

Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 91 (2000)
Heft: 5

Artikel: Fluoreszenzdetektion von Dihydrostreptomycin und Streptomycin in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC und Nachsäulenderivatisation
Autor: Guggisberg, Dominik / Aeppli, Christoph / Koch, Herbert
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-981881>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 22.12.2024

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

Fluoreszenzdetektion von Dihydrostreptomycin und Streptomycin in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC und Nachsäulenderivatisierung

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

Eingegangen 8. August 2000, angenommen 5. September 2000

Einleitung

Dihydrostreptomycin (DHS) und Streptomycin (STR) gehören in die Familie der Aminoglycosid-Breitband-Antibiotika. Sie wirken gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien und werden sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin häufig eingesetzt. Dabei ist in der Veterinärmedizin praktisch ausschliesslich DHS alleine oder in Kombination mit Benzylpenicillin, Nafcillin und Flumethason bekannt. DHS wird nur langsam ausgeschieden und als Nebenwirkungen sind Ohren- und Nierenschädigungen bekannt. STR wird in der Schweiz gemäss Tierarzneimittelkompendium 1997/8 nicht als Tierarzneimittel eingesetzt.

Aus Kulturlösungen von *Streptomyces griseus* wird Streptomycin isoliert. Durch Reduktion der Aldehydfunktion kann Dihydrostreptomycin «semi-synthetisch» hergestellt werden (Abb. 1). Als Besonderheit innerhalb der Aminoglycosid-Antibiotika zählen die zwei Guanidinogruppen im Molekül der beiden Streptomycine STR und DHS.

Dihydrostreptomycin (Handelsnamen: Combisec, Streptopenicillin, Dihydrostreptomycin, Pen-Strep usw.) mit seinem breiten Wirkungsspektrum als Antibiotika ist in der Veterinärmedizin sowohl in der Therapie als auch in der Prophylaxe von Mastitis und anderen bakteriellen Infektionen stark verbreitet.

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

Generelle Wartezeiten sind wie folgt vorgeschrieben: Fleisch, Leber: 5–14 Tage, Niere, Injektionsstelle: bis 45 Tage

* Teil einer Praktikumsarbeit

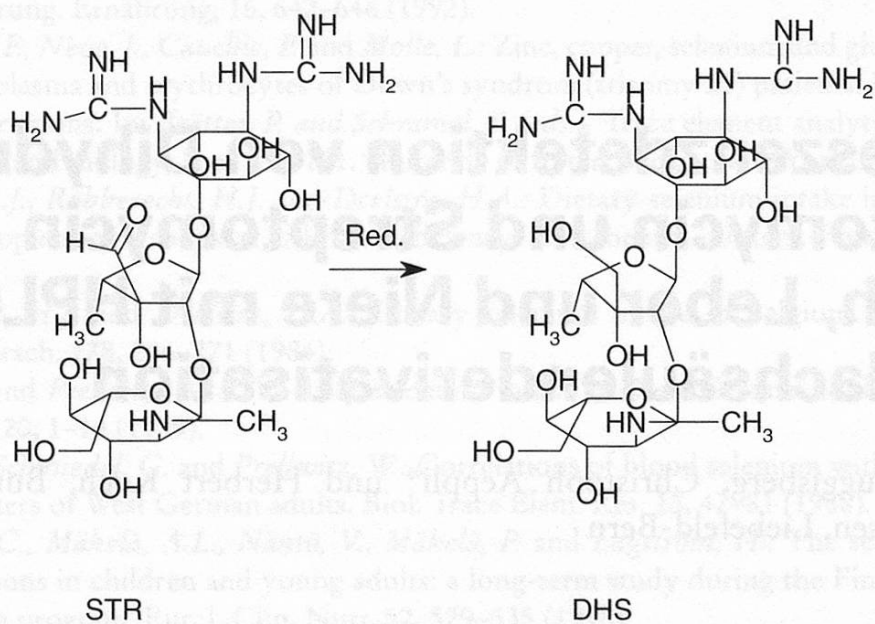


Abbildung 1 Chemische Strukturen von STR und DHS

In der Schweiz gilt gemäss der Fremd- und Inhaltsstoffverordnung (FIV 1998) für Streptomycin ein Grenzwert für Fleisch und Leber von 500 ppb und 1000 ppb für Niere (DHS ist nicht namentlich vermerkt).

