
Clenbuterol	urine (rund, varken)	SPE C-18 of alk. m.b.v. Extrelut/C-2	HPLC-UV-ECD	1 µg/l	Hooijerink '89
Clenbuterol	urine (rund)	alk.	HPLC-ECD C-8 (4)	5 µg/l	Meyer '88
Clenbuterol	urine (kalf)	extractie m.b.v. ClinElut	HPLC-ECD CN (3)	1 µg/l	Papillon '88
Clenbuterol	plasma (h)	eiwit praecipitatie	Enzyme immuno assay	50 ng/l	Yamamoto '82
Fenoterol	plasma (h)	niet beschreven	Radio immuno assay	20 - 50 ng/l	Rominger '85
Pirbuterol	preparaat	-	fluorescentie	-	Mohamed '85
Prenalterol	plasma/urine (h)	SPE C-18	HPLC-ECD C-8 (3.5)/citraat	1 µg/l	Lagerström '84
Salbutamol	plasma/urine (h)	SPE C-18 resp. XAD-2	TLC van indo- aniline deriv.	1 resp 20 µg/l	Colthup '85
Salbutamol	serum (h)	SPE C-18	HPLC-ECD	1 µg/l	Emm '88
Salbutamol	plasma (h)	DEHP/zuur	HPLC-Fluoresc. C-18 (3-4)	1 µg/l	Hutchings '83

Verbinding(en)	Matrix	Extractie Clean-up	Techniek	Mdh	Literatuur
Salbutamol	plasma konijn	SPE C-18/ heptaansulfonaat	HPLC-fluoresc. C-8 (6)/hept. sulf.	4 µg/l	Kurosawa '84
Salbutamol	plasma (h)	alk. extr.	RIA	1.6 µg/l	Loo '87a/b
Salbutamol	plasma (h)	DEHP in CHCl <sub>3</sub> / zuur	HPLC-fluoresc. C-18 (2.5)	1 µg/l	Miller '86
Salbutamol	plasma (h)	SPE C-18	HPLC-ECD kol. schak. IEXC/C-2	0.5 µg/l	Oosterhuis '82
Salbutamol	serum (h)	SPE C-18/DEHP& hept. sulfz./zuur	HPLC-ECD C-18 (6.8) hept. sulfonzuur	400 ng/l	Tan '84
Terbutaline	plasma (h)	ionwisselaar	HPLC-ECD C-18/kol.schak.	1 µg/l	Berquist '83
Terbutaline	preparaten	-	HPLC-ECD CN	-	Childress '87
Terbutaline	plasma (h)	SPE C-18 (8.0)	HPLC-ECD C-8/C-18/IEXC in kol. schakeling	1 µg/l	Edholm '82
Terbutaline	plasma (h)	SPE C-18	HPLC-ECD/kol. schakeling	1-2 µg/l	Kennedy '87
Terbutaline	plasma (h)	ionenwisselaar	TLC-glyoxylzuur/	1-5 µg/l	Tripp '78
Clenbuterol Cimaterol	urine (rund), veevoeders	alk. (ChemElut)/ zuur resp zuur/alk. (ChemElut)/zuur	HPLC-PCD	0.3 µg/l	Courtheyn '88
Clenbuterol Cimaterol	urine (rund), veevoeders	alk. (ChemElut)/ zuur resp zuur/alk. (ChemElut)/zuur	TLC/kleuring	0.3 µg/l	Courtheyn '88
Bambuterol Terbutaline	preparaten	-	HPLC-UV C-18/octaansulfaat (3)	-	Wannerberg '88
Clenbuterol Mabuterol	plasma (paard)	alk. (11-12)	HPLC-ECD C-8/hept. sulfz.	0.5 resp. 2 µg/l	Qureshi '88
Terbutaline Metaproterenol Salbutamol	plasma (h)	kationwisselaar	HPLC-ECD C-18/octaan- sulfonzuur (7.4)	250 ng/l	Cooke '83
Terbutaline Salbutamol	urine (h)	kationwisselaar	TLC/dichloroqui- nondiimide/NH <sub>3</sub>	200 resp. 500 µg/l	Plavsic '81

Afkortingen: (a): extractie m.b.v. Chemelut kolom, (h): humaan, (waarde): pH-waarde



Bijlage II.

