Methode zur quantitativen Bestimmung von Gentamicin in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC und Nachsäulenderivatisation = Method for the quantitative determination of gentamicin in meat, liver and kidney by HPLC and post-column derivatization

Autor(en): **Guggisberg, Dominik / Koch, Herbert**

Objekttyp: **Article**

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

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

Heft 1

PDF erstellt am: **25.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-983620

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

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

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **86,** 14–28 (1995)
Eingegangen 28. November 1994. Angenommen 4. Januar 1995

Methode zur quantitativen Bestimmung von Gentamicin in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC und Nachsäulenderivatisation

Method for the Quantitative Determination of Gentamicin in Meat, Liver and Kidney by HPLC and Post-column Derivatization

Key words: Gentamicin, Meat, Kidney, Liver, Post-column derivatization, Fluorescence detection

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

Einleitung

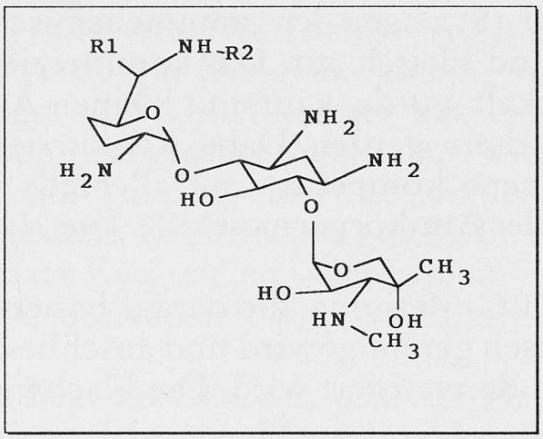
Gentamicin gehört in die Familie der Aminoglycosid-Breitband-Antibiotika, wirkt gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und wird sowohl in der Human- sowie in der Veterinärmedizin häufig eingesetzt. Als Nebenwirkungen sind allerdings Ohren- und Nierenschädigungen bekannt, so auch die Tatsache, dass Gentamicin lange in der Niere persistieren kann.

Das native, aus Kulturlösungen von *Mikromonospora purpurea*-Arten isolierte Gentamicin ist ein Gemisch von 16 ähnlichen Aminoglycosiden, wobei in der Regel die vier Gentamicine C_1, C_2, C_{1a} und C_{2a} pharmazeutisch eingesetzt werden (Abb. 1).

Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Gentamicine kann je nach «Batch» variieren. Von Gentamicin C_1 leiten sich strukturell das native Sisomicin sowie das semisynthetische Netilmicin, zwei weitere bekannte Aminoglycoside, ab.

Gentamicin (Handelsnamen: Gentagen, Gentavit, Gentodiar, Tarigent, Vetagent usw.) mit seinem breiten Wirkungsspektrum als Antibiotika und seiner hervorragenden Stabilität ist in der Veterinärmedizin sowohl in der Therapie als auch in der Prophylaxe stark verbreitet.

Rückstände dieses Arzneimittels in der Milch und im Fleisch können für den Konsumenten eine potentielle gesundheitliche Gefahr darstellen (Resistenzbildung).



C_1: R1=R2=CH_3

C_2: R1=CH_3, R2=H

C_{1a}: R1=R2=H

C_{2a}: R1=CH_3, R2=H

Abb. 1. Chemische Struktur von Gentamicin (typisches Gemisch enthält gemäss (14) die 4 Hauptkomponenten in folgenden Konzentrationen C_1 = 22%, C_2 = 16%, C_{1a} = 30%, C_{2a} = 32%)

Generelle Wartezeiten sind wie folgt vorgeschrieben:

Milch: 3 Tage / Fleisch, Leber: 5 Tage / Niere, Injektionsstelle: 45 Tage

In der Schweiz wurden mit der Weisung vom Bundesamt für Gesundheitswesen am 25. Juli 1990 für sämtliche Antibiotika, für welche nicht bereits Höchstkonzentrationen bezeichnet wurden, Toleranz- bzw. Grenzwerte festgelegt. Für Gentamicinrückstände im Fleisch wurden bis heute vorwiegend mikrobielle Tests herangezogen:

- für den Toleranzwert gilt der EG-4-Plattentest: Hemmzone 2 mm auf einer der 4 Platten
- für den Grenzwert gilt der B-subtilis-Test: Hemmzone 4 mm bei pH = 6[1].

Neuerdings werden aber auch weit empfindlichere Tests für Gentamicin empfohlen, die sich auf immunchemische Reaktionen oder auf HPLC-Methoden stützen.

Damit eine möglichst grosse Anzahl von tierischen Gewebeproben auf Gentamicinrückstände in Fleisch und Innereien überprüfbar ist, benötigten wir eine HPLC-Analysenmethode mit genügender Empfindlichkeit und hohem Durchsatz.

Gentamicin ist eine relativ polare Substanz, die aufgrund der Struktur recht thermostabil ist. Gentamicin selber besitzt keinen UV-aktiven Chromophor oberhalb 200 nm, deshalb muss es zwingend zwecks Nachweis im UV- oder Fluoreszenzdetektor vorsäulen- oder nachsäulenderivatisiert werden.

Bisher sind viele Arbeiten erschienen, die aufzeigen, wie Gentamicin in Serum/Plasma (1–10), Milch (11–14) und in Urin (1, 2) bestimmt werden kann. Für den Nachweis von Gentamicin in Fleisch und Innereien sind ebenfalls einige Publikationen erschienen (15–19).