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

Dihydrostreptomycin ist eine sehr polare Substanz, die aufgrund der Struktur recht thermo- und pH-stabil ist (Stabilitätsoptimum zwischen pH 3 und 7 (1)). Weder Streptomycin noch Dihydrostreptomycin selber besitzen einen UV-aktiven Chromophor oberhalb 220 nm, deshalb müssen sie zwingend zwecks Nachweis im UV- oder Fluoreszenzdetektor vorsäulen- oder nachsäulenderivatisiert oder im Massenspektrometer detektiert werden.

Bisher sind einige Arbeiten erschienen, die aufzeigen, wie Dihydrostreptomycin (DHS) und/oder Streptomycin (STR) in Milch, Fleisch und Innereien bestimmt werden können. Allgemein werden STR und DHS nach einem mehr oder weniger zeitaufwendigen «Clean up» mit 1,2-Naphthochinon-4-sulfonsäure (NQS) nachsäulenderivatisiert und im Fluoreszenzdetektor nachgewiesen, nach der Originalvorschrift von *Kubo et al.* (2) oder mit einem Massenspektrometer detektiert (3).

B. Shaikh et al. und *N. Isoherranen et al.* (4) geben einen Überblick, wie Aminoglycoside grundsätzlich aus Fleisch und Flüssigkeiten von Schlachttieren nachgewiesen werden können. *G. Gerhardt et al.* (5) zeigen den Nachweis von STR und DHS in Milch, Fleisch und Niere auf. Das Verfahren beruht auf der «on-line»-Pro-

benanreicherung und einem Fluoreszenznachweis mit Nachsäulenderivatisierung. Die Nachweisgrenze wird mit 10 ppb bzw. 20 ppb angegeben. *H. Abbasi et al.* (6) beschreiben eine HPLC-Methode, die darauf basiert, dass DHS aus Fleisch, Niere und Milch durch Ionenaustausch (SCX-SPE) gereinigt wird und anschliessend mit NQS nachsäulenderivatisiert wird. Die Nachweisgrenze liegt bei 10 bzw. 15 ppb. *P. Edder et al.* (7) haben kürzlich eine HPLC-Methode vorgestellt, bei der Streptomycin aus Fleisch, Leber, Milch und Honig durch Ionenaustausch (SCX-SPE), anschliessend auf einer C18-Kartusche aufgereinigt wird und nach der Trennung durch Ionenpaarchromatographie mit NQS nachsäulenderivatisiert wird. Die Nachweisgrenze liegt je nach Matrix bei 5–100 ppb.

J. Henion et al. (3) berichten über eine Aminoglycosid-Multianalysenmethode mit LC-MS-MS Detektion, hauptsächlich als Bestätigungsmethode eingesetzt. Dabei können neben STR und DHS, Gentamicin und Neomycin noch Spectinomycin und Hygromycin nachgewiesen werden. Als interner Standard wird Tobramycin verwendet. Für die Extraktion und Aufreinigung wird eine modifizierte MSPD-Methode mit Cyanopropyl-Material eingesetzt.

Wir berichten in der folgenden Arbeit von einer HPLC-Analysenmethode für DHS und STR in Fleisch, Leber und Niere vom Rind, Kalb und vom Schwein. Es geht in der Methode darum, DHS und STR mittels Ionenaustausch auf einer schwachen Kationentauschersäule (CBA) möglichst rein und quantitativ anzureichern, um es dann mit Ionenpaarchromatographie möglichst vollständig von der Fleischmatrix abzutrennen und durch Nachsäulenderivatisierung mit NQS sehr selektiv nachzuweisen. Das «Clean up» wurde auf einen hohen Probendurchsatz optimiert. Zudem ist bei positivem Befund geplant, die gleiche Analysenprobe nochmals (ohne weitere Reinigungsschritte) mit LC-MS zu bestätigen.