Tabel 9.

Overzicht analysemethoden beta-agonisten gebaseerd op GC en GC-MS.

Verbinding(en)	Matrix	Extractie Clean-up	Techniek	Mdh	Literatuur
Clenbuterol	urine (paard)	alk. (9.5) extractie	GC-NPD	5 µg/l	Collet '83
Clenbuterol	plasma (h) evt. melk en urine	alk. (9.5)/zuur (1)/alk.(12)	GC-MS-PCI/NH <sub>3</sub> O-TMS i:d <sub>9</sub> -clenbuterol	50 ng/l	Förster '88
Clenbuterol	urine/lever/ vlees/veevoeder	zuur /alk. kieselgel	GC-MS-PCI/CH <sub>4</sub> O-TMS i:d <sub>9</sub> -clenbuterol	0.05-0.5 µg/l of kg	Fürst '89
Clenbuterol	plasma/biol. materiaal	alk. (12)	GC-MS-NCI/CH <sub>4</sub> PFPA i:d <sub>9</sub> -clenbuterol	5 ng/l	Girault '88
Clenbuterol	urine (kalf, varken)	SPE C-18	GC-MS-EI GC-MS-PCI O-TMS i:d <sub>6</sub> -clenbuterol	0.5 µg/l	RIKILT '89
Clenbuterol	urine (h)	SPE C-2	GC-MS-PCI/NH <sub>3</sub> O-TMS i:d <sub>9</sub> -clenbuterol	1 µg/l	Schmidt '88
Clenbuterol	diervoeder	zuur/alk./zuur/ alk.	GC-electr. capt. als clenbuteron	2 µg/kg	Steinwandter '89
Pirbuterol	plasma (h,hond)	alk./zuur/alk.	GC-EI (20 eV) TMA i:d <sub>9</sub> -pirbuterol	1 µg/l	Falkner '76
Salbutamol	plasma (h)	SPE XAD-2	GC-MS ?	-	Bland '84
Salbutamol	plasma (h)	tetraphenylbo- ron/zuur/alk.(11)	GC-MS-EI O-TMS/O-TBDMS i:d <sub>3</sub> -salbutamol	1 µg/l	Martin '76
Salbutamol	plasma (h)	alk. (10.6)	GC-MS-PCI/NH <sub>3</sub> O-TMS i:d <sub>3</sub> -salbutamol	0.25 µg/l	Powell '85
Salbutamol	plasma (h)	alk. (10.6)	GC-MS-PCI/NH <sub>3</sub> O-TMS i:d <sub>3</sub> -salbutamol	1 µg/l	Powell '86