Saikh und *Allen* (15) geben einen Überblick, wie Aminoglycoside grundsätzlich aus Fleisch und Flüssigkeiten von Schlachttieren nachgewiesen werden können.

[1] Wie eine kleine Studie mit Gentamicin-Standardlösungen zeigte, liegt die Nachweisgrenze des EG-4-Plattentests für Gentamicin bei ungefähr 300 ppb.

Brown et al. (16) und *Vlietstra* et al. (8) zeigen den immunchemischen Nachweis von Gentamicin aus Milch, Serum und Fleisch auf. Das kommerzielle Verfahren, das primär für Humanserum entwickelt wurde, kann mit kleinen Änderungen als Screening-Methode[2] für Fleisch erweitert werden. Dabei konkurrieren mit einem Fluoreszenzmarker versehene Antigene kompetitiv mit allenfalls vorhandenem Gentamicin um die Bindungsstellen der Antikörpermoleküle. Die Nachweisgrenze wird mit ca. 50 ppb angegeben.

Agarwal (18) beschreibt eine HPLC-Methode, die darauf basiert, dass Gentamicin aus Fleisch durch Ionenaustausch gereinigt wird und anschliessend auf einer Silicagelsäule mit o-Phthaldialdehyd derivatisiert wird. Die Nachweisgrenze liegt bei 200 ppb.

Sar et al. (19) haben kürzlich eine HPLC-Methode vorgestellt, bei der Gentamicin aus Fleisch ebenfalls durch Ionenaustausch extrahiert und anschliessend nach der Trennung durch Ionenpaarchromatographie mit o-Phthaldialdehyd nachsäulenderivatisiert wird. Die Nachweisgrenze liegt bei 50–100 ppb.

Wir berichten in der folgenden Arbeit von einer HPLC-Analysenmethode für Gentamicin in Fleisch, Leber und Niere vom Grossvieh, Rind, Kalb und vom Schwein. Es geht in der Methode darum, Gentamicin mittels Ionenaustausch auf einer SCX-SPEC-Disk möglichst rein und quantitativ anzureichern, um es dann mit Ionenpaarchromatographie möglichst vollständig von der Fleisch-Matrix abzutrennen und durch Nachsäulenderivatisation sehr selektiv nachzuweisen. Dabei wird die Chromatographie so gewählt, dass die vier Gentamicine C_1, C_2, C_{1a} und C_{2a} zusammen in einem Doppelpeak eluieren (Abb. 2).

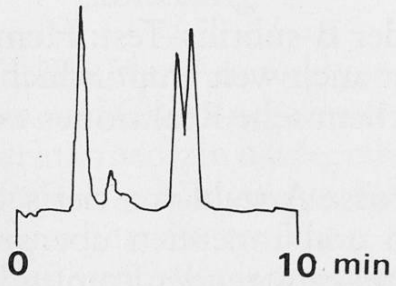


Abb. 2. Gentamicin Standard als Doppelpeak. Chromatographische Bedingungen siehe Text

Kurzbeschreibung der Methode

Rinds-, Kalbs- und Schweinefleisch

Die Probe (5 g) wird homogenisiert, mit wässeriger Trichloressigsäurelösung (20 ml) mit Polytron behandelt und bei 4000 U/min (ca. 2900 g) zentrifugiert. Der Überstand wird mit 30% NaOH auf pH = 6,2 ± 0,3 justiert (ca. 18 Tropfen aus einer

[2] Unveröffentlichte Resultate.

Pasteurpipette) und mit Dikaliumhydrogenphosphat/Natriumphosphat (pH = 6,2) auf 40 ml verdünnt. Die gelbe Lösung wird bei 18 000 U/min (ca. 37 000 g) ultrazentrifugiert und anschliessend auf eine konditionierte SCX-SPEC-Disk (schwacher Kationentauscher) appliziert. Gentamicin wird direkt mittels einer Natriumhydroxidlösung in ein Autosampler-Vial eluiert und mit Salzsäure auf einen pH < 7 gestellt. Die Analyse geschieht an einer Spezialsäule (Nucleosil AB) mittels Ionenpaar-Reagenzien. Gentamicin wird nach der Analyse mittels o-Phthaldialdehyd derivatisiert und im Fluoreszenzdetektor bei 340 nm, 440 nm nachgewiesen.

Gentamicin liegt als Gemisch von vier Hauptkomponenten und zwei Nebenkomponenten vor. Die vier Hauptkomponenten werden als zwei naheliegende «Peaks» detektiert (Abb. 2). Wir gehen bei der Auswertung vom Total der beiden «Peakflächen» aus. Die Auswertung der Resultate erfolgt über externen Standard.

Bestätigungsmethoden

Wir beschränken uns dabei auf die Nachweismethode von Gentamicin und erwähnen gleichzeitig, dass völlig unabhängige Bestätigungsmethoden für Gentamicin mit GC oder GC-MS der geringen Flüchtigkeit wegen bisher nicht beschrieben wurden. Es ist aber durchaus denkbar und sinnvoll, die hier vorliegende Arbeit auch als Bestätigungsmethode nach dem immunchemischen Screening (8, 16) zu verwenden.

Material und Methode

Standardsubstanz, Standardlösungen

Gentamicinsulfat (Gehalt: > 99%)
Lieferant der Substanz: Fluka, 9470 Buchs

Herstellung der Stammlösung und der Verdünnungslösungen

Gentamicin-Stammlösung	12,5 mg Gentamicinsulfat (99%) werden mit 10^{-3}M EDTA zu 10 ml gelöst (1 µg Gentamicin/µl)
Standard I	100 µl der Stammlösung werden mit 10^{-3}M EDTA auf 10 ml aufgefüllt (10 ng Gentamicin/µl)
Standard II	1 ml des Standards I wird mit 10^{-3}M EDTA auf 10 ml aufgefüllt (1 ng Gentamicin/µl)
Standard III	100 µl des Standards I werden mit 10^{-3}M EDTA auf 10 ml aufgefüllt (100 pg Gentamicin/µl)

Chemikalien für das Clean up

- Wasser, Milli-Q (Millipore-Waters), am Wasserstrahlvakuum 15 min mit Ultraschall entgast und mit Stickstoff gesättigt
- Trichloressigsäure (Merck z. A.): 5% gelöst in 0,001 mol/l EDTA
- K_2HPO_4 (Merck z. A.)
- Na_2SO_4 (Merck z. A.)
- EDTA (Titriplex III, Merck z. A.)
- Natriumhydroxid (Merck z. A.)
- Salzsäure (0,01 mol/l): 0,1 mol/l Salzsäure Titrisol Merck 9973 mit Wasser (Milli Q) 1:10 verdünnen
- Pufferlösung A: 0,1 Mol K_2HPO_4 und 0,1 Mol Na_2SO_4 in 1 Liter Wasser lösen und mit HCl auf pH = 6,2 justieren

Reagenzien für HPLC

- Acetonitril (Chromasolv)
- d,l-Campher-10-sulfonat (Aldrich 97–98%)
- EDTA (Titriplex III Merck z. A.)
- Salzsäure (1 M): Titrisol Merck 9970

Mobile Phase

A:B = 22–23%: 78–77%
A: Acetonitril
B: 0,05 mol/l d,l-Campher-10-sulfonat in 10^{-4} mol/l EDTA, mit Salzsäure auf pH = 2,2 eingestellt.
(Anmerkung: Der pH-Wert und das Verhältnis A:B wirken sich sehr stark auf die Retentionszeit aus und müssen daher auf das HPLC-System abgestimmt sein.)

Reagenzien für Nachsäulenderivatisierung

- o-Phthaldialdehyd (OPA, Merck, > 99%) (Anmerkung: OPA ist sehr oxidationsempfindlich, deshalb ist es stets in sauerstofffreiem Wasser zu lösen.)
- Borsäure H_3BO_3 (Merck z. A.)
- Natriumhydroxid (Merck z. A.)
- 95% Ethanol (Merck z. A.)
- 2-Mercaptoethanol (Merck z. A.)
- Brij 35 (Fluka-Nr.: 16005)

Herstellung der Lösungen A, B und C für die Nachsäulenderivatisation

Lösung A (die Lösung ist zu filtrieren)
- 1,50 g H_3BO_3

- 2,7 ml 30% NaOH
- 73,0 ml Wasser (Stickstoff gesättigt)

Lösung B (die Lösung ist zu filtrieren und im Eisbad während der ganzen Chromatographiezeit zu kühlen)
- 60 mg OPA
- 5 ml Ethanol (mittels Rühren und Ultraschall zur Lösung bringen)
- 70 ml Wasser (Stickstoff gesättigt)

Lösung C
- 0,15 ml 2-Mercaptoethanol
- 0,3 ml 30% Brij 35
- 75,0 ml Wasser (Stickstoff gesättigt)

Weglängen vom Splitter bis zum nächsten Splitter bzw. bis zum Fluoreszenz-Detektor

- A–B: 27 cm (Ø 0,25mm)
- B–C: 200 cm (Ø 0,25 mm)
- C-Detektor: 300 cm (Ø 0,25 mm)

Geräte und Hilfsmittel

- Probenzerkleinerungsgerät (Moulinex)
- Homogenisiergerät (Polytron) mit 12-mm-Mixstab
- Analysenwaage (0,1 mg, Mettler), Laborschnellwaage
- Polycarbonat-Zentrifugenglas 60 ml
- Zentrifuge (Hettich, Rotanta bis 4000 U/min)
- Ultrazentrifuge (Heraeus bis 18000 U/min)
- Magnetrührer mit Magnetrührstäbchen
- Ultraschallbad, gross
- SCX-SPEC-Disk, 3 ml (Spectronex Art.-Nr. 531-04-20)
- Vakuumeinheit (Alltech)
- 250-µl-Spritze (Hamilton)
- 125-µl-Spritze (Hamilton)
- 20-µl-Spritze (Hamilton)
- 1500-µl-Micro-Vials (HP)
- HPLC 600 E (Waters)
- Reaktionspumpe Hitachi 655A-13
- Autosampler (Gilson 231-401)
- Kontron SFM-23 Fluoreszenzdetektor
- Auswertestation Baseline (Waters)
- Wasserstrahlvakuum

Probenaufbereitung

Extraktion der Probe

(Rindsleber, Rindsniere, Kalbsleber, Kalbsniere, Schweineleber und Schweineniere)

Die Probe wird aufgetaut und mit der Moulinette zu einem feinen Brät bzw. Brei zerhackt, nachdem das sichtbare Fett weggeschnitten wurde. 5,0 g der Probe werden in ein Zentrifugenglas eingewogen und mit 20 ml Trichloressigsäurelösung (5% Trichloressigsäure in Wasser mit 0,001 mol/l EDTA) mit Polytron behandelt. Es wird 15 min bei 4000 U/min (ca. 2900 g) und 18 °C zentrifugiert.