Kurzbeschreibung der Methode

Rind-, Kalb- und Schweinefleisch: Die Probe wird homogenisiert, mit wässriger Perchlorsäurelösung (20 ml) mittels Polytron behandelt und zentrifugiert. Der Überstand wird mit festem di-Kaliumhydrogenphosphat auf $\text{pH} = 6,8 \pm 0,3$ justiert und die rot-gelbe Lösung erneut zentrifugiert und anschliessend auf eine konditionierte CBA-SPE-Kartusche (schwacher Kationentauscher) appliziert. DHS und STR werden direkt mittels einer sauren Methanollösung eluiert, eingengt und in mobiler Phase aufgenommen. Die Analyse geschieht an einer Spezialsäule (Nucleosil AB) mittels Ionenpaar-Reagenzien. DHS und STR werden nach der Analyse mit NQS derivatisiert und mittels Fluoreszenzdetektor nachgewiesen. Erwartungsgemäss wird in Fleisch nur DHS detektiert, da nur dieses Tierarzneimittel zugelassen ist.

Bestätigungsmethode

Bei positivem Befund könnten die Proben nochmals mit LC-MS nachbestätigt werden. Es wäre aber durchaus denkbar, die hier vorliegende Arbeit auch als Bestä-

tigungsmethode nach einem immunchemischen Screening (8) oder nach dem Charm-Test zu verwenden.

Material und Methode

Standardsubstanz, Standardlösungen

Dihydrostreptomycinsulfat, Streptomycinsulfat

Lieferant der Substanz: Sigma D7253, S6501

Herstellung der Stammlösung und der Verdünnungslösungen:

(Die Wirkstoffkonzentration kann je nach Charge geringfügig schwanken, deshalb ist die Gehaltsangabe des Lieferanten wenn möglich zu beachten!)

DHS Stammlösung 12,5 mg Dihydrostreptomycinsulfat werden mit Wasser zu 10 ml gelöst (1 µg DHS/µl)

Standard I 100 µl der Stammlösung werden mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt (10 ng DHS/µl)

Standard II 1 ml des Standards I wird mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt (1 ng DHS/µl)

STR Stammlösung 12,5 mg Streptomycinsulfat werden mit Wasser zu 10 ml gelöst (1 µg STR/µl)

Standard I 100 µl der Stammlösung werden mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt (10 ng STR/µl)

Standard II 1 ml des Standards I wird mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt (1 ng STR/µl)

Chemikalien für das Clean up

- Wasser, Milli-Q (Millipore-Waters)
- Perchlorsäure (Merck z.A. 518, 60 %)
- K_2HPO_4 (Merck z. A.5099)
- Ameisensäure (p.a. Merck)
- Perchlorsäure = 0,01 M (1+ 899 = 1:900 verdünnt)
- 0,01 M Perchlorsäure mit festem K_2HPO_4 auf pH = 6,9 bringen
- Methanol (Merck, LiChrosolv)

Reagenzien für HPLC

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

Mobile Phase

A = Acetonitril

B = 0,05 mol/l (12,7 g/l) d,l-Campher-10-sulfonat und 20 mg EDTA in Wasser, mit 1M Salzsäure auf pH = 2,4 ± 0,3 eingestellt

Reagenzien für Nachsäulenderivatisierung

- 1,2-Naphthochinon-4-sulfonsäure Kaliumsalz (NQS, techn., 90%, Aldrich 18,918–9)
- Natriumhydroxid (Merck z. A. 6498)

Herstellung der Lösungen A und B für die Nachsäulenderivatisierung

Lösung A: (Die Lösung ist zu filtrieren und im Eisbad während der ganzen Chromatographiezeit zu kühlen)

- 20 mg NQS in 100 ml Wasser

Lösung B: (Die Lösung ist zu filtrieren)