Verbinding(en)	Matrix	Extractie Clean-up	Techniek	Mdh	Literatuur
Salbutamol	plasma (h)	alk. (10.6)/NaCl	GC-MS-PCI/NH <sub>3</sub> O-TMS i:d <sub>3</sub> -salbutamol	0.25 µg/l	Weisberger '83
Terbutaline	plasma/urine(h) vrij/geconju- geerd	alk.(9.8)/zuur extractie	GC-MS-EI O-TMS/N-TFA i:"ethyl"-terbutaline	0.4 µg/l	Clare '79
Terbutaline	plasma (h)	ionenwisselaar/ alk. (11)	GC-MS-PCI/NH <sub>3</sub> i:d <sub>6</sub> -terbutaline	0.1 µg/l	Jacobson '80
Terbutaline	serum/urine (h)	DEHP/etoac (7.6)	GC-MS-PCI/NH <sub>3</sub> O-TMS i:d <sub>6</sub> -terbutaline	1 µg/l (serum)	Leferink '77
Terbutaline	weefsels (h)	vriesdrogen/DEHP	GC-MS-PCI/CH <sub>4</sub> O-TMS i:d <sub>6</sub> -terbutaline	3 µg/kg	Leferink '78
Terbutaline	plasma (h)	ionpaar tetraphenyl boron/heptan-3-one	GC-MS-EI 250 pg/ml O-TBDMS i:salbutamol		Martin '79
Tolubuterol	plasma (h)	alk. extr.	GC-electr. capt. 200 ng/l O-TFA/N-TFA i:deschloro-tolubuterol		Wood '87
Betablokkers	urine (h)	SPE	GC-MS-EI O-TMS/N-TFA O-TFA/N-TFA n-butyl-boron	-	Leloux '89
Terbutaline analoge	-	ionpaarextractie o.a. DEHP	GC(-MS)	-	Brands '82
Terbutaline (salbutamol)	plasma/urine(h)	DEHP (7.5)	GC-MS-PCI/CH <sub>4</sub> O-TMS	1 µg/l	Leferink '76
Terbutaline Salbutamol Fenoterol	serum (h)	SPE C-18 (7.4)	GC-MS-PCI/NH <sub>3</sub> O-TMS  i:d <sub>6</sub> -terbutaline i:d <sub>3</sub> -salbutamol i:d <sub>5</sub> -fenoterol	1 µg/l	Leferink '82
Terbutaline salbutamol	plasma (h)	ionenwisselaar/ alk. (11)	GC-MS-PCI/NH <sub>3</sub> O-TMS i:d <sub>6</sub> -terbutaline	0.3 µg/l	Lindberg '82

Afkortingen: (a): extractie m.b.v. Chemelut kolom, (h): humaan, i: interne standaard, (waarde): pH-waarde

Bijlage III.

Lijst van gebruikte afkortingen

alk.: alkalische extractie

zuur: zure extractie

HPLC: high performance liquid chromatography

DEHP: bis ethyl hexyl fosfaat

ECD: electrochemical detection

Mdh: minimaal detecteerbare hoeveelheid (aantoonbaarheidsgrens)

NH<sub>3</sub>: ammoniak

N-TFA: trifluoroacetyl derivaat

PCD: post column detection

PCI: positieve chemische ionisatie

PFPA: pentafluoropropionzuuranhydride derivaat

SPE: solid-phase extractie

TBDMS: tertiair butyl dimethylsilyl derivaat

TMA: trimethylacetyl derivaat

O-TMS: trimethylsilyl derivaat



## Literatuur

H.Y. Aboel-Enein et al., Analytical Profiles of Drug Substances, edited by K. Florey, Vol 10, p 665, Academic Press, 1981

P. Allen et al., CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science, p83.

H. Bekaert et al., CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science, p127.

S. Bergguist and L.E. Edholm, J. Liquid Chromatography, Vol. 6 (3), 559-574, 1983

R.E. Bland et al., Intern. J. Environ. Anal. Chem., Vol. 18, 25-35, 1984

Ch. V. Boucqué et al., CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science, p 93.

P.M. Brands et al., Analytica Chimica Acta, Vol. 153, 85-95, 1982

H. Brunn, Fleischwirtschaft, Vol. 68 (11), 1476-1477, 1988

P.J. Buttery et al., CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science, p 29.

W.L. Childress, J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 70 (6), 974-976, 1987

R.A. Clare et al., Biomedical Mass Spectrometry, Vol. 6 (1), 31-37, 1979

E.G.C. Clarke, Clarke's isolation and identification of drugs, edited by Moffat et al., second edition, The Pharmaceutical Press, 1986

J.A. Clements et al., Journal of Chromatography, Vol. 189, 272-275, 1980

D.J.A. Cole et al., CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science, p 137.

