

Rückstandsanalytik von Nitrofuranderivaten und deren Cyanometaboliten in Schweinefleisch = Determination of nitrofuran derivatives and cyano-metabolites in swine tissues

Autor(en): **Schmid, P. / Mooser, A.E. / Koch, H.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **81 (1990)**

Heft 4

PDF erstellt am: **08.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982621>

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.

Rückstandsanalytik von Nitrofuranderivaten und deren Cyanometaboliten in Schweinefleisch

Determination of Nitrofuran Derivatives and Cyano-Metabolites in Swine Tissues

*P. Schmid**, *A. E. Mooser* und *H. Koch*
Bundesamt für Veterinärwesen (BVET), Liebefeld-Bern

Einleitung

Die Nitrofurane bilden eine Gruppe von Wirkstoffen zur Behandlung und Prophylaxe bakterieller, protozoärer und mykotischer Erkrankungen. Die Wirkungsweise ist bei geringer Dosierung bakteriostatisch, bei höherer Dosis bakterizid (1–4). Das Wirkspektrum umfasst eine Vielzahl grampositiver und gramnegativer Keime sowie Protozoen und einige pathogene Pilze.

Nach der Entdeckung der antimikrobiellen Wirkung durch *Dodd* und *Stillmann* (5) im Jahre 1944 waren die Nitrofurane als Chemotherapeutika in der Human- und Veterinärmedizin sowie als Konservierungsmittel weit verbreitet. Heute wird von den Nitrofuranderivaten wegen der verschiedenen toxischen Nebenwirkungen und des Verdachts auf Mutagenität und Kanzerogenität in der Humanmedizin nur noch Nitrofurantoin therapeutisch eingesetzt, während bei der Interkantonalen Kontrollstelle für Heilmittel (IKS) veterinärmedizinische Präparate mit Nitrofurazon-, Furazolidon- und Nitrofurantoin-Zusatz registriert sind. Vor allem Furazolidon wird zudem auch heute noch als Wachstumsförderer in der modernen Massenaufzucht von Nutztieren eingesetzt.

Die weitverbreitete Anwendung der Nitrofurane führte zu Vorschriften über Futtermittelzusätze und Rückstände in Lebensmitteln. Die Eidgenössische Forschungsanstalt für viehwirtschaftliche Produktion führte 1985 eine Liste der in der Tierernährung bewilligten antimikrobiellen Wachstumsförderer Kokzidiostatika und Probiotika ein. Seither gelten für Furazolidon folgende Maximalgehalte: für Ferkel und Mastschweine bis 60 kg Lebendgewicht: 100 mg pro kg Futtermittel, für Kälber bis 100 kg Lebendgewicht: 75 mg pro kg Futtermittel. Das Eidgenössische Departement des Innern erliess in der Verordnung über Fremd- und Inhaltsstoffe (Fremd- und Inhaltsstoffverordnung, FIV) (6) vom 27. Februar 1986 einen Grenzwert für Nitrofurane in Eiern, Fleisch und Milch von 0,001 mg/kg (1 ppb). Dieser Grenzwert wurde am 1. Januar 1987 in Kraft gesetzt.

* Teil der Dissertation von P. Schmid

In der EG ist die Anwendung von Furazolidon als Wachstumsförderer mit Übergangsfrist verboten. Für die übrigen Nitrofurane gilt ein Grenzwert von 1–2 ppb in essbarem tierischem Gewebe.

In den USA wird von der FDA seit 1980 in ungekochtem Schweinefleisch für Furazolidon die Nulltoleranz gefordert.

In der Literatur finden sich zahlreiche Nachweismethoden vor allem für Furazolidon und Nitrofurazon in Blut, Organen, Muskelfleisch, Milch und Fett. Die in der zweiten Hälfte der siebziger Jahre entwickelten mikrobiologischen Hemmstofftest^s mit Nachweisgrenzen von 150 bis 300 ppb in Muskel, Niere und Leber (7) wurden durch die Hochdruckflüssigchromatographie mit Nachweisgrenzen um 1 ppb ersetzt (8–11).

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Methode zum Nachweis von Nitrofurazon, Nitrofurantoin, Furazolidon und Furaltadon sowie des Nitrofurazon- und des Furazolidon-Cyanids in Schweineleber, -niere und -muskel mit einer Nachweisgrenze von 1 ppb.

Metabolismus

Im sauren Milieu des Gastrointestinaltrakts wird die Azomethinbindung der untersuchten Nitrofuranderivate Nitrofurazon, Furazolidon, Nitrofurantoin und Furaltadon relativ rasch hydrolysiert (12–14). Der entstehende 5-Nitro-2-furaldehyd und das entsprechende Hydrazinderivat werden als Kanzerogene angesehen (13, 15). Der Hydrazinmetabolit wird hydrolysiert, bei Furazolidon zu Hydroxyhydrazin, Ethen und CO₂ (13).

Der quantitativ bedeutendste Schritt im tierischen und bakteriellen Stoffwechsel scheint die durch Xanthinoxidase katalysierte enzymatische Reduktion der 5-Nitrogruppe über die Amino- zur Cyanogruppe zu sein (12, 16, 17). Dadurch wird die antimikrobielle Wirkung der Nitrofurane in Bakterien- und Wirtszellen metabolisch aktiviert. Gleichzeitig werden aber auch die toxischen, mutagenen und kanzerogenen Effekte ausgelöst (13). Zu diesem Metabolismus sind praktisch alle Gewebe befähigt (18), hauptsächlich ist er aber in der Leber (12, 16, 17, 19–22), Niere (12, 23, 24) und Lunge (12, 20) lokalisiert.

Die auf dem Weg von der Nitrofurane-Muttersubstanz zum korrespondierenden Aminofuran entstehenden reaktiven Nitroxidradikale, Nitreniumionen und Superoxid-Radikal-Anionen können als elektrophile Metaboliten mit nukleophilen Makromolekülen, z. B. Glutathion, interagieren (23). Es werden auch kovalente Bindungen zwischen reaktiven Metaboliten und DNA beobachtet (24). Dabei können Einzelstrangbrüche auftreten, womit die Mutagenität der Nitrofurane erklärt werden kann (12).

Das erste stabile, aus Leber und Urin isolierbare metabolische Intermediärprodukt, das Aminofuran, wird weiter zum entsprechenden Cyanoderivat reduziert (23). Der stabile Cyanometabolit des Furazolidons und des Nitrofurazons konnte mit der im folgenden beschriebenen Methode in Schweinefleisch nachgewiesen werden. Diese stabilen Metabolite weisen im allgemeinen keine mutagenen Eigenschaften mehr auf (15, 16, 25).

Weitere bekannte Abbauewege der Nitrofurane sind die Transformation der 5-Nitrogruppe in die Methylthiogruppe (26) und die Hydroxylierung des Furanrings (27). Die durch Hydroxylierung gebildeten Metaboliten werden als tautomere Mischungen des 4-Hydroxy-5-nitro-2-furancarboxaldehyd mit der korrespondierenden Acinitroform angesehen (27).

Metabolismustudien mit radioaktiv markierten Nitrofuranderivaten zeigten, dass der Abbau derart vollständig abläuft, dass neben grösseren Fragmenten schliesslich auch kleine, völlig unspezifische Kohlenstoffverbindungen (α -Keto-glutarsäure, CO_2) entstehen, die in den normalen Kohlenstoffpool eingehen und im ganzen Organismus verteilt werden (14, 19). Einen Überblick über die wichtigsten Abbauewege gibt Abbildung 1.