- 2 g Natriumhydroxid in 100 ml Wasser

Die Weglängen der Teflonschläuche von T-Stück zum nächsten T-Stück bzw. bis zum Fluoreszenz-Detektor:

- A – B: 27 cm (Ø 0,25 mm)
- B – Detektor: 4 m (Ø 0,25 mm), bei 60 °C thermostatisiert mit Reaktionseinheit (z.B. Timberline)

Geräte und Hilfsmittel

- Probenzerkleinerungsgerät (Moulinex)
- Homogenisiergerät (Polytron) mit 12 mm-Mixstab
- Analysenwaage (0,1 mg, Mettler), Laborschnellwaage
- Zentrifuge (Hettich, Rotanta bis 4000 U/min)
- Magnetrührer mit Magnetrührstäbchen
- SPE Baker CBA, 7211–03, 3ml (Stehelin, Basel) oder IST-CBA (520–0050B), 500 mg/3ml
- Vakuumeinheit für SPE-Trennsäulen (J&W)
- Wasserstrahlvakuum
- 1000 µl-Spritze, 250 µl-Spritze, 100 µl-Spritze, 50 µl-Spritze (Hamilton)
- 1500 µl-Micro-Vials (HP)
- FLAWA-Milchfilter
- Millex GP Filter (Millipore)
- 10 ml Reagenzglas
- HPLC 600 E (Waters)
- Nachsäulenderivatisierung: z. B. Reaktionspumpe Hitachi 655A-13 mit Reaktionseinheit z. B. Timberline
- Autosampller (z. B. Gilson 231–401)

- Jasco FP920 Fluoreszenzdetektor
- Auswertestation Baseline (Waters)

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 g der Probe werden in ein Zentrifugenglas eingewogen und mit 20 ml 0,01M Perchlorsäurelösung (pH = 2) mittels Polytron behandelt. Es wird 15 min bei ca. 2900 g und 18° C zentrifugiert.

Die rot-gelbe Lösung wird durch einen FLAWA-Milchfilter in einen Messzylinder dekantiert und der Filter mit 2 ml Wasser nachgewaschen. Die rötliche Lösung wird mit ca. 180 mg festem K₂HPO₄ auf einen pH von 6,6–7,0 eingestellt. Darauf wird die leicht trübe Lösung erneut 10 min zentrifugiert (2900 g). Eine Filtration über Millex-GP kann zwar noch erfolgen, ist jedoch meist gar nicht nötig.

Reinigung der Probe

Eine CBA-SPE-Baker-Säule wird mit 5 ml MeOH, 5 ml Milli-Q-Wasser und 5 ml 0,01M Perchlorsäure/Phosphat-Puffer (pH = 6,9) vorkonditioniert. Der Probeextrakt wird anschliessend appliziert und wenn möglich ohne Vakuum laufen gelassen. (Achtung! Ein Verstopfen der Säule erzwingt meist ein Vakuum und die Recovery kann absinken.) Der Waschschrift beinhaltet 5 ml Wasser und 1 ml Methanol. Darauf wird die Säule für 3 min trocken gesaugt. Eluiert wird in ein RG mit 3 ml 5 % Ameisensäure/Methanol (immer frisch herstellen). Das Eluat wird mit Stickstoff bei 40° C zur Trockene eingengt, mit 3 ml mobiler Phase B gelöst, in ein Autosampler-Vial abgefüllt und davon 20 µl injiziert.

Analyse mit HPLC: Bedingungen, Vorgehen und Auswertung

Mobile Phase	A = 14–16% Acetonitril B = 86–84% (0.05 mol/l) d,l-Campher-10-sulfonatpuffer pH = 2,4 ± 0,3
Vorsäule	Nucleosil 5-C18-AB (5 µm)
Stationäre Phase	Nucleosil 5-C18-AB (5 µm) 125 mm×3 mm×5 µm
Fluss	0,6 ml/min
Ofentemperatur	45° C
Einspritzvolumen	20 µl
Elutionsdauer	10–15 min
Fluoreszenz-Detektor	Anregung/Emission: 260/435 nm oder 347/418 nm
Auswertestation	Baseline Millipore Waters

Nachsäulenderivatisierung mittels Merck-Hitachi 655A-13, Flow 0,15¹, der Reaktionsweg 2 (4 m) ist auf 60° C thermostatisiert.