L. Collett et al., Fifth International Conference on the use of drugs, June 1983, 265-271

P.V. Colthup et al., Journal of Chromatography, Vol. 345, 111-118, 1985

W.J. Cooke, Electrochemistry - Pittsburg Conference, No. 338

- D. Courtheyn et al., Benelux Economische Unie Werkgroep Hormonen en Anti-hormonen, SP/LAB/h (88) 41
- D. Courtheyn et al., Benelux Economische Unie Werkgroep Hormonen en Anti-hormonen, SP/LAB/h (88) 42
- D. Courtheyn et al., Benelux Economische Unie Werkgroep Hormonen en Anti-hormonen, SP/LAB/h (88) 43
- D. Courtheyn et al., Benelux Economische Unie Werkgroep Hormonen en Anti-hormonen, SP/LAB/h (89) 5
- R.H. Dalrymple et al., CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science, p 163.
- J.M. Degroodt et al., submitted for publication, 1988
- H.D. Dell et al., Z. Anal. Chem., Vol. 279, 275-281, 1976
- B. Diquette et al., Journal of Chromatography, Vol. 336, 415-421, 1984
- P.F. Duquette et al. a, CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science, p173.
- P.F. Duquette et al. b, CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science p 119.
- C. Eddins et al., Journal of Chromatographic Science, Vol. 23, 308-312, 1985
- L.E. Edholm et al., Chromatographia, Vol. 16, 341-344, 1982
- EEG, directoraat VI: VI/5150/87-NL Herz. 3, 1989; origineel: EN/PVET/2562, VI/B/II.2
- N.J. Eggers, Journal of Liquid Chromatography, Vol. 6 (11), 1955-1967, 1983
- T. Emm et al., Journal of Chromatography Biomedical Applications, Vol. 427, 188-194, 1988
- F.C. Falkner et al., Biomed. Mass Spectrom., Vol. 3, 207-211, 1976
- H.J. Förster et al., Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, Vol. 17, 417-420, 1988
- P. Fürst et al., Deutsche Lebensmittel Rundschau, Vol. 85 (2), 35-39, 1989

- J. Girault et al., CEPHAC France, 1988
- A. Goodman Gilman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, sixth edition, Macmillan Publishing Co. Inc., 1980
- R.J.J. Hageman et al., Journal of Chromatography, Vol. 274, 239-253, 1983
- J.A. Hamann et al., Journal of Chromatographic Sciences, Vol. 23, 34-36, 1985
- J.P. Hanrahan et al., CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science, p 106.
- M. Hauck et al., Deutsche Lebensmittel Rundschau, Vol. 85 (6), 178-181, 1989
- H. Hooijerink et al., Submitted for publication, 1989
- M. Horiba et al., Arzneimittelforschung, Vol. 34 (11A), 1668-1679, 1984
- M.J. Hutchings et al., Journal of Chromatography, Vol. 277, 423-426, 1983
- Informatorium Medicamentorum 1985, Koninklijke Nederlandse Maatschappij ter bevordering der Pharmacie, Den Haag
- S.E. Jacobsson et al., Biomedical Mass Spectrometry, Vol. 7 (6), 265-268, 1980
- E. Kaukel et al., Dusteri-Verlag Dr. Karl Feistle, Munich-Deisenhofen, Germany, Beta-Sympathikomimetika Neuen Gener., Kolloq. Bad Reichenhaller, Forschungsanst. Kr. Atmungsorgane, 11th, P50-62, 1978
- B.M. Kennedy et al., Chromatographia, Vol. 24, 895-899, 1987
- Z. Kopitar and A. Zimmer, Arzneimittelforschung, Vol. 26(7a), 1435-141, 1976a
- Z. Kopitar and A. Zimmer, Arzneimittelforschung, Vol. 26(7a), 1435-141, 1976b
- N. Kurosawa et al., Journal of Chromatography, Vol. 305, 485-488, 1984
- P.O. Lagerström et al., Journal of Chromatography, Vol. 307, 230-234, 1984
- J.G. Leferink et al., Biomedical Mass Spectrometry, Vol. 3, 255-256, 1976
- J.G. Leferink et al., Journal of Chromatography, Vol. 143, 299-305, 1977



J.G. Leferink et al., Journal of Analytical Toxicology, Vol. 2 (3), 86-88, 1978

J.G. Leferink et al., Journal of Chromatography, Vol. 229, 217-221, 1982

M. Leloux et al., Journal of Chromatography, Vol. 488, 357-367, 1989

C. Lindberg et al., Biomedical Mass Spectrometry, Vol. 9 (11), 493-494, 1982

J.C.K. Loo et al., Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, Vol. 55 (2), 283-286, 1987

L.E. Martin et al., Biomedical Mass Spectrometry, Vol. 3, 184-190, 1976

L.E. Martin et al., Biomedical Mass Spectrometry, Vol. 6 (10), 460-461, 1979

Martindale The Extra Pharmacopoeia 28 th edition, 1982

H.H.D. Meyer et al., Deutsche Veterinärmedizinischer Gesellschaft Tagungsband Garmisch, 1988

L.G. Miller et al., Journal of Chromatography Biomedical Applications, Vol. 381, 205-208, 1986

M.E. Mohamed et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 68 (6), 1222-1225, 1985

B. Oosterhuis and C.J. van Boxtel, Journal of Chromatography, Vol. 232, 327-334, 1982

A. Papillon et al., Revue de l'Alimentation Animale, Décembre 1988, 63-64

F. Plavsic, Clinical Chemistry, Vol. 27 (5), 771-773, 1981

M.L. Powell et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 74 (2), 217-219, 1985

M.L. Powell et al., Journal of Clinical Pharmacology, Vol. 26, 643-646, 1986

G.A. Qureshi and A. Eriksson, Journal of Chromatography, Vol. 441, 197-205, 1988

Repertorium 1989, Nederlandse Associatie van de Farmaceutische Industrie (NEFARMA), Utrecht, 1989

Repertorium Diergeneesmiddelen, FIDIN, vierde editie 1985/1986

RIKILT A 546, The determination of clenbuterol in urine with GC-MS, RIKILT Standard procedure for internal use, 1989

K.L. Rominger and H.J. Albert, *Arzneimittelforschung*, Vol. 35 (1), 415-420, 1985

M.C. Saux et al., *Journal of Pharmacology*, Vol. 17(4), 692-698, 1986  
J. Schmidt and A. Bücheler, *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, Vol. 17, 415-416, 1988

S. Scholttysek et al., CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science, p 178.

H. Steinwandter, *Frisenius Z. Anal. Chem.*, Vol. 333, 634-636, 1989

Y. Tan and S.J. Soldin, *Journal of Chromatography Biomedical Applications*, Vol. 311, 311-317, 1984

S.L. Tripp et al., *Analytical Letters*, Vol. B11 (9), 727-740, 1978

A.P. van der Vet et al., *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapeutics and Toxicology*, Vol. 24(10), 569-573, 1986

D.H. Wallace et al., CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science, p 143.

O. Wannerberg and B. Persson, *Journal of Chromatography*, Vol. 435, 199-203, 1988

E.J. Van Weerden et al., CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussels, 19-20 May 1987, edited by J.P. Hanrahan, Elseviers applied science, p 152.

M. Weisberger et al., *Biomedical Mass Spectrometry*, Vol. 10 (10), 556-558, 1983

S.G. Wood and L.F. Chasseaud, *Journal of Chromatography Biomedical Applications*, Vol. 416, 154-159, 1987

I. Yamamoto and K. Iwata, *Journal of Immunoassay*, Vol. 3 (2), 155-171, 1982

A. Zimmer, *Arzneimittelforschung*, Vol. 26(7a), 1442-1445