Die klare gelbe Lösung wird dekantiert, mit 30% NaOH-Lösung auf pH = 6,2 ± 0,3 justiert und das Volumen mit der Pufferlösung A auf 40 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird bei 18 000 U/min ultrazentrifugiert (10 min, 18 °C).

Reinigung der Probe

Eine SCX-SPEC-Disk wird mit 2 ml Pufferlösung A konditioniert. Langsam lässt man die 40 ml Probelösung durchlaufen (leichtes Vakuum ist evtl. nötig). Nachgewaschen wird mit 1 ml Wasser. Die Disk wird trocken gesaugt (2 min mit Vakuum). Gentamicin wird mit 350 µl 0,05 mol/l NaOH-Lösung direkt in ein Autosampler-Vial eluiert. Die basische Lösung wird mit 75 µl 1 mol/l Salzsäure sauer gestellt. Die Lösung (425 µl) wird gut gemischt, davon werden 20 µl direkt in das HPLC-System injiziert.

Analyse mit HPLC: Bedingungen, Vorgehen und Auswertung

Apparatur	Waters 600 E
Mobile Phase	A: 22–23% Acetonitril
	B: 78–77% (0,05 mol/l) d,l-Campher-10-sulfonatpuffer pH = 2,2
Vorsäule	Nucleosil 5-C18-AB (5 µm)
Stationäre Phase	Nucleosil 5-C18-AB (5 µm) 125 mm x 3 mm x 5 µm
Fluss	0,6 ml/min
Ofentemperatur	45 °C
Einspritzvolumen	20 µl
Elutionsdauer	5–7 min

Nachsäulenderivatisation mittels Merck-Hitachi 655A-13, Flow 0,15[3], der Reaktionsweg 3 (300 cm) ist auf 43 °C thermostatisiert.

Fluoreszenz-Detektor	SFM-23 Kontron (340 nm EX., 440 nm EM.)
	Sensitivity 6,0, medium
Auswertestation	Baseline Millipore Waters

[3] Ein Flow von 0,15 entspricht 0,25 ml/min als Gesamtmenge der Lösungen A, B und C.

Validierung der Methode

Schweineleber (5 g) wurde je in fünffacher Ausführung mit 50 µl und 100 µl der Standardlösung I (entsprechend 100 ppb und 200 ppb) dotiert. Ebenso wurde ein Ansatz mit undotierter Schweineleber analysiert. Siehe dazu Abbildungen 3–5.

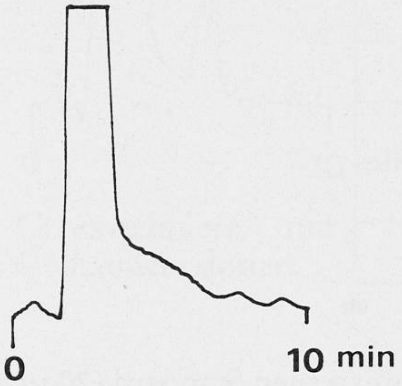


Abb. 3. Schweineleber nicht behandelt

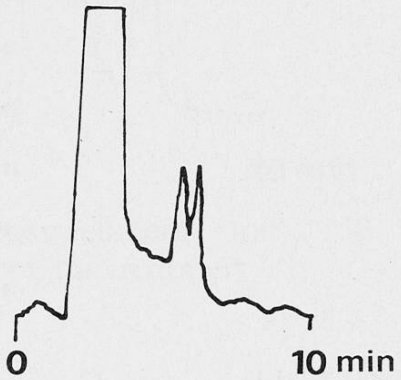


Abb. 4. Schweineleber mit 100 ppb Gentamicin dotiert

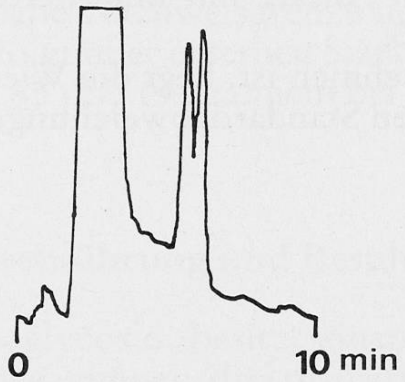


Abb. 5. Schweineleber mit 200 ppb Gentamicin dotiert

Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, liegt die Wiederfindung zwischen 90 und 92%. Dabei sind die relativen Standardabweichungen unterhalb 10%.

Aus der Abbildung 6 geht die Linearität der Standards hervor. Die Methode wurde auch für Kalbs- und Rindslebern erprobt.