Validierung der Methode

Tabelle 1
Wiederfindungen bei dotiertem Rindsmuskel

Rindsmuskel: ¹ dotierter Gehalt (ppb)	Anzahl	Mittelwert (ppb)	Standard- abweichung (ppb)	Relative Standard- abweichung (%)	Mittlere Wiederfindung (%)
500	5	402	51	13	80

¹ Die Methode wurde auch für Schweinemuskel getestet.

Aus der Abbildung 2 geht die Linearität der Standards hervor.

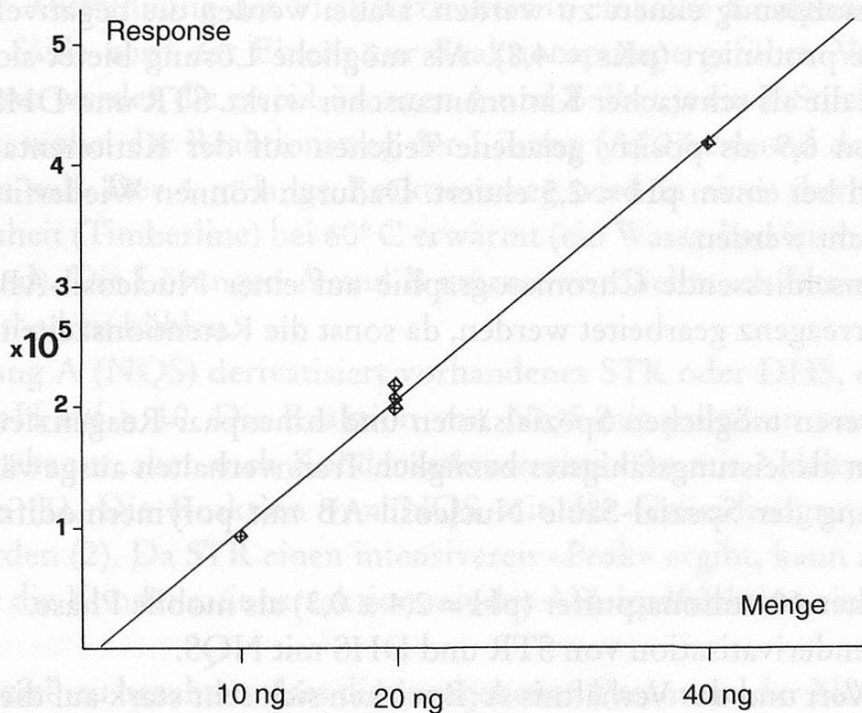


Abbildung 2 **Kalibrierkurve von DHS zur Auswertung über externen Standard**

Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze/Auswertung

Die probenbezogene Bestimmungsgrenze für DHS in Muskel liegt bei 150 ppb, die analytische Nachweisgrenze bei umgerechnet 50 ppb DHS. Es ist aber möglich, die Bestimmungsgrenze tiefer zu wählen, wenn die Probe in entsprechend weniger

¹ Ein Flow von 0,15 entspricht ca. 0,20 ml/min als Gesamtmenge der Lösungen A und B

mobiler Phase B aufgenommen wird oder mehr als 20 µl injiziert wird. Da die Grenzwerte gem. FIV aber sehr hoch liegen, ist die hier angegebene Bestimmungsgrenze für Kontrollzwecke ausreichend.