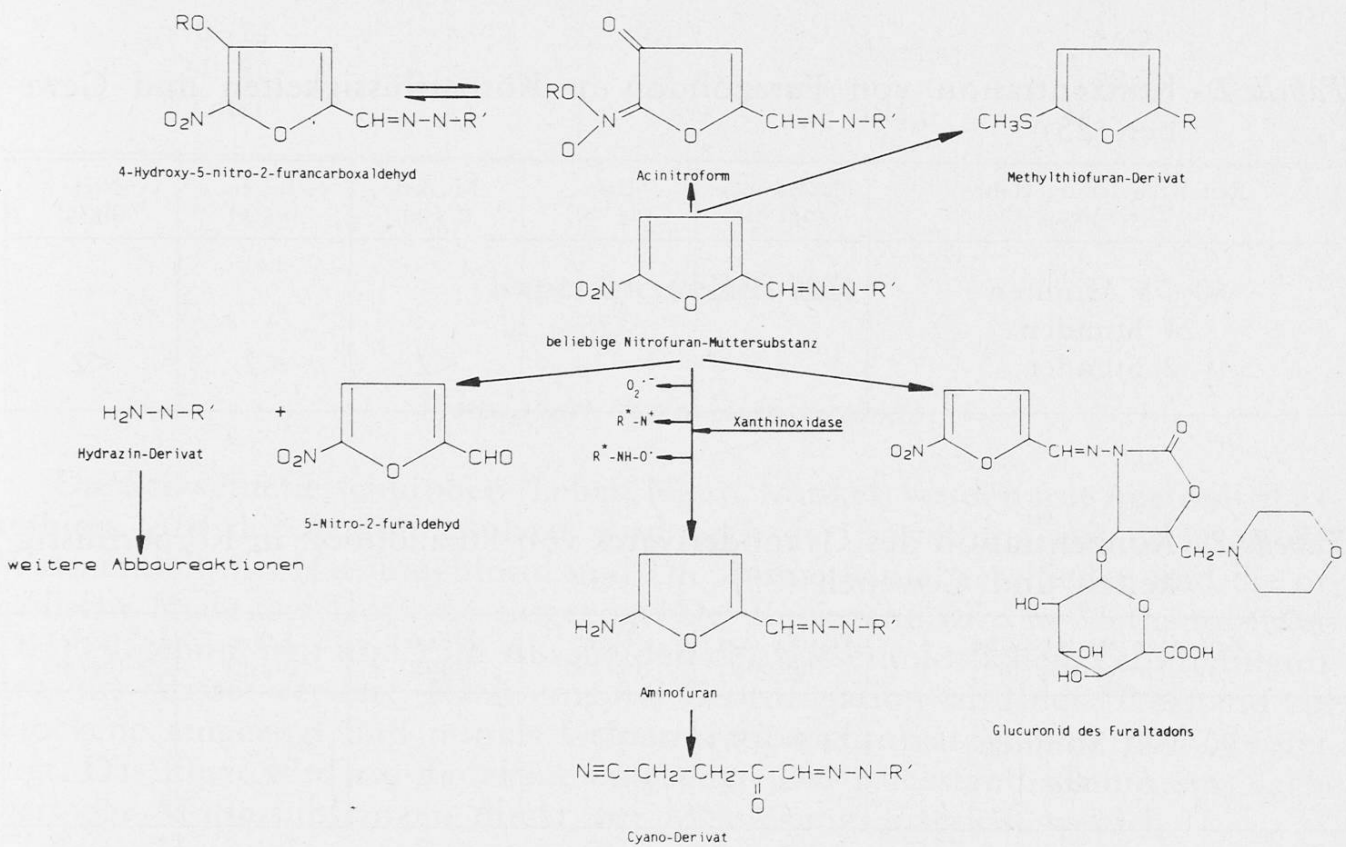


Abb. 1. Metabolismus der 5-Nitrofurane

Pharmakokinetik

Nach Aufnahme über das Portalsystem werden die Nitrofurane in unterschiedlichem Ausmass an Plasmaproteine gebunden. Die Bindungsrate ist um so höher, je hydrophober die Substituenten der entsprechenden Verbindung sind. Anionische Verbindungen wie Nitrofurantoin werden ausgeprägt, kationische Verbindungen wie Furaltadon dagegen nur sehr schwach gebunden (28).

Die Plasmahalbwertszeiten liegen bei allen vier untersuchten Verbindungen im Bereich von 20 bis 60 Minuten (28). Die jüngeren Individuen weisen wegen der geringeren metabolischen Aktivität im allgemeinen höhere Plasmahalbwertszeiten auf.

Verteilung, Bindung an Gewebe

Am ausführlichsten untersucht sind die Verhältnisse beim Nitrofuranderivat Furazolidon. *Vroomen* (25) konnte nach zehntägiger Therapie mit furazolidonhaltigem Futter (300 mg/kg Futtermittel) in Schweinen die in den Tabellen 1 und 2 gegebenen Furazolidon- und Furazolidon-Cyanid-Konzentrationen in Abhängigkeit der Zeit bestimmen.

Tabelle 1. Konzentration von Furazolidon in Körperflüssigkeiten und Geweben (25)

Zeit nach letzter Gabe am Therapietag 10	Plasma max. (ng/ml)	Urin (ng/ml)	Muskel (ng/g)	Leber (ng/g)	Niere (ng/g)
60–75 Minuten 24 Stunden 2 Stunden	62–121	<25	<2	<2	<2

Tabelle 2. Konzentration des Cyanoderivates von Furazolidon in Körperflüssigkeiten und Geweben (25)

Zeit nach letzter Gabe am Therapietag 10	Plasma max. (ng/ml)	Urin (ng/ml)	Muskel (ng/g)	Leber (ng/g)	Niere (ng/g)
90–240 Minuten 2 Stunden	24,9–45,3	---	17	--	--

Ausscheidung

Tennen et al. (14) stellten in einem Versuch mit ¹⁴C-markiertem Furazolidon fest, dass innerhalb der ersten 2,6 Stunden nach Furazolidongabe in einem Schwein bereits 53,5% aller Urinisotope die Niere passiert haben mussten. Nach 24 Stunden waren via Urin total 67% und via Faeces 0,75% der Radioaktivität ausgeschieden.

Tatsumi et al. (29) untersuchten den zeitlichen Verlauf der Ausscheidung von Nitrofurazon und seinen Metaboliten in Ratten nach der peroralen Verabrei-

chung von ^{14}C -markiertem Nitrofurazon in einer Dosierung von 100 mg pro kg Körpergewicht. Die Resultate dieser Studie sind in Tabelle 3 festgehalten.

Eine Sonderstellung unter den Nitrofuranderivaten nimmt Nitrofurantoin ein: Während bei Furazolidon, Nitrofurazon und Furaltadon die Konzentration der im Urin unverändert ausgeschiedenen Muttersubstanz zwischen 0,05 und 5% beträgt, werden bei Nitrofurantoin ca. 40% via Urin unverändert ausgeschieden (3).

Tabelle 3. Ausscheidung von Nitrofurazon und Metaboliten (29)

Zeit (h)	Nitrofurazon und Metabolite	
	Urin (%)	Faeces (%)
0-24	61,2	26,2
24-96	4,9	8,7
Total	101,0	

Experimenteller Teil

Prinzip der Extraktionsmethode

Die Schweinefleischproben (Leber, Niere, Muskel) werden mit Acetonitril extrahiert. Aus der Acetonitrilphase wird nach der Entfettung mit n-Hexan der Wasseranteil mit Natriumchlorid und Dichlormethan abgeschieden und die organische Phase zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird in Methanol (MeOH) aufgenommen und zum Abscheiden der wasserunlöslichen Verunreinigungen mit Wasser versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand zur Trockene eingeeengt und mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) gereinigt. Das Eluat wird zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand kann beim Nachweis der Muttersubstanzen direkt zur Messlösung aufgelöst werden.

Beim Nachweis der Cyanometaboliten erfolgt eine zusätzliche Reinigung über mittelpolare Säulenmedien (Cyanopropyl- und Aminopropylphase).

Die quantitative Bestimmung erfolgt sowohl für die Muttersubstanzen wie für die Cyanoderivate mittels HPLC.

Geräte und Hilfsmittel

Homogenisatoren:	Moulinex Universalzerkleinerer Polytron Homogenisierstab
Zentrifuge:	Christ Zeta 17
Wasserbad:	Lauda R 20 mit Regelelektronik PTR R 20
Vakuumkammer für Kartuschen:	Supelco Visiprep Vacuum Manifold

Chemikalien

		Hersteller	Katalog-Nr.
Nachweis- methode:	Aceton z. A.	Merck	14
	Acetonitril R Chromasolv ^R	Riedel-de Haën	34851
	Dichlordimethylsilan z. Synth.	Merck	803452
	Dichlormethan Chromasolv ^R	Riedel-de Haën	34856
	DMSO getrocknet	Merck	2931
	Essigsäure 100% (Eisessig) z. A.	Merck	63
	Ethylacetat Chromasolv ^R	Riedel-de Haën	34858
	Methanol Chromasolv ^R	Riedel-de Haën	34860
	n-Hexan Chromasolv ^R	Riedel-de Haën	34859
	Natriumacetat wasserfrei z. A.	Merck	6268
	Natriumchlorid z. A.	Merck	6404
	Natriumsulfat wasserfrei z. A.	Merck	6649
	Stickstoff 50	Carbagas	
	Toluol z. A.	Merck	8325
	Wasser bidest, filtriert durch 0,45 µm-Millipore-Membranfilter		
	Sephadex LH 20	Pharmacia	
	Supelclean-Kartuschen LC-CN	Supelco	57013
	Supelclean-Kartuschen LC-NH ₂	Supelco	57014
	Spritzenfilter 3 mm Porengrösse 0,45 µm	Hewlett & Packard	5061-3357
	Katalytische Hydrierung:	Benzol z. A.	Merck
Celite AFA z. A.		Fluka	22137
Chloroform z. A.		Merck	2444
DC-Alufohlen Kieselgel 60 F ₂₅₄ 5 × 10 cm Schichtdicke 0,2 mm		Merck	16834
Ethanol absolut z. A.		Merck	983
Kieselgel 60 Korngrösse 0,04-0,063 mm		Merck	7729
Magnesiumsulfat purum z. A.		Fluka	63139
Natriumhydrogencarbonat z. A.		Merck	6329
Natriumhydroxid		Merck	6498
Nitromethan z. Synth.		Merck	820894
Palladium/Aktivkohle 5% puriss.		Fluka	75992
Raney-Nickel-Katalysator z. Synth.		Merck	820875
Salzsäure rauchend 37% z. A.		Merck	317
Wasserstoff 45		Carbagas	

Referenzsubstanzen

Furaltadon	Sigma	F-9130
Furazolidon	Sigma	F-9505

Nitrofurantoin	Serva	30600
Nitrofurazon	Serva	30610

Vorbehandlung der Glaswaren

Um Adsorptionsverluste in den verwendeten Glaswaren zu vermeiden, wurden Rund- und Spitzkolben mit Dichlordimethylsilan behandelt. Dazu wurde eine Lösung von 10% Dichlordimethylsilan in Toluol hergestellt und damit alle Kolben gespült. Anschliessend wurde mit getrocknetem Toluol und MetOH nachgespült und im Trockenschrank bei 150 °C während einer Stunde getrocknet.

Katalytische Hydrierung der 5-Nitrofurane

Das Cyanoderivat des Furazolidons wurde nach (30), das Cyanoderivat des Nitrofurazons nach (21) und (31) aus den Muttersubstanzen durch katalytische Hydrierung mit Raney-Nickel hergestellt. Die Reduktionsprodukte wurden mit Massenspektrometrie, IR- und UV-Spektroskopie identifiziert.

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Pumpe:	aus Kontron HPLC-System 600
Injektor:	Rheodyne 7125 mit selbstgebaurem 5-ml-Probenloop
Säulen:	Bio-Rad MP 45 cm × 2,5 cm Büchi MPLC 46 cm × 2,6 cm
Spektrophotometer:	LKB 2111 Uvicord S
Messwellenlänge:	252 nm
Autosampler:	LKB 2111 Multi-Rac
Schreiber:	W + W 1200
Stationäre Phase:	Sephadex LH 20, Pharmacia
Mobile Phase:	MetOH
Flussrate:	5 ml/min
Injektionsvolumen:	5 ml

Hochdruckflüssigchromatographie

Nachweis der Muttersubstanzen

Pumpe P1:	Waters 600 E
Injektor:	Waters U6K
Säule S1:	hplc-technology Spherisorb 5 µm ODS 2 25 cm × 4,6 mm
Spektrophotometer:	UV 1: Kontron Uvikon LCD 725

Messwellenlänge: 368 nm
Integrator: Hewlett & Packard 3390 A
Die Quantifizierung erfolgte durch Peakflächenintegration und den aus den Eichgeraden errechneten Response-Faktoren, das heisst mit externem Standard.
Injektionsvolumen: generell 10 μ l, Proben aus dem Fütterungsversuch: 5–20 μ l
Mobile Phase: Natriumacetatpuffer (0,01 m, pH 4,6)/Acetonitril 75:25, isokratisch
Flussrate: 1 ml/min

Nachweis der Cyano-Derivate

Säulenschaltung nach *Schema 3*.
Pumpe P1: Waters 600 E
Pumpe P2: Altex 110 A
Injektor: Waters U6K
Säulen S1 und S2: hplc-technology Spherisorb 5 μ m ODS 2 25 cm \times 4,6 mm
Schaltventile 1 und 2: Rheodyne 7010
Sepktrophotometer: UV 1: Kontron Uvikon LCD 725
UV 2: Kontron Uvikon LCD 722 LC
Messwellenlänge: 290 nm
Integrator: Hewlett & Packard 3390 A
Die Quantifizierung erfolgte durch Peakflächenintegration und den aus den Eichgeraden errechneten Response-Faktoren, das heisst mit externem Standard.
Injektionsvolumen: 20 μ l
Mobile Phase: Natriumacetatpuffer (0,1 m, pH 4,6)/Acetonitril 90:10, isokratisch
Säule S1: für Problemfälle zusätzlich: 12:88, 15:85
Mobile Phase
Säule S2: generell 10:90, isokratisch
Flussrate Pumpe P1: 0,8 ml/min
Flussrate Pumpe P2: 1,0 ml/min

Standardlösungen

Nitrofurant-Muttersubstanzen

10 mg Nitrofurant-Muttersubstanzen (genau gewogen) wurden je in einem 100-ml-Messkolben in 100 ml Acetonitril mit Hilfe des Ultraschallbades gelöst (Stammlösung 1).

Von jeder der vier Stammlösungen 1 wurden 5 ml in einen 20-ml-Messkolben pipettiert, mit Acetonitril auf je 20 ml ergänzt und gut geschüttelt. Die Konzentration dieser Stammlösung betrug damit 25 ng/ μ l je Nitrofuranderivat (Stammlösung 2).

Aus der Stammlösung 2 wurden sämtliche Verdünnungen mit dem HPLC-Laufmittel hergestellt.

Cyanoderivate

10 mg Nitrofurazon- bzw. Furazolidoncyanid (genau gewogen) wurden in einem 100-ml-Messkolben in 100 ml Wasser mit Hilfe des Ultraschallbades gelöst (Stammlösung 1).

Von beiden Stammlösungen 1 wurden 25 ml in einen 50-ml-Messkolben pipettiert, mit Wasser auf je 50 ml ergänzt und gut geschüttelt. Die Konzentration dieser Stammlösung betrug je Cyanoderivat 50 ng/ μ l (Stammlösung 2).

Aus der Stammlösung 2 wurden sämtliche Verdünnungen mit Wasser hergestellt.

Extraktionsprozess

Die Extraktionsprozesse sind im Flussdiagramm Abbildung 2 zusammenfassend dargestellt.

Leberextraktion Nitrofurazan-Muttersubstanzen

1. 100 g Leber in 250-ml-Zentrifugenflasche (1) mit 100 ml Acetonitril homogenisieren
4 min bei 4000 U/min zentrifugieren, abdekantieren = Extrakt 1
In 500-ml-Scheidetrichter mit 150 ml n-Hexan entfetten
Rückstand in Zentrifugenflasche mit weiteren 100 ml Acetonitril extrahieren
4 min bei 4000 U/min zentrifugieren, abdekantieren = Extrakt 2.
2. Extrakt 1 (untere Phase im Scheidetrichter) in 250-ml-Zentrifugenflasche (2) abdekantieren
10 g NaCl zusetzen, 4 min bei 4000 U/min zentrifugieren
Oberste n-Hexanphase abdekantieren und verwerfen
20 ml Dichlormethan zusetzen, schütteln
4 min bei 4000 U/min zentrifugieren
Obere organische Phase abdekantieren und in 250-ml-Rundkolben zur Trockene eindampfen.
3. Extrakt 2 mit den gleichen 150 ml n-Hexan in Scheidetrichter entfetten und analog Extrakt 1, allerdings ohne weiteren NaCl-Zusatz aufarbeiten
Im gleichen Rundkolben zur Trockene eindampfen = Rohextrakt.
4. Rohextrakt in 4 ml MetOH aufnehmen in 50-ml-Kunststoff-Zentrifugenflasche pipettieren
Rundkolben mit 10 ml Wasser nachwaschen, zum MetOH-Rohextrakt-Gemisch geben, schütteln
15 min bei -20°C stehen lassen, bei -20°C mit 12 000 U/min 15 min zentrifugieren
Klare Lösung in 25-ml-Spitzkolben abdekantieren und am Rotationsverdampfer bei 70°C am Vakuum zur Trockene eindampfen.

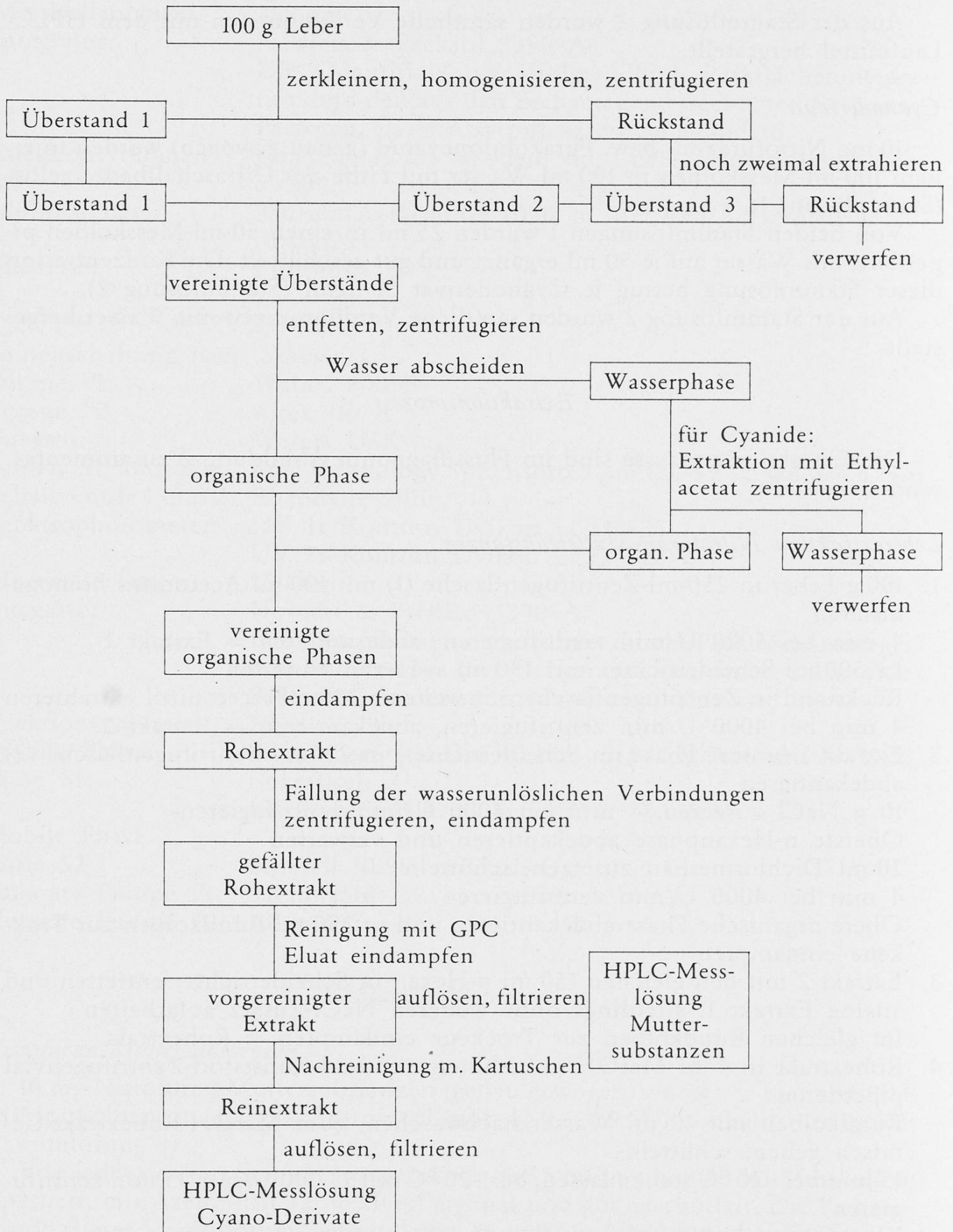


Abb. 2. Flussdiagramm der Extraktionsmethoden

5. Rückstand in 4 ml MetOH aufnehmen, in 5-ml-HPLC-Spritze aufziehen, Spitzkolben mit 1 ml MetOH nachspülen, in Spritze aufziehen, auf GPLC-Säule geben und mit MetOH, 5 ml/min eluieren
Fraktion zwischen 45 und 66 Minuten in 200-ml-Rundkolben auffangen
Eluat am Rotationsverdampfer bei 50 °C am Vakuum auf ca. 10 ml einengen, in Spitzkolben pipettieren, Rundkolben mit wenig MetOH nachspülen, zur Trockene einengen (50 °C, Vakuum).
6. In 200 µl Wasser bidest aufnehmen, durch 3-mm-Spritzenfilter, Porengröße 0,45 µm (Hewlett & Packard) in 300-µl-Vial filtrieren = HPLC-Messlösung.

Leber-Extraktion Nitrofurazon/Furazolidon-Cyanid

1. 100 g Leber in 250-ml-Zentrifugenflasche (1) mit 100 ml Acetonitril versetzen
Homogenisieren
4 min bei 4000 U/min zentrifugieren, dekantieren.
2. In 150 ml n-Hexan in 500-ml-Scheidetrichter, schütteln
Untere Phase in 250-ml-Zentrifugenflasche (2) mit 10 g NaCl dekantieren, schütteln
4 min bei 4000 U/min zentrifugieren
Oberste n-Hexanphase abpipettieren und verwerfen.
3. Rückstand in Zentrifugenflasche (1) 2mal mit je 60 ml Acetonitril analog Schritt 1 und 2 extrahieren und abzentrifugierte Acetonitrilphasen jeweils mit denselben 150 ml n-Hexan im Scheidetrichter entfetten.
4. Untere Acetonitrilphase des 2. Extraktionsschrittes etwa zur Hälfte zur ersten Acetonitrilphase in Flasche (2) dekantieren
4 min bei 4000 U/min zentrifugieren
Obere n-Hexanphase abpipettieren und verwerfen
20 ml Dichlormethan zusetzen, vorsichtig schütteln
4 min bei 4000 U/min zentrifugieren
Obere organische Phase in 250-ml-Rundkolben dekantieren und am Rotationsverdampfer bei 50 °C am Vakuum (300 mbar) zur Trockene eindampfen.
5. Acetonitrilphase des 3. zusammen mit dem Rest des 2. Extraktionsschrittes nach dem Entfetten in Zentrifugenflasche (2) (mit wässriger Phase) dekantieren
4 min bei 4000 U/min zentrifugieren
Oberste n-Hexanphase abpipettieren, verwerfen
50 ml Ethylacetat zusetzen, mit wässriger und organischer Phase homogenisieren
4 min bei 4000 U/min zentrifugieren
Obere organische Phase ebenfalls in 250-ml-Rundkolben mit Rückstand dekantieren, bei 50 °C am Vakuum (300 mbar) zur Trockene eindampfen → Rohextrakt.
6. Rohextrakt in 4 ml MetOH aufnehmen, in 50-ml-Zentrifugen-Vial aus Kunststoff pipettieren
Rundkolben mit 10 ml Wasser spülen, dieses Wasser ins Zentrifugenvial dekantieren → Fällung, leicht schütteln

- Während 15 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stehen lassen
15 min bei 12 000 U/min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugieren
Den klaren Überstand in 50-ml-Spitzkolben bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ am Rotationsverdampfer am Vakuum zur Trockene eindampfen.
7. Rückstand in 4 ml MetOH aufnehmen, in 5-ml-HPLC-Spritze aufnehmen
Spitzkolben mit 1 ml MetOH nachspülen, in Spritze aufziehen
Auf GPLC-Säule mit MetOH bei 5 ml/min reinigen
Fraktion zwischen 40 und 53 Minuten in 200-ml-Rundkolben aufnehmen
Am Rotationsverdampfer bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ am Vakuum (250 mbar) auf ca. 10 ml einengen
In 25-ml-Spitzkolben pipettieren, Rundkolben mit wenig MetOH nachspülen
Vereinigte MetOH-Phasen im Spitzkolben zur Trockene einengen.
 8. Rückstand in $200\text{ }\mu\text{l}$ Natriumacetatpuffer (0,01 m, pH 4,6) aufnehmen
Supelco LC-CN-Kartusche zuerst mit 4 ml MetOH, dann mit 4 ml Acetatpuffer vorkonditionieren
 $200\text{ }\mu\text{l}$ -Probe auftragen, zur Trockene absaugen (Eluat verwerfen)
Eluieren mit 6 ml Aceton: Dichlormethan, 1:1, Eluat in 25-ml-Spitzkolben auffangen
Am Stickstoffstrom bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ einengen, allfällige Wasserreste am Vakuum bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ eindampfen.
 9. Rückstand in $200\text{ }\mu\text{l}$ MetOH aufnehmen
Supelco LC-NH₂-Kartusche mit 4 ml MetOH vorkonditionieren
 $200\text{ }\mu\text{l}$ -Probe auftragen, zur Trockene absaugen, Eluat auffangen
Mit 6 ml Ethylacetat eluieren, Eluat auffangen am Stickstoffstrom bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Trockene eindampfen.
 10. Rückstand in $200\text{ }\mu\text{l}$ Bidest-Wasser aufnehmen
Durch 3 mm Spritzenfilter, Porengrösse $0,45\text{ }\mu\text{m}$ in $300\text{ }\mu\text{l}$ -Probenvial filtrieren \rightarrow HPLC-Messlösung.

Hochdruckflüssigchromatographie

Die Trennbedingungen sind unter «Nachweis der Muttersubstanzen bzw. Cyanoderivate» aufgeführt.

Säulenschaltung beim Nachweis der Cyanometaboliten

Aufbau nach *Abbildung 3*.

Nach dem Abtrennen der unerwünschten Verunreinigungen mit Pumpe P1 über Ventil V1, Säule S1 und Photometer UV1 in den Abfall (Waste) wird 0,15 Minuten vor der Retentionszeit der Nitrofurancyanide mittels Ventil V2 die Säule S1 vor die Säule S2 geschaltet. Die Durchflussrate beträgt $0,8\text{ ml/min}$. Während der sogenannten Schaltzeit wird nun die interessierende Nitrofurand-derivat-Fraktion von der Vorsäule auf die analytische Säule transferiert. Die Schaltzeiten (Beginn und Ende des Transfers von Säule S1 auf S2) werden durch Injektion von Standardlösung in regelmässigen Abständen bestimmt.

Schaltzeiten für Laufmittelverhältnis: 10:90 (v/v) ca. 6,10 bis 9,15 min
 12:88 (v/v) ca. 5,25 bis 8,15 min
 15:85 (v/v) ca. 4,55 bis 7,05 min

Nach Ablauf der Schaltzeiten wird durch erneutes Betätigen der Ventile V1 und V2 die analytische Säule S2 hinter die Pumpe P2 mit einer Flussrate von 1 ml/min geschaltet. Damit kann die transferierte Fraktion ohne zusätzliche Belastung durch nachfolgende Verunreinigungen mittels Photometer UV2 und dem Integrator quantifiziert werden. Durch gleichzeitige Betätigung von Ventil V4 wird die Waschlösung (Acetonitril) an Pumpe P1 geschaltet und deren Flow auf 2 ml/min erhöht. Durch Schliessen des Bypass-Ventils V3 kann die Säule S1 in umgekehrter Flussrichtung gespült werden, was die Spüldauer auf 10 Minuten verkürzt und die Belastung der Säule mit Verunreinigungen verringert. Die Säule S2 muss nach der Analyse nicht besonders gespült werden. Die Säule S1 ist nach 15–20 Minuten mit dem Laufmittel rekonditioniert.

Eine wöchentliche Spülung mit Methanol/DMSO 1:1 hat sich für die Lebensdauer der Säulen als vorteilhaft erwiesen.

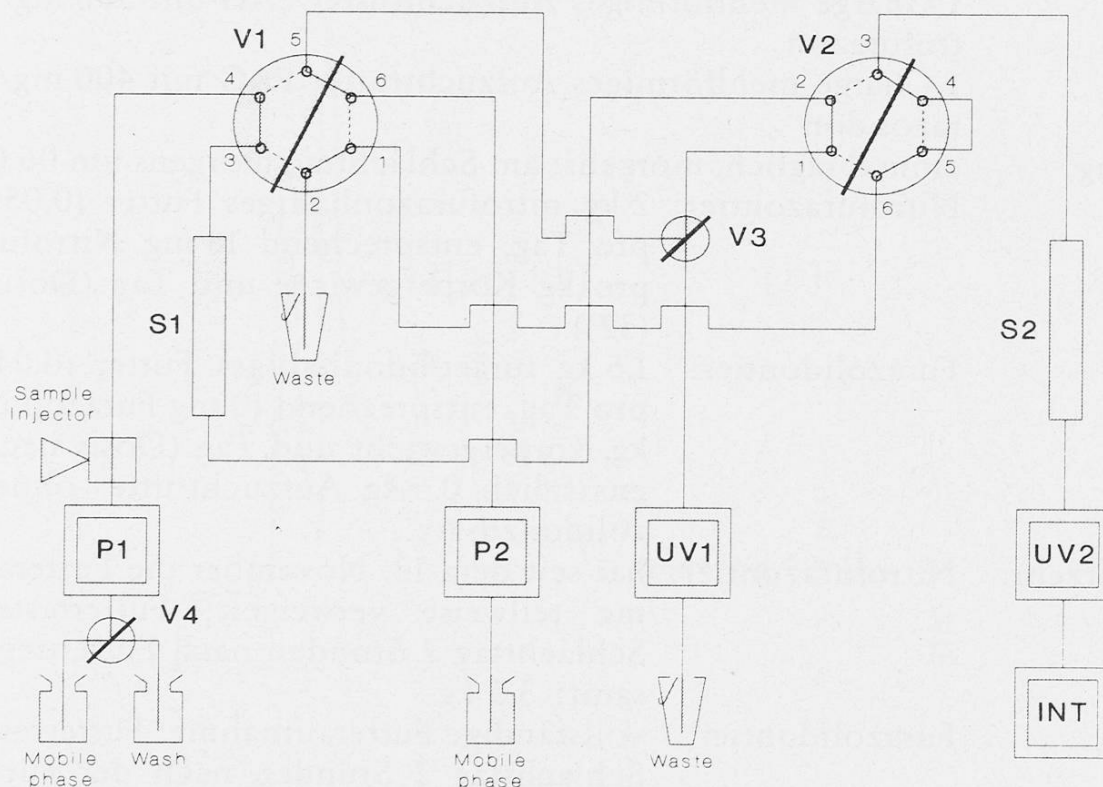


Abb. 3. Säulenschaltung mit zwei Ventilen

Fütterungsversuch

Zur Überprüfung der Tauglichkeit der Nachweismethode in der Praxis wurde je ein Schwein mit Furazolidon bzw. Nitrofurazon behandelt.

Furazolidon ist wie erwähnt als Wachstumsförderer weit verbreitet und wird therapeutisch zur Behandlung von Salmonellosis und Coccidiosis z. B. bei Schweinen eingesetzt.

Nitrofurazon wird hauptsächlich topisch appliziert, kann aber auch per oral zur Behandlung der Schweinedysenterie und der nekrotischen Enteritis eingesetzt werden.

Versuchsordnung

Versuchsdauer: vom 8. November 1989 bis 14. November 1989

Versuchstiere: zwei kastrierte Eber der Rasse Edelschwein

Lebendgewicht: Tier 1, Nitrofurazonfütterung am 8. November 1989: 56 kg
am 14. November 1989: 54 kg
Gewichtsabnahme!

Tier 2, Furazolidonfütterung am 8. November 1989: 61 kg
am 14. November 1989: 66 kg

Futter: 1 Charge mehlformiges Aufzuchtfutter FAG mit 500 mg/kg Nitrofurazon
1 Charge mehlformiges Aufzuchtfutter FAG mit 400 mg/kg Furazolidon

Fütterung: einmal täglich, morgens; am Schlachttag morgens um 06.00 Uhr
Nitrofurazontier: 2 kg nitrofurazonhaltiges Futter (0,05%)
pro Tag, entsprechend 18 mg Nitrofurazon
pro kg Körpergewicht und Tag (Dosis nach (32))

Furazolidontier: 1,5 kg furazolidonhaltiges Futter (0,04%)
pro Tag, entsprechend 10 mg Furazolidon pro
kg Körpergewicht und Tag (Dosis nach (32))
zusätzlich 0,5 kg Aufzuchtfutter ohne Furazolidonzusatz

Futterverzehr: Nitrofurazontier: hat seit dem 12. November die Futteraufnahme teilweise verweigert; Futterresten am Schlachttag 2 Stunden nach Fütterung insgesamt: 3,5 kg

Furazolidontier: vollständige Futteraufnahme; Futterresten am Schlachttag 2 Stunden nach der Fütterung: 0,5 kg

Schlachtung: 14. November 1989: 08.15–08.30 Uhr, Elektrobetäubung, Entbluten, Entnahme der Leber, der Nieren und der Muskelproben (Hinterschinken).

Resultate und Diskussion

Die Extraktion tierischer Gewebe, wie Leber und Niere, mit dem beträchtlich polaren Acetonitril führt im Extrakt zu zahlreichen störenden Begleitsubstanzen, die mit einem aufwendigen Reinigungsprozess entfernt werden müssen.

Während beim Nachweis der Nitrofuran-Muttersubstanzen die Fällung der wasserunlöslichen Verbindungen und die Reinigung mit Gelpermeationschromatographie nach *Petz* (33) zur quantitativen Bestimmung bei 368 nm genügen, müssen beim Cyano-Derivat-Nachweis mit einer Messwellenlänge von 290 nm zusätzliche Reinigungsschritte über amino- und cyanopropyliertes Kieselgel durchgeführt werden.

Die verbleibenden, von den Cyanoderivaten nicht trennbaren Verunreinigungen führen bei Verwendung einer einzelnen HPLC-Säule zu einer Überladung der stationären Phase und Peaküberlagerung. Durch ein System mit einer Vorsäule und einer analytischen Säule können die zu analysierenden Verbindungen durch entsprechende Schaltung von den Verunreinigungen getrennt werden.

Die beiden Methoden erlauben einerseits die gleichzeitige Bestimmung der vier Nitrofuran-Muttersubstanzen und andererseits der Cyanoderivate des Nitrofurazons und des Furazolidons nebeneinander mit einer Nachweisgrenze von 1 ppb (Abb. 4 und 5).

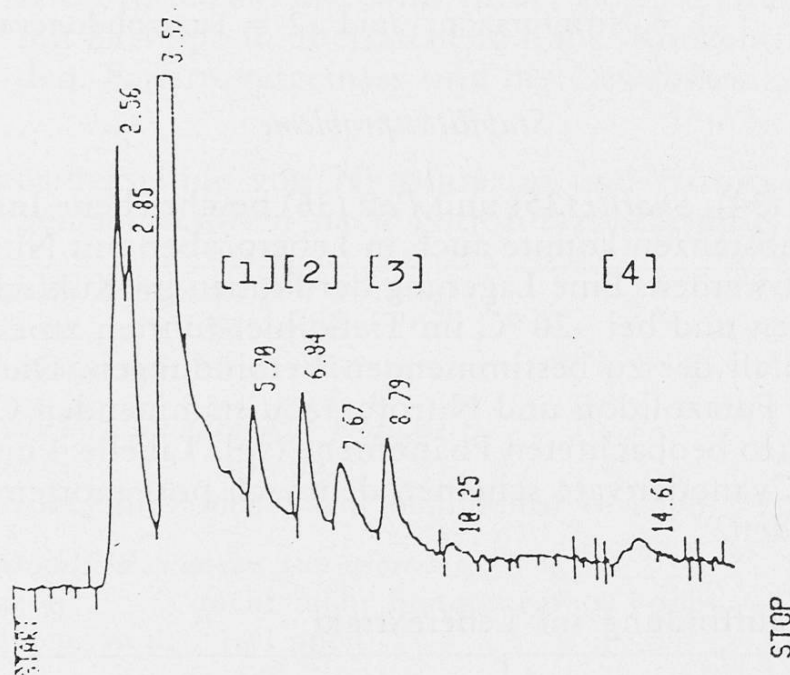


Abb. 4. Leberextrakt mit Nitrofuranzusatz
1 = Nitrofurazon
2 = Nitrofurantoin
3 = Furazolidon
4 = Furaltadon

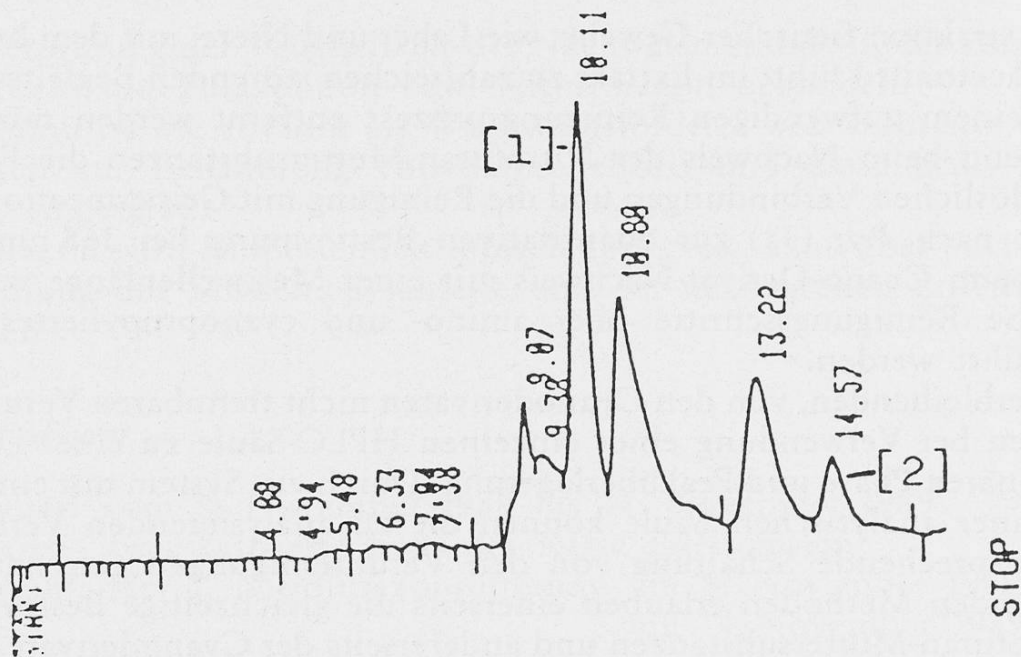


Abb. 5. Leberextrakt mit Zusatz der Cyano-Metaboliten
 1 = Nitrofurazoncyanid 2 = Furazolidoncyanid

Stabilitätsprobleme

Die von *Veale* (34), *Suortti* (35) und *Petz* (36) beschriebene Instabilität der Nitrofuran-Muttersubstanzen konnte auch in Leberproben mit Nitrofuran-Cyanid-Zusatz festgestellt werden. Eine Lagerung der Proben im Kühlschrank bei +5 °C während 5 Stunden und bei -20 °C im Tiefkühler führten zu einem markanten Konzentrationsabfall der zu bestimmenden Verbindungen. Die aus dem Fütterungsversuch mit Furazolidon und Nitrofurazon stammenden Organproben bestätigten die in vitro beobachteten Phänomene (vgl. Tabelle 4 und 5). Die Nitrofurane und ihre Cyanoderivate scheinen demnach post mortem intensiv weiter abgebaut zu werden.

Tabelle 4. Wiederauffindung im Leberextrakt

		Mittelwert aus <i>n</i> -Proben
Nitrofurazon	<i>n</i> = 8	43,42%
Nitrofurantoin	<i>n</i> = 8	62,76%
Furazolidon	<i>n</i> = 8	78,50%
Furaltadon	<i>n</i> = 8	49,11%
Nitrofurazoncyanid	<i>n</i> = 16	76,50%
Furazolidoncyanid	<i>n</i> = 9	83,50%

Praktische Anwendung der Nachweismethode in einem Fütterungsversuch

Bei der Bestimmung der Wiederauffindung konnte gezeigt werden, dass die vier Nitrofuran-Muttersubstanzen und die zwei Cyanoderivate nach Zusatz zu Schweineleber extrahiert und nachgewiesen werden können.

In einem Fütterungsversuch sollte nun untersucht werden, ob sich Furazolidon, Nitrofurazon und die entsprechenden Cyanoderivate auch im Fleisch eines Tieres nachweisen lassen, welches vor der Schlachtung mit furazolidon- oder nitrofurazonhaltigem Futter behandelt wurde.

Die Tabellen 5 und 6 geben die durchschnittlichen Gehalte der Nitrofurandervative und deren Cyanide in den einzelnen Geweben der Versuchstiere wieder.

Die aufwendigen Extraktionsarbeiten führten dazu, dass die zweiten Leberextraktionen erst nach 7 Stunden, die Nieren- und Muskelextraktionen erst nach 48 Stunden durchgeführt werden konnten. Die in den Vorversuchen aufgetretene Konzentrationsabnahme der Nitrofuran-Muttersubstanzen und deren Cyanoderivate in gespikten Proben während der Lagerung im Kühlschrank (5 °C) konnte durch die Leberextrakte 1 und 1.1 bestätigt werden. Diese intensive Metabolisierung post mortem macht eine Wertung der Konzentrationen in den später extrahierten Geweben schwierig. Dennoch können einige Tendenzen festgestellt werden:

Nitrofurazon: Die Muttersubstanz wird in der Leber 2 Stunden post mortem mit 28,4 ppb in überraschend hoher Konzentration wiedergefunden. Erwartungsgemäss sind die Gewebskonzentrationen im Le-

Tabelle 5. Gewebsrückstände von Nitrofurazon und Nitrofurazoncyanid in einem Schlachtschwein nach Nitrofurazontherapie

1.	<i>Leber (Extrakt 2 Stunden post mortem)</i>
	Nitrofurazon: 28,36 ppb
	Nitrofurazoncyanid: 4,13 ppb
1.1	<i>Leber (Extrakt 7 Stunden post mortem)</i>
	Nitrofurazon: 0,14 ppb
	Nitrofurazoncyanid: nicht mehr bestimmbar (< 1 ppb)
2.	<i>Niere (Extrakt 48 Stunden post mortem)</i>
	Nitrofurazon: nicht mehr bestimmbar (< 1 ppb)
	Nitrofurazoncyanid: 1,11 ppb
3.	<i>Muskel (Extrakt 48 Stunden post mortem)</i>
	Nitrofurazon: die im Bereich des Nitrofurazon-Peaks eluierte Substanz liess sich bei der Standardaddition nicht als Nitrofurazon identifizieren.
	Nitrofurazoncyanid: 4,20 ppb

Die aufgeführten Gewebskonzentrationen stellen Durchschnittswerte aus mehreren quantitativen HPLC-Bestimmungen dar.

Tabelle 6. Gewebsrückstände von Furazolidon und Furazolidoncyanid in einem Schlachtschwein nach Furazolidontherapie

1.	<i>Leber (Extrakt 2 Stunden post mortem)</i>	Nitrofurazon:	1,49 ppb
		Nitrofurazoncyanid:	1,77 ppb
1.1	<i>Leber (Extrakt 7 Stunden post mortem)</i>	Furazolidon:	1,25 ppb
		Furazolidoncyanid:	nicht mehr bestimmbar (<1 ppb)
2.	<i>Niere (Extrakt 48 Stunden post mortem)</i>	Furazolidon:	1,88 ppb
		Furazolidoncyanid:	6,21 ppb
3.	<i>Muskel (Extrakt 48 Stunden post mortem)</i>	Furazolidon:	nicht mehr bestimmbar (<1 ppb)
		Furazolidoncyanid:	7,96 ppb

Die aufgeführten Gewebskonzentrationen stellen Durchschnittswerte aus mehreren quantitativen HPLC-Bestimmungen dar.

berextrakt 1.1 nach 7 Stunden und im Nieren- und Muskelextrakt nach 48 Stunden praktisch nicht mehr bestimmbar.

Cyanoderivat: Das Nitrofurazoncyanid scheint dagegen in der Niere und im Muskel eher in höherer Konzentration vorzuliegen, konnten doch nach 48 Stunden immer noch 1,1 ppb (Niere) bzw. 4,2 ppb (Muskel) nachgewiesen werden.

Furazolidon: Die Muttersubstanz ist mit 1,5 ppb 2 Stunden post mortem in der Leber nur in geringer Konzentration vorhanden; der Konzentrationsabfall zwischen den Leberextrakten 1 und 1.1 ist dagegen nicht sehr ausgeprägt. 48 Stunden post mortem sind in der Niere immer noch 1,9 ppb, im Muskel dagegen weniger als 1 ppb Furazolidon nachweisbar.

Cyanoderivat: Das Furazolidoncyanid scheint wie das Nitrofurazoncyanid in der Niere und im Muskel in höherer Konzentration vorzuliegen, konnten doch 48 Stunden post mortem 6,2 ppb in der Niere und 8 ppb im Muskel nachgewiesen werden.

Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen von *Vroomen et al.* (25), der in einem vergleichbaren Versuch Furazolidon in Leber, Niere und Muskel in einer Konzentration von weniger als 2 ppb und das Furazolidoncyanid nur im Muskel in einer Konzentration von 17 ppb fand.

Schlussfolgerungen

Die praktische Überprüfung der Nachweismethoden und das Verhalten der Nitrofuranrückstände in den einzelnen Geweben lassen mehrere Schlüsse für die Praxis zu:

Die offensichtlich geringe Stabilität der Muttersubstanzen und der Cyanoderivate in den Geweben lässt die Bedeutung dieser Nachweismethoden in der Praxis zumindest als fraglich erscheinen, wenn innerhalb der ersten 5 bis 48 Stunden post mortem ein Grossteil der im Gewebe vorhandenen Nitrofuranverbindungen spontan abgebaut wird.

Die Lagerung der Organ- und Muskelproben der Versuchstiere wurde bewusst im Kühlschrank bei +5 °C durchgeführt, in der Annahme, dass eventuelle frische Schlachthofproben in Kühlboxen transportiert und nicht tiefgekühlt werden. Wie eingehende Vorversuche mit gespikten Leberpräparaten zeigten, spielt vor allem der Zeitfaktor für die Wiederfindung der ursprünglich zugesetzten Nitrofurankonzentration eine Rolle. Ob die Proben im Kühlschrank aufbewahrt oder tiefgekühlt werden, hat keine Bedeutung. Der praktische Therapieversuch bestätigte diese Stabilitätsprobleme.

Die beiden Versuchstiere wurden absichtlich bis 2 Stunden vor der Schlachtung mit nitrofuranhaltigem Futter gefüttert. Damit konnte der innerhalb von 6 Therapietagen aufgebaute Steady-State aufrechterhalten werden. Andererseits konnte eine «Momentaufnahme» des metabolischen Geschehens und der Verteilung der Muttersubstanzen und Cyanoderivate in den Geweben unter Berücksichtigung der kurzen Plasmahalbwertszeit von ca. 30 min (37) erstellt werden.

Die im Rahmen dieses Versuchs gefundenen Gewebskonzentrationen sind in bezug auf die zu erwartenden Konzentrationen beliebiger Schlachthofproben sicher zu hoch. Es werden wohl kaum Schweine bis kurz vor der Schlachtung mit Nitrofuranen behandelt. Selbst bei Missachtung der allgemeinen Absetzfristen für Nitrofurane von 5 Tagen (2) könnten allenfalls positive Proben im Bereich der Nachweisgrenze von 1 ppb infolge ungenügender Stabilität der nachzuweisenden Verbindungen nicht erfasst werden.

Bezüglich dem in der FIV (6) festgelegten Grenzwerte für Nitrofurane von 1 ppb lässt sich folgendes feststellen:

In diesem – verglichen mit der Praxis – extremen Versuch wurde der Grenzwert im Leberextrakt (2 Stunden post mortem) des Nitrofurazontiers deutlich, in demjenigen des Furazolidontiers leicht überschritten. Fünf Stunden später erfüllte die Leber des Nitrofurazontiers die Anforderungen der FIV bereits, die Leber des Furazolidontiers beinahe.

Beide Muskelproben waren 48 Stunden post mortem FIV-konform. Ebenfalls 48 Stunden post mortem erfüllte die Niere des Nitrofurazontiers die FIV-Forderungen bereits, die Niere des Furazolidon-Tiers nicht.

Deutlicher als die Muttersubstanzen liessen sich, vor allem im Muskel, die Cyanoderivate (auch nach 48 Stunden) nachweisen.

Es wäre also zu überlegen, ob im Fleisch neben den Muttersubstanzen bei Furazolidon- oder Nitrofurazonverdacht nicht auch die Cyanidkonzentration bestimmt, und dafür ein Grenzwert erlassen werden sollte.

Diesem Vorschlag kann entgegengehalten werden, dass die in diesem Versuch gewonnenen Resultate praxisfremd sind (Fütterung mit Nitrofuranzusatz bis 2 Stunden vor der Schlachtung!) und daher ohnehin zu hohe Gewebespiegel vorliegen. Ausserdem fehlt ein entsprechender konzentrationsmässiger Bezug der Cyanoderivate zur Muttersubstanz und zu reaktiven, mutagenen und kanzerogenen Nebenabbauprodukten; die aufgefundenen Cyanidrückstände lassen nicht auf die tatsächliche Konzentration der potentiellen gesundheitsgefährdenden Substanzen schliessen. Das Furazolidoncyanid selbst scheint nach *Vroomen* (25) nicht mutagen zu sein.

Dennoch weisen Rückstände von Nitrofurazon- bzw. Furazolidoncyanid im Muskel von mehreren ppb auf therapeutische Nitrofurandosen bis kurz vor der Schlachtung hin, was mit diesem Versuch gezeigt werden konnte.

Schliesslich erwiesen sich die beiden entwickelten Nachweismethoden für Nitrofurazolon-Muttersubstanzen und deren Cyanide als praxistauglich.

Dank

Diese Arbeit wurde vom Bundesamt für Veterinärwesen (BVET), Liebefeld-Bern, finanziell unterstützt. Die Methodenentwicklung erfolgte in den Laboratorien der Abteilung Fleischhygiene und Schlachten, Sektion Chemie des BVET. Herrn Dr. *A. Gutzwiller*, Forschungsanstalt für Viehwirtschaftliche Produktion, Grangeneuve, danken wir für die Durchführung des Fütterungsversuchs, Herrn *M. Sievi* für die gelegentliche praktische Mithilfe.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Rückständen von Nitrofuranen und zweier Nitrofurancyanide in tierischem Gewebe mittels HPLC.

Mit der Methode werden Nitrofurazon, Nitrofurantoin, Furazolidon, Furaltadon sowie die Cyanoderivate des Nitrofurazons und des Furazolidons bis zu $1 \mu\text{g}$ pro kg Gewebe (1 ppb) nachgewiesen.

Aufgrund der mutagenen und kanzerogenen Eigenschaften der Nitrofurane und insbesondere der im reduktiven Metabolismus entstehenden reaktiven Abbauprodukte wurde auch eine Übersicht über den Metabolismus und die Toxikologie der untersuchten Verbindungen gegeben.

Zur Überprüfung der entwickelten Nachweismethode wurde je ein Schwein mit Nitrofurazon und Furazolidon behandelt. Das Nitrofurazon konnte vor allem in der Leber mit 28,4 ppb, das Nitrofurazoncyanid hauptsächlich im Muskel mit 4,2 ppb und in der Leber mit 4,1 ppb nachgewiesen werden.

Das Furazolidon war mit 1,5 ppb in der Leber und 1,9 ppb in der Niere nur unbedeutend, das Furazolidoncyanid mit 6,2 ppb in der Niere und 8,0 ppb im Muskel dagegen deutlich nachweisbar.

Résumé

Une méthode basée sur la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est décrite pour la détermination quantitative des nitrofuranes et de deux cyano-métabolites dans la viande. Cette méthode est applicable à l'analyse de la nitrofurazone, de la nitrofurantoin, de la furazolidone, de la furaltadone et des cyano-métabolites de la nitrofurazone et de la furazolidone jusqu'à une limite de détection de $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ de tissus (1 ppb).

A cause des métabolites actifs et de leurs effets mutagènes et cancérigènes produits lors de la métabolisation des nitrofuranes, un résumé de la littérature concernant le métabolisme et la toxicité est présenté.

Pour vérifier l'efficacité de la méthode deux porcs ont été traités par voie orale avec de la nitrofurazone et de la furazolidone. La nitrofurazone était détectable dans le foie (28,4 ppb), le cyano-métabolite de la nitrofurazone dans le muscle (4,2 ppb) et dans le foie (4,1 ppb).

La furazolidone était détectable dans le foie (1,5 ppb) et dans les reins (1,9 ppb), le cyano-métabolite de la furazolidone dans les reins (6,2 ppb) et dans le muscle (8,0 ppb).

Summary

A high performance liquid chromatographic method for the determination of nitrofur derivatives and two cyano-metabolites in organic tissue is described. The method is suitable for the analysis of nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone, furaltadone and the cyano-metabolites of nitrofurazone and furazolidone at the 1 ppb level ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Because nitrofur derivatives are considered to have mutagenic and cancerogenic properties caused by toxic metabolites produced during metabolic reduction, a literature review of metabolism and toxicology is presented.

In order to test the method, two pigs were treated with nitrofurazone and furazolidone. Nitrofurazone was detected in liver (28.4 ppb), the cyano-metabolite in muscle (4.2 ppb) and in liver (4.1 ppb).

Traces of furazolidone were detected in liver (1.5 ppb) and in kidney (1.9 ppb), the cyano-derivative was found in kidney (6.2 ppb) and muscle (8.0 ppb).

Literatur

1. *Dinnendahl, V. und Fricke, U.*: Arzneistoff-Profile, Basisinformation über arzneiliche Wirkstoffe. Govi-Verlag GmbH, Pharmazeutischer Verlag, Frankfurt a. M. 1981.
2. *Fink-Gremmels, J.*: Nitrofuranderivate. DLG Kommission für pharmakologisch-toxikologische Fragen. Tischvorlage unveröffentlicht, München 1983.
3. *Goodman, A., Gilman, L., Goodman, S., Rall, T. W. and Murad, F.*: Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, 7th Edition. Macmillan Publishing Company, New York 1985.
4. *Kaemmerer, K.*: Gutachten über das Rückstandsverhalten von Furazolidon. Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Hochschule Hannover 1975.

5. *Dodd, M. C. and Stillman, W. B.*: The in-vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **82**, 11–18 (1944).
6. Eidgenössisches Departement des Innern: Verordnung über Fremd- und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln (Fremd- und Inhaltsstoffverordnung, FIV). Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1986.
7. *Gedek, W., Weber, U. und Terplan, G.*: Mikrobiologischer Nachweis von Nifurprazine in Körperflüssigkeiten und -geweben vom Rind. *Zbl. Vet. Med.* **23**, 346–349 (1976).
8. *Hoener, B., Lee, G. and Lundergan, W.*: High pressure liquid chromatographic determination of furazolidone in turkey tissue. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, **62**, 257–261 (1979).
9. *Sugden, E. A., Macintosh, A. and Vilim, A. B.*: High pressure liquid chromatographic determination of nitrofurazone and furazolidone in chicken and porc tissues. *J. Ass. off. analyt. Chem* **66**, 874–880 (1983).
10. *Winterlin, W., Hall, G. and Mourer, C.*: Ultra trace determination of furazolidone in turkey tissues by liquid partitioning and high performance liquid chromatography. *J. Ass. off. analyt. Chem.* **64**, 1055–1059 (1981).
11. *Laurensen, J. J. and Nouws, J. F. M.*: Simultaneous determination of nitrofurantoin derivatives in various animal substrates by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **472**, 321–326 (1989).
12. *Aufrère, M. B., Hoener, B. A. and Vore, M. E.*: Reductive metabolism of nitrofurantoin in the rat. *Drug Metab. Dispos.* **6**, 403–411 (1978).
13. *Schmid, A.*: Toxikologische Beurteilung von Nitrofuranderivaten. *Tierärztl. Prax.* **13**, 471–477 (1985).
14. *Tennent, D. M. and Ray, W. H.*: Metabolism of furazolidone in swine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **138**, 808–810 (1971).
15. *Klemencic, J. M. and Wang, C. Y.*: Mutagenicity of nitrofurans. In: Bryan, G. T. (ed.), *Nitrofurans: Chemistry, metabolism, mutagenesis, and carcinogenesis*. Raven Press, New York 1978.
16. *Tatsumi, K., Yamada, H., Yoshimura, H. and Kawazoe, Y.*: Metabolism of furazolidone by milk xanthine oxidase and rat liver 9000 g supernatant: Formation of a unique nitrofurantoin metabolite and an aminofuran derivative. *Arch. Biochem. Biophys.* **208**, 167–174 (1981).
17. *Kutcher, W. W. and McCalla, D. R.*: Aerobic reduction of 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone by rat liver xanthine dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 799–805 (1984).
18. *Swaminathan, S. and Lower, G.*: Biotransformation and excretion of nitrofurans. In: Bryan G. T. (ed.), *Carcinogenesis – A comprehensive survey* **4**, p. 59–98. Raven Press, New York 1978.
19. *Li, L. L.*: Metabolism of furaltadone: A pharmacokinetic study and characterization of its metabolites in milk/meat-producing animals. Dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign, 1978.
20. *Minchin, R. F., Ho, P. C. and Boyd, M. R.*: Reductive metabolism of nitrofurantoin by rat lung and liver in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 575–580 (1986).
21. *Tatsumi, K., Kitamura, S. and Yoshimura, H.*: Reduction of nitrofurantoin derivatives by xanthine oxidase and microsomes. Isolation and identification of reduction products. *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 131–137 (1976).
22. *Yeung, T.-C., Sudlow, G., Koch, R. L. and Goldman, P.*: Reduction of nitroheterocyclic compounds by mammalian tissues in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 2249–2253 (1983).
23. *Abraham, R. T., Knapp, J. E., Wong, L. K., Zemaitis, M. A. and Alvin, J. D.*: Reductive metabolism of furazolidone by *Escherichia coli* and rat liver in vitro. *Drug Metab. Dispos.* **12**, 732–741 (1984).

24. Vroomen, L. H. M., Berghmans, M. C. J., Van Leeuwen, P., Van der Struijs, T. D. B., De Vries, P. H. U. and Kuiper, H. A.: Kinetics of ¹⁴C-furazolidone in piglets upon oral administration during 10 days and its interaction with tissue macromolecules. *Food Additives and Contaminants* **3**, 331–346 (1986).
25. Vroomen, L. H. M., Berghmans, M. C. J., Hekman, P., Hoogenboom, L. A. P. and Kuiper, H. A.: The elimination of furazolidone and its open-chain cyano-derivative from adult swine. *Xenobiotica* **17**, 1427–1435 (1987).
26. Ou, T., Tatsumi, K. and Yoshimura, H.: Isolation and identification of urinary metabolites of AF-2 (3-(5-nitro-2-furyl)-2-(2-furyl)acrylamide) in rabbits, *biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**, 401–405 (1977).
27. Olivard, J., Rose, G. M., Klein, G. M. and Heotis, J. P.: Metabolic and photochemical hydroxylation of 5-nitro-2-furancarboxaldehyde derivatives. *J. Med. Pharm. Chem.*, **19**, 729 (1976).
28. Weber, H.: Zur Toxikologie der Nitrofuranrückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft, toxikologische Beurteilung der 5-Nitrofurane aufgrund von Literaturdaten. Institut für Toxikologie der ETH und der Universität Zürich 1984.
29. Tatsumi K., Ou T., Yoshimura, H. and Tsukamoto, H.: Metabolism of drugs. LXXIII. The metabolic fate of nitrofuran derivatives. (1). Studies on the absorption and excretion. *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 330 (1971).
30. Tatsumi, K., Ou, T., Yamada, H., Yoshimura, H., Koga, H. and Horiuchi, T.: Isolation and identification of the metabolite of N-(5-nitro-2-furfurylidene)-3-amino-2-oxazolidone (furazolidone). *J. Pharm. Dyn.* **1**, 256–261 (1978).
31. Austin, F. L.: Reduction of nitrofurazone with raney nickel. *Chem. & Ind.* **27**, 523 (1957).
32. Brander, Pugh & Bywater: *Veterinary applied pharmacology & therapeutics*, 4th Edition. Baillière Tindall, London, Philadelphia, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, Hongkong 1982.
33. Petz, M. und Meetschen, U.: Untersuchungen zur Gelchromatographie (GPC) als Reinigungsverfahren in der Rückstandsanalytik von Tierarzneimitteln. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **184**, 85–90 (1987).
34. Veale, H. S. and Harington, G. W.: Determination of furazolidone in swine plasma using liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **240**, 230 (1982).
35. Suortti, T. and Heinonen, K.: Simple and rapid analysis of nitrofurazone from blood, milk, urine and meat samples. *Chromatographia* **24**, 344–346 (1987).
36. Petz, M.: Verfahren zur rückstandsanalytischen Bestimmung von Furazolidon und vier weiteren Nitrofuranen in Eiern, Milch und Fleisch durch HPLC. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **78**, 396–401 (1982).
37. Yamamoto, H., Yamaoka, R. and Kohanawa, M.: Residue of furazolidone in swine administered orally. *Annual Reports of the National Veterinary Assay Laboratory* **15**, 57–61 (1978).

Dr. P. Schmid*
 Dr. A. E. Mooser
 Dr. H. Koch
 Bundesamt für Veterinärwesen
 Sektion Chemie
 Schwarzenburgstrasse 161
 CH-3097 Liebefeld

* neue Adresse:
 «Römer»-Apotheke
 CH-5600 Lenzburg