Grossviehnieren (5 g) wurden je in vier- bzw. fünffacher Ausführung mit 25 µl, 50 µl und 75 µl der Standardlösung I (entsprechend 50 ppb, 100 ppb und 150 ppb)

Tabelle 1. Wiederfindungen bei dotierten Schweinelebern

Schweineleber: dotierter Gehalt (ppb)	Anzahl	Mittelwert (ppb)	Standard-abweichung (ppb)	Relative Standard-abweichung (%)	Mittlere Wiederfindung (%)
100 ppb	5	89,9	7,45	8,3	90
200 ppb	5	184,7	15,05	8,2	92

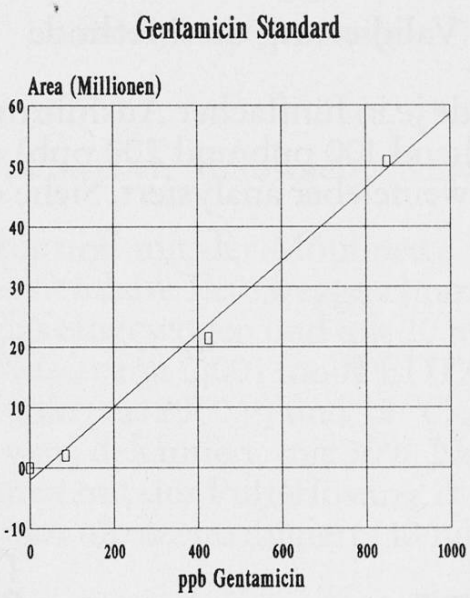


Abb. 6. Eichkurve von Gentamicin zur Auswertung über externen Standard (20 µl x 1 ng/µl Standard II entsprechen 85 ppb Gentamicin)

dotiert. Ebenso wurde je ein Ansatz mit undotierter Grossviehniere analysiert. Siehe dazu Abbildungen 7–10.

Wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, liegt die Wiederfindung für Nieren ebenfalls um die 90%. Die relativen Standardabweichungen im Bereich von 50 ppb bis 150 ppb sind grösser.

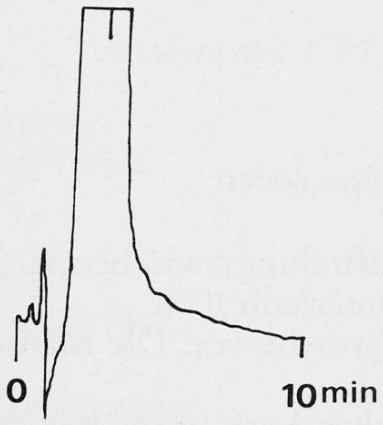


Abb. 7. Grossviehniere eines nicht behandelten Tieres

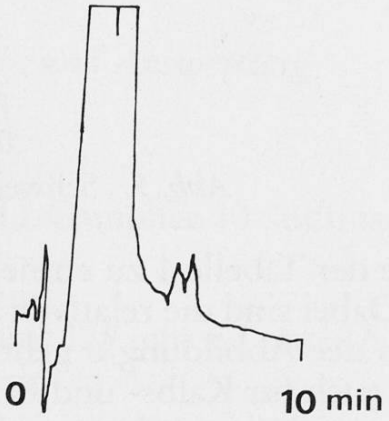


Abb. 8. Grossviehniere mit 50 ppb Gentamicin dotiert

Tabelle 2. Wiederfindungen bei dotierten Grossviehnieren

Grossviehniere: dotierter Gehalt (ppb)	Anzahl	Mittelwert (ppb)	Standard-abweichung (ppb)	Relative Standard-abweichung (%)	Mittlere Wiederfindung (%)
50 ppb	4	49,1	5,4	10,9	98
100 ppb	5	95	15,9	16,6	95
150 ppb	5	138	19,1	13,8	92

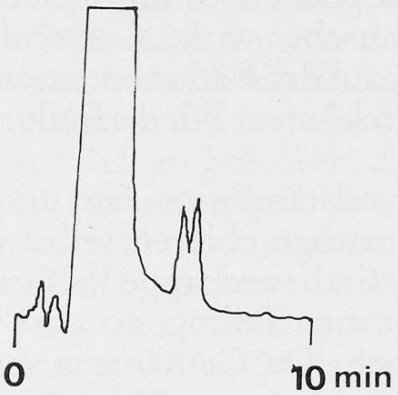


Abb. 9. Grossviehniere mit 100 ppb Gentamicin dotiert

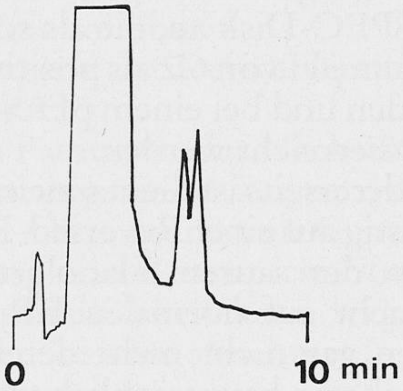


Abb. 10. Grossviehniere mit 150 ppb Gentamicin dotiert

Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze/Auswertung

Die probenbezogene Bestimmungsgrenze für Gentamicin in Leber und Niere liegt bei 50 ppb. Die analytische Nachweisgrenze liegt bei 5 ng Gentamicin. Die Auswertung der Resultate erfolgt über externen Standard. Dabei entsprechen 20 µl x 1 ng/µl (Standard II) genau 85 ppb Gentamicin bei 100% Wiederfindung[4].

Durchführung und Resultate

Gentamicin ist ein Aminoglycosid, besitzt einen pK_S von 8,2 und ist wegen seiner Struktur (drei Hydroxy-Gruppen, drei primäre und zwei sekundäre Amine) relativ polar.

Damit sich Gentamicin nach der Extraktion mit Trichloressigsäure nicht mit den gefällten und denaturierten Proteinen niederschlägt, wird EDTA zugemischt, das Gentamicin komplexieren soll (19). Die Reinigung auf kommerziell erhältlichen Säulen (solid-phase extraction) ergeben Wiederfindungen von 55–81%, wie *Sar* et al. (19) mitteilen. Durch die starke Polarität ist Gentamicin nur in folgenden organischen Lösungsmitteln neben Wasser gut löslich: Pyridin und Dimethylformamid. Die Reinigung und Konzentration von Gentamicin (aus einem Fleischextrakt) in einem organischen Lösungsmittel ist demnach nicht möglich.

Es wurde deshalb ein «Clean up» entwickelt, bei dem Gentamicin auf einer Kationenaustauscher-Disk angereichert wird, um anschliessend mit möglichst we-

[4] Umrechnung: 85 ppb entsprechen 85 ng Gentamicin pro Gramm Fleisch oder 425 ng Gentamicin pro 5 Gramm Fleisch. Dies entspricht nach der Aufarbeitung von 5 Gramm Fleisch einer gesamten Flüssigkeitsmenge von 425 µl. Davon werden 20 µl direkt ins HPLC-System eingespritzt.

nig wässeriger Lösung eluiert zu werden. Als mögliche Lösung bietet sich die SCX-SPEC-Disk an, die als schwacher Kationentauscher wirkt. Gentamicin wird bei einem pH von 6,2 als positiv geladenes Teilchen auf der Kationentauscher-Säule gebunden und bei einem pH >10,2 eluiert. Dadurch können Wiederfindungen von ca. 90% erreicht werden.

Andererseits ist Gentamicin bereits ab pH <6,5 vollständig ionisiert und deshalb ungünstig auf einer Reversed-Phase-Säule zu chromatographieren, selbst wenn die meisten der sauren Silanolgruppen abgeschirmt sind (endcapped). Gentamicin verursacht auf normalen RP-C_{18}-Säulen ein enormes Tailing, so dass kleinere Mengen gar nicht mehr detektiert werden können. Da Gentamicin aus einem Gemisch von hauptsächlich vier Hauptkomponenten und zwei Nebenkomponenten besteht, muss die Chromatographie so gewählt werden, dass möglichst viele der Komponenten zusammenfallen, um eine möglichst tiefe Nachweisgrenze zu gewährleisten.

Zudem weist Gentamicin oberhalb 200 nm keine Absorption auf und muss deshalb zwingend vorsäulen- oder nachsäulenderivatisiert werden. Eine bedeutend höhere Selektivität kann durch die Nachsäulenderivatisation gegenüber der Vorsäulenderivatisation mittels OPA erreicht werden. Einmal mit OPA derivatisiertes Gentamicin ist im Fluoreszenzdetektor bei 340 nm (EX.) und 440 nm (EM.) nachweisbar.

Aus mehreren möglichen Spezialsäulen und Ionenpaar-Reagenzien wurde folgendes System als leistungsfähigstes ausgewählt:

- Verwendung der Spezialsäule Nucleosil AB mit polymermodifiziertem C_{18}-Material
- d,l-Campher-10-sulfonatpuffer (pH = 2,2) als mobile Phase
- Nachsäulenderivatisation von Gentamicin mittels OPA.

Dabei ist festzuhalten, dass die vier Hauptkomponenten von Gentamicin in zwei etwa gleich grossen «Peaks» detektiert werden. Die Addition der beiden «Peakflächen» wird mit dem Gentamicin-Standard nach der Methode des externen Standards verglichen, um daraus die Gentamicinmenge der Probe zu berechnen.

Nach der Auftrennung des Fleischextraktes in einzelne Komponenten auf der analytischen Säule wird der Eluent zur Reaktionspumpe geführt. Von der Reaktionspumpe aus werden die drei Lösungen A, B und C über je ein T-Stück zum Eluenten gemischt, wobei der Reaktionsweg der Lösung (A) 27 cm, der Lösung (B) 200 cm und der Lösung (C) 300 cm betragen soll. Der 300 cm lange Reaktionsweg wird in einem konstant gehaltenen Wasserbad bei 43 °C erwärmt. Die Lösungen A, B und C müssen vor Gebrauch mit sauerstofffreiem Wasser zubereitet werden. Die Lösungen A und B sind zusätzlich zu filtrieren, B ist mittels einem Eisbad zu kühlen.

Die Lösung A stellt den Eluenten basisch (pH >10), die Lösungen B und C derivatisieren alle primären Amine in einer Dreikomponentenreaktion zu einem intensiv fluoreszierenden Produkt (20). Dabei reagiert zuerst die Aldehydgruppe von OPA mit dem nukleophilen Mercaptoethanol zum O,S-Halbacetal. Das nachzuweisende Gentamicin kondensiert mit der verbliebenen Aldehydgruppe von OPA zum Azomethin. Nach der Wasserabspaltung resultiert das Carbokation, das

den Iminstickstoff intramolekular angreift und das Isoindol-Kation erzeugt. Dieses geht nach Deprotonierung in das fluoreszierende Isoindol über.

(Flurescamin ist ebenfalls ein sehr geeignetes Reagenz zur Derivatisierung von primären Aminen (2), ist jedoch 26mal teurer als OPA.)

Es ist speziell zu beachten, dass die angegebenen Parameter der Nachsäulenderivatisation strikte eingehalten werden. Die Chromatogramme zeigen die hohe Selektivität im Fluoreszenzbereich und die saubere Abtrennung von Gentamicin gegenüber der Fleischmatrix. Wichtig ist die Analyse von Gentamicin-Standards vor und nach der Messung von Proben. Die Empfindlichkeit kann wegen der Instabilität von OPA (Oxidation) im Laufe mehrerer Stunden abnehmen!

Das Resultat einer Übersichtsuntersuchung

Muskel, Niere und Leber von verschiedenen Tieren (Grossvieh, Rind, Kalb, Schwein) wurden mittels immunchemischem Screening gemäss Lit. (8) auf Gentamicin getestet. Positive Proben mit weniger als 50 ppb Gentamicin gelten als möglich, sind aber nicht gesichert und wurden nicht mit HPLC bestätigt (Bestimmungsgrenze ca. 50 ppb). Positive Proben mit mehr als 50 ppb Gentamicin wurden mit der vorliegenden Methode erfolgreich bestätigt (Abb. 11–13).

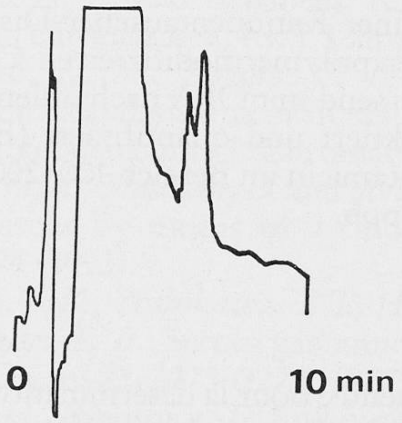


Abb. 11. Positive Schlachthofprobe (Schweineleber ca. 100 ppb Gentamicin)

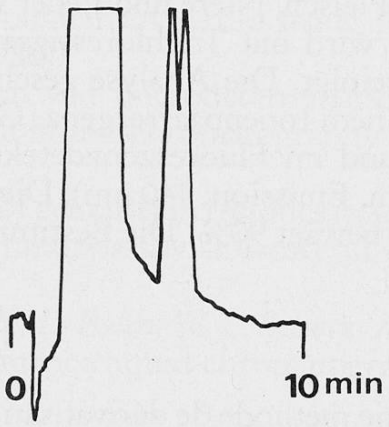


Abb. 12. Positive Schlachthofprobe (Grossviehniere ca. 250 ppb Gentamicin)

Es wird zurzeit noch geprüft, ob die Methode durch Anreicherung auf einer HPLC-Vorsäule automatisiert und durch weitere Aminoglycoside (wie Neomycin) erweitert werden kann.

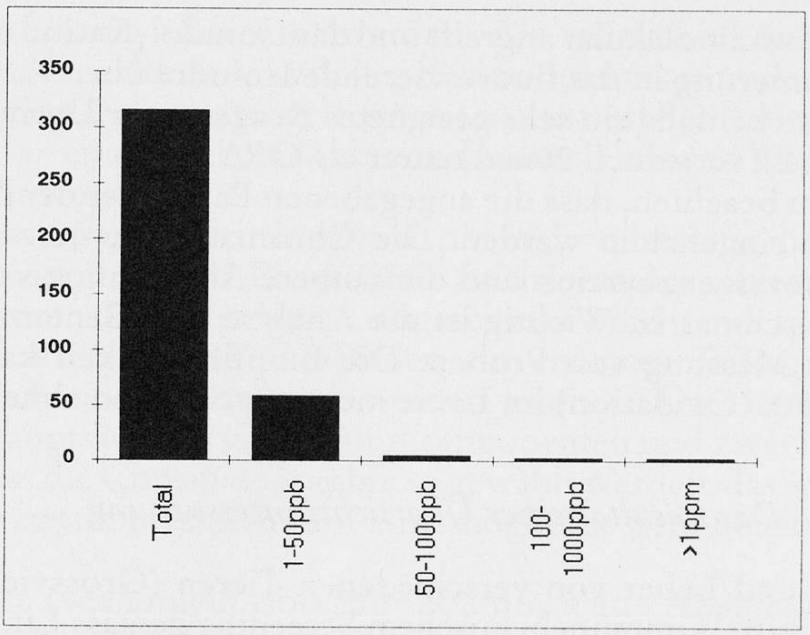


Abb. 13. Übersichtsuntersuchung August–Oktober 1994 (Werte kleiner als 50 ppb sind nicht abgesichert)

Zusammenfassung

Eine Nachsäulenderivatisations-Methode zur quantitativen Bestimmung von Gentamicin in Fleisch, Niere und Leber von Schweinen, Rindern und Kälbern wird beschrieben. Die Probe wird mit Trichloressigsäure extrahiert und an einer Kationentauscher-Disk (SCX) aufgereinigt. Die Analyse geschieht mit HPLC an einer polymermodifizierten C-18-Säule und einem Ionenpaarreagenz. Gentamicin wird anschliessend mit OPA nachsäulenderivatisiert und im Fluoreszenzdetektor hochspezifisch detektiert und quantifiziert (Exitation: 340 nm, Emission: 440 nm). Die Wiederfindung für Gentamicin im Bereich 100–200 ppb für Leber beträgt 90%. Die Bestimmungsgrenze beträgt 50 ppb.

Résumé

Une méthode de dérivatisation post-colonne est présentée pour la détermination quantitative des résidus de gentamicine dans le muscle, le foie et le rein de porcs et de boeufs. L'échantillon est extrait avec de l'acide et purifié sur une disque (SCX).

La gentamicine est séparée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse avec une colonne spéciale modifiée. Une dérivatisation post-colonne permet une détection à haute spécificité dans le domaine de la fluorescence (excitation: 340 nm, émission: 440 nm). Le taux de récupération dans le foie est de 90%.

Summary

A method based on post-column-derivatization is presented for the quantitative determination of gentamicin residues in muscle, liver and kidney of pork beef and calf. The sample

is extracted with trichloroacetic acid and further clean up is achieved by a solid-phase extraction on a SCX-disc.

Gentamicin is separated on a C_{18}-polymer modified reversed-phase column. The derivative of gentamicin is highly specifically detected and quantified after post-column derivatization by fluorescence detection (exitation: 340 nm, emission: 440 nm). Recovery in liver: 90%.

Literatur

1. *D'Souza, J.* and *Ogilvie, R. I.:* Determination of gentamicin components C_{1a}, C_2 and C_1 in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **232,** 212–218 (1982).
2. *Walker, S. E.* and *Coates, P. E.:* High-performance liquid chromatographic method for determination of gentamicin in biological fluids. J. Chromatogr. **223,** 131–138 (1981).
3. *Essers, L.:* An automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of aminoglycosides in serum using pre-column sample clean-up and derivatization. J. Chromatogr. **305,** 345–352 (1984).
4. *Peng, G. W., Gadalla, M. A. F., Peng, A., Smith, V.* and *Chiou, W. L.:* High-pressure liquid-chromatographic method for determination of gentamicin in plasma. Clin. Chem. **23,** 1838–1844 (1977).
5. *Bäck, S. E., Nilsson-Ehle, I.* and *Nilsson-Ehle, P.:* Chemical assay, involving liquid chromatography, for aminoglycoside antibiotics in serum. Clin. Chem. **25,** 1222–1225 (1979).
6. *Larsen, N. E.* and *Marinelli, K.:* Determination of gentamicin in serum using liquid column chromatography. J. Chromatogr. **221,** 182–187 (1980).
7. *Barends, D. M., Zwaan, C. L.* and *Hulshoff, A.:* Improved microdetermination of gentamicin and sisomicin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J. Chromatogr. **222,** 316–323 (1981).
8. *Vlietstra, A., Masman, D.* and *Steijger, O.:* Quantification of gentamicin residues in serum and tissues by means of a fluorescence polarization immunoassay. EuroResidue II, 670–674 (1993).
9. *Maitra, S. K., Yoshikawa, T. T., Hansen, J. L., Nilsson-Ehle, I., Palin, W. J., Schotz, M. C.* and *Guze, L. B.:* Serum gentamicin assay by high-performance liquid chromatography. Clin. Chem. **23,** 2275–2278 (1977).
10. *Kubo, H., Kinoshita, T., Kobayashi, Y.* and *Tokunaga, K.:* Micro determination of gentamicin in serum by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **227,** 244–248 (1982).
11. *Suhren, G.* und *Heeschen, W.:* Entwicklungen zum Antibiotika-Nachweis in Milch. Dtsch. Molkerei-Ztg. **108,** 1566–1570 (1987).
12. *Seymour, E. H., Jones, G. M.* and *McGilliard, M. L.:* Persistence of residues in milk following antibiotic treatment of dairy cattle. J. Dairy Sci. **71,** 2292–2296 (1988).
13. *Agarwal, V. G.:* High performance liquid chromatographic determination of gentamicin in milk. J. Liquid Chromatogr. **12,** 3265–3277 (1989).
14. *Ng, K., Rice, P. D.* and *Bobbitt, D. R.:* Identification and quantitation of gentamicin in milk using hplc separation and laser-based polarimetric detection. Microchem. J. **44,** 25–33 (1991).

15. *Shaikh, B.* and *Allen, E. H.:* Overview of physical-chemical methods for determining aminoglycoside antibiotics in tissues and fluids of food-producing animals. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68,** 1007–1013 (1985).
16. *Brown, S. A., Newkirk, D. R., Hunter, R. P., Smith, G. G.* and *Sugimoto, K.:* Extraction methods for quantitation of gentamicin residues from tissues using fluorescence polarization immunoassay. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **73,** 479–483 (1990).
17. *Kondo, F.* and *Hayashi, S.:* Improved method for the determination of residual aminoglycoside antibiotics in animal tissues by electrophoresis and bioautography. J. Food Protect. **52,** 96–99 (1989).
18. *Agarwal, V. K.:* High performance liquid chromatographic determination of gentamycin in animal tissue. J. Liquid Chromatogr. **12,** 613–628 (1989).
19. *Sar, F., Leroy, P., Nicolas, A.* and *Archimbault, P.:* Development and optimization of a liquid chromatographic method for the determination of gentamicin in calf tissues. Anal. Chim. Acta **275,** 285–293 (1993).
20. *Roth, H. J., Eger, K.* und *Troschütz, R.:* Arzneistoffanalyse, Pharmazeutische Chemie II, 3. neubearbeitete Auflage, Seiten 201–202. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1990.

Dr. Dominik Guggisberg
Bundesamt für Veterinärwesen
Sektion Chemie
Schwarzenburgstrasse 161
CH-3097 Liebefeld-Bern