Die Auswertung der Resultate erfolgt über externen Standard. Dabei entsprechen 20 µl × 1 ng/µl (Standard II) genau 600 ppb DHS bei 100 % Wiederfindung.²

Diskussion

STR und DHS sind Aminoglycoside und wegen ihrer Struktur (Hydroxy-Gruppen, sekundäres Amin und Guanidinogruppen) sehr polar und daher nur in Wasser gut löslich. Die Reinigung und Konzentration von STR und DHS (aus einem Fleischextrakt) in einem organischen Lösungsmittel ist demnach nicht möglich. Es ist schwierig, die positive Ladung von STR und DHS zu neutralisieren. Es mussten mit starken Kationentauscher-Kartuschen bis 25 ml Eluierungslösung eingesetzt werden, um eine gute Recovery zu erhalten (7). Deshalb wurde hier ein «Clean up» entwickelt, bei dem STR und DHS auf einer schwachen Kationentauscher-Kartusche angereichert werden, um anschliessend mit möglichst wenig saurer Methanollösung eluiert zu werden. Dabei werden die negativen Positionen der Kartusche protoniert (pKs = 4,8). Als mögliche Lösung bietet sich die CBA-Kartusche an, die als schwacher Kationentauscher wirkt. STR und DHS werden bei einem pH von 6,9 als positiv geladene Teilchen auf der Kationentauscher-Säule gebunden und bei einem pH < 2,5 eluiert. Dadurch können Wiederfindungen von ca. 80 % erreicht werden.

Für die anschliessende Chromatographie auf einer Nucleosil-AB-Säule muss mit Ionenpaarreagenz gearbeitet werden, da sonst die Retentionszeiten viel zu kurz sind.

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

- Verwendung der Spezial-Säule Nucleosil-AB mit polymermodifiziertem C18 Material.
- d,l-Campher-10-sulfonatpuffer (pH = 2,4 ± 0,3) als mobile Phase.
- Nachsäulenderivatisierung von STR und DHS mit NQS.

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.

Dabei ist festzuhalten, dass STR und DHS nicht basisliniengetrennt werden (Abb. 3). In Anbetracht dessen, dass nur DHS für Tiere registriert ist, spielt dies eine untergeordnete Rolle. Es ist sinnvoll, nur DHS als Standard einzusetzen und mit Hilfe der Methode des externen Standards zu quantifizieren. Positive Proben

² Umrechnung:

100 ppb entsprechen 100 ng DHS pro Gramm Fleisch oder 500 ng DHS pro 5 Gramm Fleisch. Dies entspricht nach der Aufarbeitung von 5 Gramm Fleisch einer gesamten Flüssigkeitsmenge von 3000 µl. Davon werden 20 µl direkt ins HPLC-System eingespritzt.

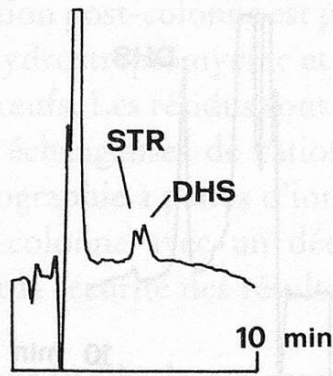


Abbildung 3 Chromatogramm: Muskelfleisch mit DHS und STR. Chromatographische Bedingungen siehe Text

sollten nachträglich mit der Standardadditionsmethode überprüft oder mit LC-MS bestätigt werden (9).

Nach der Auftrennung des Fleischextraktes in einzelne Komponenten auf der analytischen Säule wird der Eluent zur Reaktionspumpe geführt. Von der Reaktionspumpe aus werden die zwei Lösungen A und B über je ein T-Stück zum Eluenten gemischt, wobei der Reaktionsweg der Lösung (A) 27 cm und der Lösung (B) 4 m betragen soll. Der 4 m lange Reaktionsweg wird in einer thermostatisierten Reaktionseinheit (Timberline) bei 60°C erwärmt (ein Wasserbad ist möglicherweise auch genügend). Die Lösungen A und B müssen vor Gebrauch filtriert werden, A ist mittels Eisbad zu kühlen.

Die Lösung A (NQS) derivatisiert vorhandenes STR oder DHS, die Lösung B erhöht den pH auf > 10. Die Reaktion von NQS mit primären und sekundären Aminen ist bekannt, aber auch Kondensationsreaktionen mit Aldehyden/Ketonen sind möglich (1). Die Reaktion von NQS mit der Guanidinogruppe ist schon erwähnt worden (2). Da STR einen intensiveren «Peak» ergibt, kann angenommen werden, dass die Kondensationsreaktion mit der Aldehydfunktion eine wesentliche Rolle spielt.

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 DHS bzw. STR gegenüber der Fleischmatrix (Abb. 4–6). Wichtig ist die Analyse von Standards vor und nach der Messung von Proben. Die Nachweisempfindlichkeit kann wegen der Instabilität von NQS im Laufe von mehreren Stunden abnehmen!

Die Selektivität der Methode wurde durch Injektion einer ganzen Reihe von Tierarzneimitteln überprüft. Es waren keinerlei Interferenzen für folgende Substanzen zu bemerken: Apramycin, Kanamycin, Gentamicin, Neomycin, Amoxicillin, Ampicillin, 13 Sulfonamide, Spectinomycin und Spiramycin.

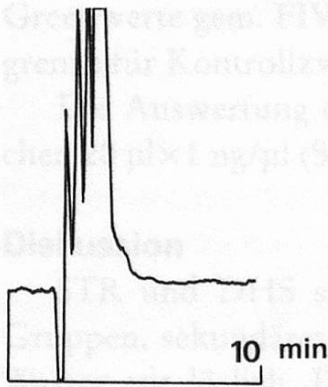


Abbildung 4
**Negative Muskel-
probe**

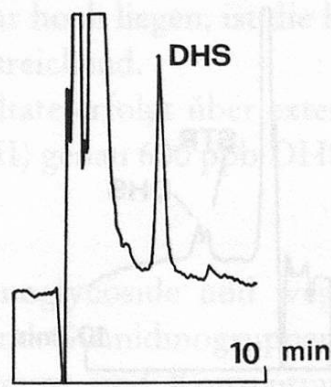


Abbildung 5
**Muskelprobe mit
700 ppb DHS dotiert**

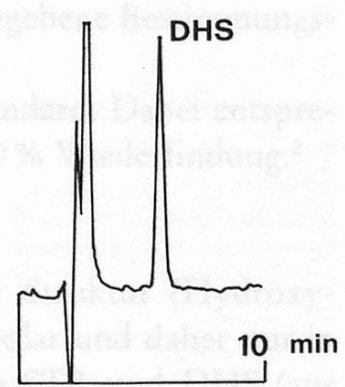


Abbildung 6
**Positive Leberprobe;
ca. 720 ppb DHS**

Leider konnten Streptomycin B und Streptonicozid³ nicht getestet werden, da diese Substanzen momentan nicht käuflich sind.

Vorläufige Resultate 1999/2000

Im Zeitraum von Oktober 1999–Dezember 1999 wurden 14 Schweinemuskel untersucht. Sämtliche Proben waren negativ.

Im Zeitraum vom Januar 2000–April 2000 wurden 30 Kalbslebern untersucht. Dabei wurden in neun Proben Peaks entdeckt, die sich mit LC-MS nicht als STR oder DHS identifizieren liessen. Weitere Abklärungen dazu sind im Gange. Es wäre denkbar, dass es sich um einen in der Leber bisher nicht bekannten Metaboliten handeln könnte.

Zusammenfassung

Es wird eine Nachsäulenderivatisations-Methode zur quantitativen Bestimmung von Dihydrostreptomycin und Streptomycin in Fleisch, Niere und Leber von Schweinen, Rindern und Kälbern beschrieben. Die Rückstände werden mit Perchlorsäure aus der Matrix extrahiert und an einer schwachen Kationentauscher-Kartusche aufgereinigt. Die Analyse wird mit HPLC an einer polymermodifizierten C-18-Säule und einem Ionenpaarreagenz durchgeführt. DHS und STR werden anschliessend mit NQS nachsäulenderivatisiert und im Fluoreszenzdetektor hochspezifisch detektiert und quantifiziert (Excitation: 260 oder 347 nm, Emission: 435 oder 418 nm).

Die Wiederfindung für DHS im Bereich 500 ppb für Leber beträgt 80%. Die Bestimmungsgrenze beträgt 150 ppb.

³ Für die chemischen Strukturen und Formeln siehe Merck Index 11. Ausgabe, Seite 1391

Résumé

Une méthode de dérivation post-colonne est présentée pour la détermination quantitative des résidus de dihydrostréptomycine et stréptomycine dans le muscle, le foie et le rein de porc et de bœufs. Les résidus sont extraits en milieu perchlorique et purifiés sur une cartouche échangeuses de cations. L'analyse est effectuée par HPLC à l'aide d'une chromatographie à paires d'ions et d'une colonne C18 modifiée. Une dérivation post-colonne avec un détecteur à fluorescence permet d'augmenter considérablement la sécurité des résultats (excitation: 260 ou 347 nm, émission: 435 ou 418 nm).

Le taux de récupération pour la dihydrostréptomycine pour une concentration de 500 ppb est de l'ordre de 80%. La limite de détermination est de 150 ppb.

Summary "Fluorescence Detection of Dihydrostreptomycin and Streptomycin in Meat, Liver and Kidney by HPLC and Post-column Derivatization"

A method is presented for the quantitative determination of dihydrostreptomycin (DHS) and streptomycin (STR) in muscle, liver and kidney from swine and beef. Residues are extracted from the matrix with perchloric acid and further clean up was achieved by a solid-phase extraction on a weak cation-exchanger column. DHS is separated from the matrix by reversed-phase HPLC on a C18-polymer modified column. DHS and STR are highly specifically detected and quantified after post-column derivatization and fluorescence detection (excitation: 260 or 347 nm, emission 435 or 418 nm).

The recovery for DHS at 500 ppb is about 80%. The limit of quantification is 150 ppb.

Key words

Dihydrostreptomycin, Streptomycin, Meat, Kidney, Liver, Post-column derivatization, Fluorescence detection

Literatur

- 1 Roth, H., Eger, K. und Troschütz, R.: Pharmazeutische Chemie II, Arzneistoffanalyse, 3. Auflage, Seite 358–362. Thieme-Verlag, Stuttgart 1990.
- 2 Kubo, H., Kobayashi, Y. and Kinoshita, T.: Fluorescence determination of streptomycin in serum by reversed-phase ion-pairing liquid chromatography. *Anal. Chem.* **58**, 2653–2655 (1986).
- 3 McLaughlin, L.G., Henion, J.D. and Kijak, P.J.: Multi-residue confirmation of aminoglycoside antibiotics and bovine kidney by ion spray high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* **23**, 417–429 (1994).
- 4 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).
Shaikh, B. and Moats, W.A.: Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. *J. Chromatogr.* **643**, 369–378 (1993).

- Isoherranen, N. and Soback, S.*: Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **82**, 1017–1045 (1999).
- 5 *Gerhardt, G.C., Salisbury, C.D.C. and MacNeil, J.D.*: Analysis of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **77**, 765–767 (1994).
- Gerhardt, G.C., Salisbury, C.D.C. and MacNeil, J.D.*: Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in animal tissue by on-line sample enrichment liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **77**, 334–337 (1994).
- 6 *Abbasi, H. and Hellenäs, K.-E.*: Modified determination of dihydrostreptomycin in kidney, muscle and milk by HPLC. *Analyst* **123**, 2725–2727 (1998).
- 7 *Edder, P., Cominoli, A. and Corvi, C.*: Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection. *J. Chromatogr. A*, **830**, 345–351 (1999).
- 8 *Schnappinger, P., Usleber, E., Märtelbauer, E. and Terplan, G.*: Enzyme immunoassay for the detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk. *Food and Agric. Immunol.* **5**, 67–73 (1993).
- 9 Methode in Bearbeitung

Korrespondenzadresse: Dr. Dominik Guggisberg, Bundesamt für Veterinärwesen, Sektion Chemie, Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern