Bestimmung von 12 Sulfonamiden in Fleisch und Nieren mittels HPLC und Nachsäulenderivatisierung = Determination of 12 sulfonamides in meat and kidney by HPLC and post column derivatisation

Autor(en): **Pacciarelli, B. / Reber, S. / Douglas, Ch.**

Objekttyp: **Article**

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

Band (Jahr): **82 (1991)**

Heft 1

PDF erstellt am: **31.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982404

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. **82**, 45–55 (1991)

B. Pacciarelli, S. Reber, Ch. Douglas, S. Dietrich und *R. Etter*,
Kantonales Laboratorium, Zürich

Bestimmung von 12 Sulfonamiden in Fleisch und Nieren mittels HPLC und Nachsäulenderivatisierung

Determination of 12 Sulfonamides in Meat and Kidney by HPLC and Post Column Derivatisation

Einleitung

Sulfonamide sind antibakteriell wirksame Arzneimittel, die sowohl in der Human- wie auch in der Veterinärmedizin weit verbreitet sind. Der Einsatz dieser Chemotherapeutika kann zu Rückständen in Lebensmitteln tierischer Herkunft führen. In der Schweiz beträgt der Toleranzwert für Sulfonamide gemäss der Verordnung über Fremd- und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln für Fleisch, Milch und Eier 100 µg/kg (für die Summe der Muttersubstanzen und der N^4-Acetylmetaboliten). Für eine Beurteilung von Lebensmitteln in bezug auf diesen Toleranzwert wird eine einfache und empfindliche Analysenmethode benötigt, die sich zur Routinekontrolle eignet.

In der Literatur sind bereits verschiedene Methoden zur Bestimmung von Sulfonamiden beschrieben worden (1, 2). *Wyhowski de Bukanski* et al. (3) entwikkelten eine Methode für den Nachweis von 16 Sulfonamiden mittels zweidimensionaler DC und anschliessender Derivatisierung mit Flurescamin. *Haagsma* und *van de Water* (4) bestimmten fünf verschiedene Sulfonamide in Schweinefleisch und Schweinenieren durch Extraktion und Reinigung des Rohextraktes mittels Festphasenextraktion an Kationenaustauschern mit anschliessender HPLC-Analyse. Eine wesentliche Steigerung der Selektivität und Empfindlichkeit in der Bestimmung von Sulfapyridin mittels HPLC erreichte *Sista* et al. (5) durch Nachsäulenderivatisierung mit Flurescamin.

Auf der Grundlage der oben erwähnten Arbeiten wurde eine Methode entwikkelt, die es erlaubt, mit grosser Selektivität und Empfindlichkeit sowie hohem Probendurchsatz 12 Sulfonamide (Abb. 1) in Fleisch und Nieren zu bestimmen.

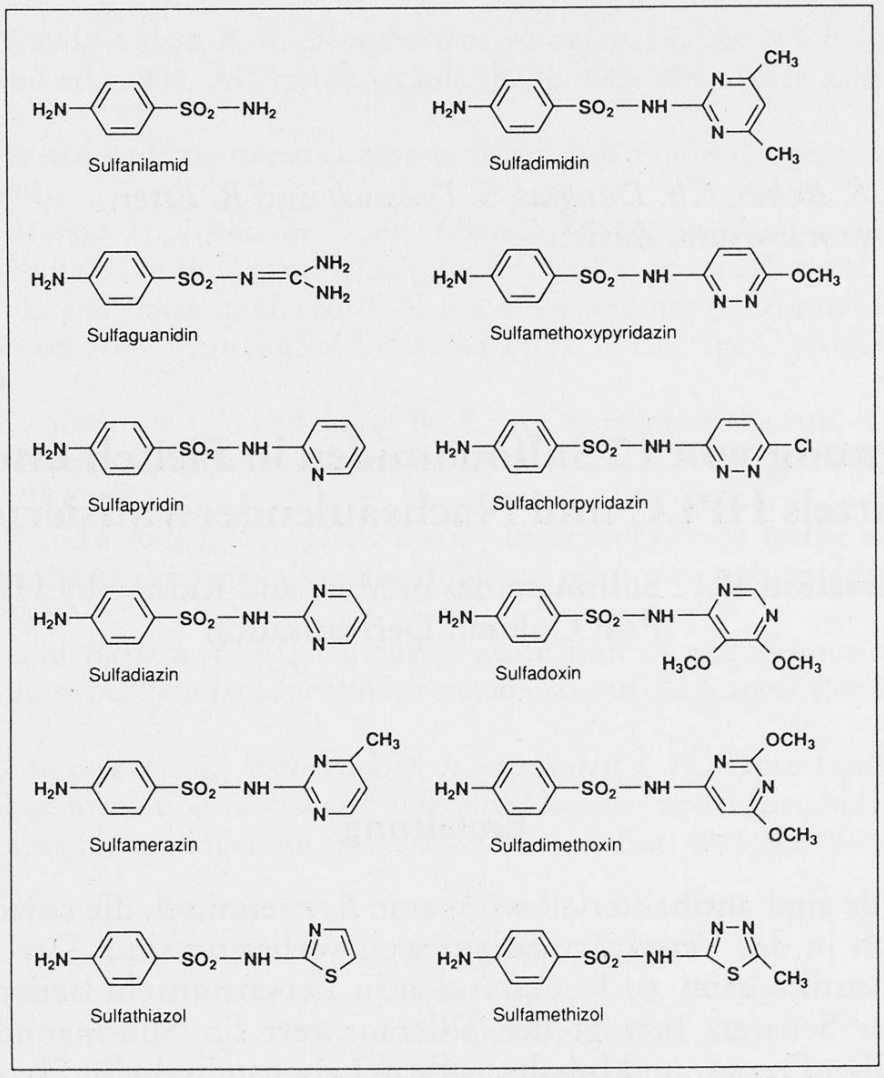

Abb. 1. Strukturen der 12 erfassten Sulfonamide

Experimentelles

Verwendete Geräte

- Kutter (cut-o-mat)
- HPLC-Niederdruckgradientenpumpe (Gynkotek Model 480)
- Autosampler (WISP, Waters)
- UV-Detektor (Kratos 783)
- Fluoreszenzdetektor (Merck-Hitachi F 1050)
- Zahnradpumpe (Ismatec MV-Z mit Zahnradpumpenkopf ZP-15/186)
- T-Stück (Stahl; Valco 65ZT1)
- 2-Kanal-Schreiber (Perkin-Elmer 561)
- Datensystem (Hewlett Packard, HP 1000, LAS 3357)

- Hochfrequenzhomogenisator (Polytron, Kinematika, Luzern)
- Zentrifugengläser (100 ml) mit Schraubverschluss
- 5-ml-Spitzkölbchen
- Ultraschallbad (Bransonic B 1200-3)
- Absaugvorrichtung Baker spe-21
- Kationenaustauscherkartusche Chromabond SA 500 mg (Macherey-Nagel)
  Konditionierung der Kartuschen:
  - Kartusche mit 6 ml Hexan spülen und 10 min am Vakuum trocknen lassen
  - mit 6 ml Dichlormethan/Aceton/Eisessig (10:10:1) spülen, jedoch Kartusche nicht trocken laufen lassen.

Reagenzien

- Aceton (z.A.; Merck Nr. 14)
- Dichlormethan (z.A.; Merck Nr. 6050)
- Hexan (z.A.; Merck Nr. 4367)
- Methanol (z.A.; Merck Nr. 6009)
- Acetonitril (für HPLC; Carlo Erba Nr. 412411)
- Ethanol (für HPLC; Carlo Erba Nr. 412522)
- Ammoniak konz. (z.A.; Merck Nr. 5432)
- Essigsäure konz. (z.A.; Merck Nr. 63)
- Mercaptoethanol (z.A.; Merck Nr. 15433)
- Puffer pH 5: 0,02 m Natriumacetat (z.A.; Merck Nr. 6267) mit Eisessig auf pH = 5 eingestellt
- Puffer pH 3: 0,02 m Natriumdihydrogenphosphat (z.A.; Merck Nr. 6346) mit 1 m Phosphorsäure auf pH = 3 eingestellt
- Fluram® (Flurescamin p.A.; SERVA Nr. 21551)
  Fluramlösung: 25 mg Fluram® in 25 ml Acetonitril lösen und mit 75 ml Puffer pH 3 und 0,2 ml Mercaptoethanol ergänzen (erhöht die Stabilität der Fluramlösung (3)).

Referenzsubstanzen

Sulfaguanidin (Serva 35640), Sulfanilamid (Serva 35670), Sulfadiazin (Serva 35633), Sulfathiazol (Serva 35690), Sulfapyridin (Serva 35680), Sulfamerazin (Serva 35650), Sulfamethizol (Sigma S-5632), Sulfadimidin (Serva 35635), Sulfamethoxypyridazin (Sigma S-7257), Sulfachloropyridazin (Sigma S-9882), Sulfadoxin, Sulfadimethoxin (Sigma S-7007).

Standardlösungen: Stammlösungen 1000 mg/l in Acetonitril. Mischung der 12 Sulfonamide von 0,1 mg/l (bezogen auf die einzelnen Wirkstoffe) durch zweimaliges Verdünnen der Stammlösungen in Laufmittel A der HPLC.

Aufarbeitung

10 g der mit dem Kutter homogenisierten Probe wird in ein 100-ml-Zentrifugenglas gegeben, mit 60 ml Dichlormethan/Aceton (1:1) versetzt und 30 Sekunden lang am Polytron homogenisiert. Danach wird der Polytronstab mit 2–3 ml Extraktionsmittel abgespült und das Homogenat 10 min bei 2500 U/min zentrifugiert. Die organische Phase wird durch Watte filtriert und der Filterrückstand mit wenig Dichlormethan/Aceton (1:1) nachgewaschen.

Das Filtrat wird mit 5 ml Eisessig versetzt und 1/10 des Extraktes über eine konditionierte Kationenaustauscherkartusche (siehe *verwendete Geräte*) gesogen (ca. 2 ml/min). Dabei soll die Kartusche nicht trocken laufen. Die Kartusche wird mit 5 ml Wasser und 5 ml Methanol gewaschen und anschliessend während 10 min am Vakuum getrocknet.

Danach wird Ammoniakgas durch die Kartusche geleitet, bis die Säure vollständig neutralisiert ist. Zur Kontrolle wird Luft durch die Kartusche geblasen. Ein angefeuchtetes pH-Papier am Ausgang der Kartusche sollte sich dabei blau färben. Danach werden die Sulfonamide mit 3 ml Methanol (1–2 ml/min) in ein 5-ml-Spitzkölbchen eluiert und das Eluat am Rotationsverdampfer (40 °C/100 mbar) vorsichtig eingeengt. Der Rückstand wird in 0,5 ml Laufmittel A aufgenommen, die unlöslichen Anteile abzentrifugiert und der klare Überstand zur HPLC-Analyse eingesetzt.

HPLC-Bedingungen

Säule:	LiChroCART 125-4 Stahlkartusche gefüllt mit LiChrospher 100 RP-18 5 µm (Merck Nr. 50943)
Eluent:	Laufmittel A 5,5% Acetonitril in Puffer pH 5 Laufmittel B 50% Acetonitril + 10% Ethanol + 40% Puffer pH 5
Gradient:	(Abb. 2)
Fluss:	0,8 ml/min
Wellenlänge:	UV 270 nm Range: 0,01 Aufs Fluoreszenz λ_{Ex} 395 nm λ_{Em} 495 nm
Injektionsvol.:	50 µl
Laufzeit:	46 min

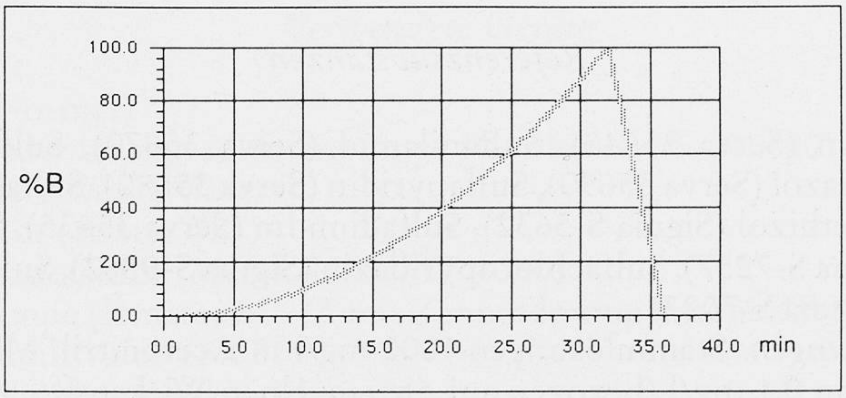

Abb. 2. Gradientenprogramm

Nachsäulenderivatisierung

Nach der chromatographischen Trennung der Sulfonamide und anschliessender UV-Detektion wird dem Eluenten eine eisgekühlte Fluram®-Lösung (siehe *Reagenzien*) mit einer Zahnradpumpe (Fluss: 0,3 ml/min) über ein T-Stück zudosiert. Das Reaktionsgemisch wird durch eine Schleife (2,3 m x 0,5 mm I.D./ 1/16" O.D.; Innenvolumen 0,45 ml), die in ein gekühltes Ultraschallbad getaucht ist, zum Fluoreszenzdetektor geführt. Das Ultraschallbad wird durch eine mit Leitungswasser durchströmte Spirale aus 2 mm I.D. Stahlrohr gekühlt (Abb. 3).

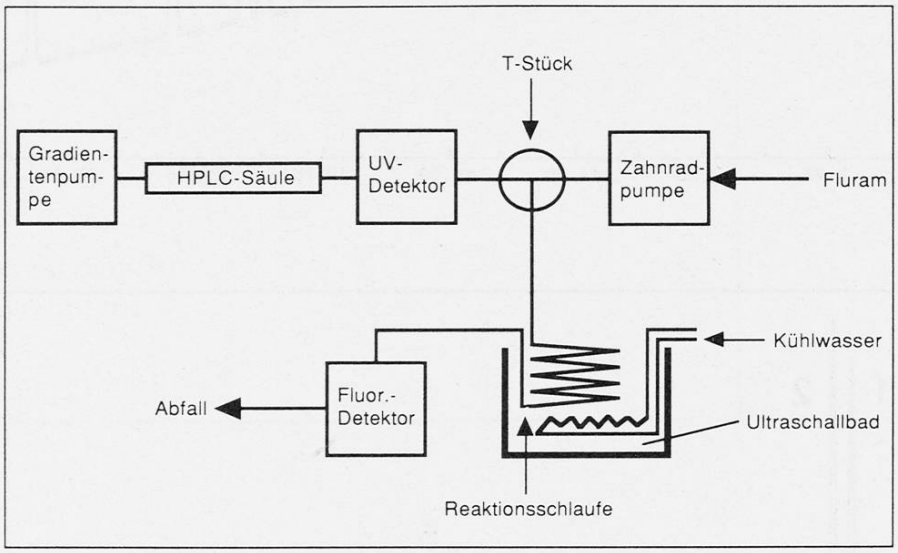

Abb. 3. Schema der Nachsäulenderivatisierung

Resultate und Diskussion

Abbildung 4 zeigt die HPLC-Trennung der 12 Sulfonamide anhand eines Standardgemisches. Aus dem Fluoreszenz-Chromatogramm ist ersichtlich, dass die Peakverbreiterung durch die Nachsäulenderivatisierung so gering gehalten werden konnte, dass die Trennung der 12 Sulfonamide nicht beeinträchtigt ist.

Ein kleinerer Innendurchmesser der Reaktionsschleife würde die Peakverbreiterung reduzieren, doch müsste dann an Stelle der Zahnradpumpe eine Pumpe gewählt werden, die einen höheren Gegendruck erlaubt. Die Vorteile der Zahnradpumpe liegen bei der pulsationsfreien Förderung bis zu einem Gegendruck von ca. 8 bar, der geringen Störanfälligkeit und dem relativ günstigen Anschaffungspreis. Diese Vorteile der Zahnradpumpe und die mit ihr erzielten Resultate genügten uns, auf eine weitere Verringerung des Schleifeninnendurchmessers zu verzichten.

Des weiteren zeigt das Fluoreszenzchromatogramm, dass die Signale der später eluierten Sulfonamide kleiner werden, was zum einen durch die unterschiedliche relative Fluoreszenz der Sulfonamidderivate (Tabelle 1), zum anderen durch die Herabsetzung der Fluoreszenz wegen der Zunahme des organischen Anteils in der mobilen Phase durch den Gradienten bedingt ist.

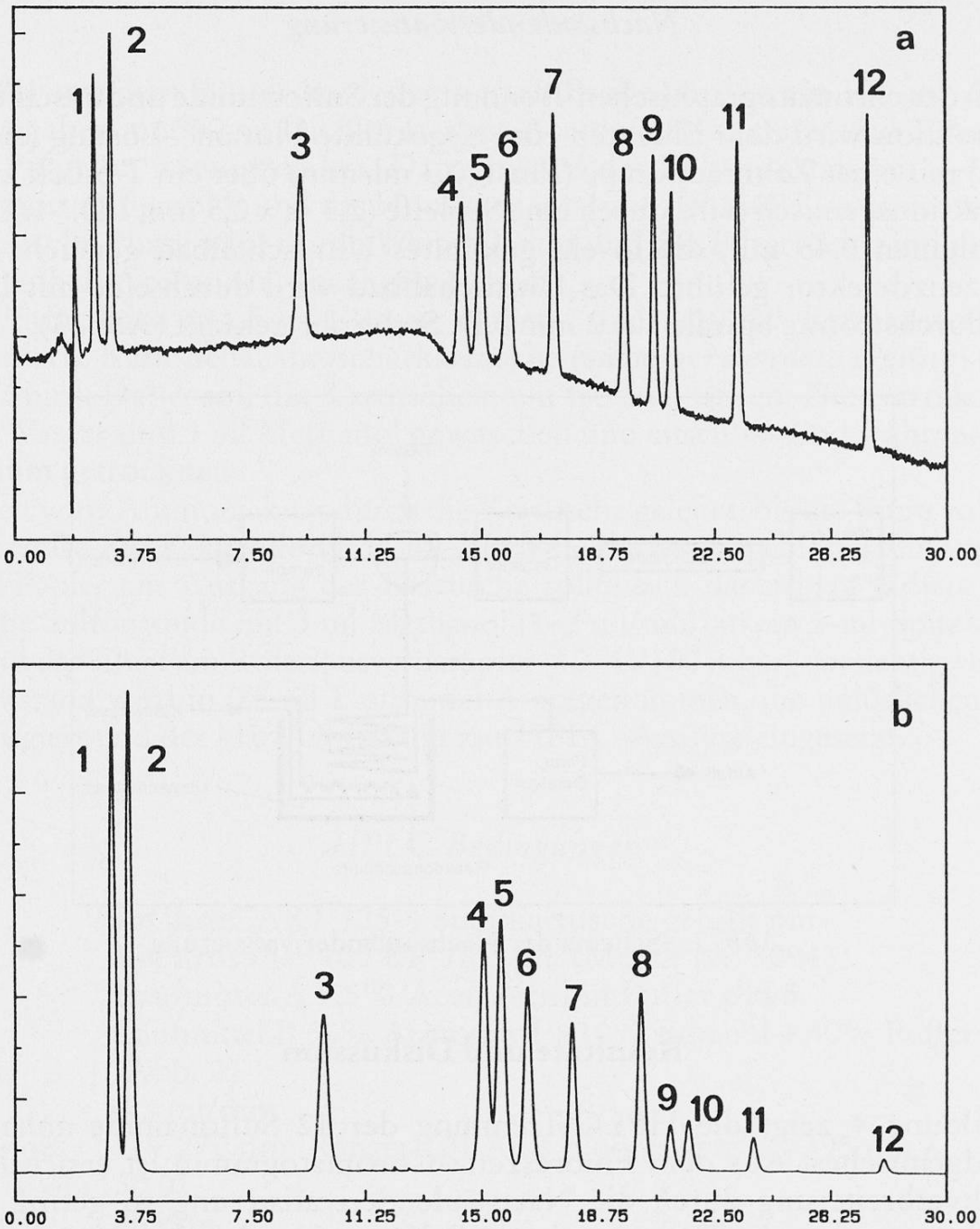

Abb. 4. Chromatogramm einer Standardlösung mit je 0,1 mg/l der einzelnen Sulfonamide
a = UV-Detektion, b = Fluoreszenzdetektion
Abszisse der Chromatogramme: Zeit in Minuten

1 = Sulfaguanidin	5 = Sulfapyridin	9 = Sulfamethoxypyridazin
2 = Sulfanilamid	6 = Sulfamerazin	10 = Sulfachlorpyridazin
3 = Sulfadiazin	7 = Sulfamethizol	11 = Sulfadoxin
4 = Sulfathiazol	8 = Sulfadimidin	12 = Sulfadimethoxin

Dank der hohen Empfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors kann das Chromatogramm auch mit einer 10mal geringeren Abschwächung gegenüber Abbildung 4 gemessen werden. Das Signal-/Rausch-Verhältnis für Sulfadimethoxin (12) beträgt

Tabelle 1. Relative Fluoreszenz der 12 Sulfonamide bezogen auf Sulfanilamid
Die Tabelle basiert auf der Messung der Fluoreszenz einer Mischung der einzelnen Sulfonamid-Standardlösungen (0,1 mg/l Laufmittel in A) mit Fluramlösung (250 mg/l). Die beiden Lösungen wurden im Verhältnis 8:3 gemischt, welches dem Volumenstromverhältnis der Nachsäulenderivatisierung entspricht

	rel. Fluoreszenz %
Sulfaguanidin (1)	86
Sulfanilamid (2)	100
Sulfadiazin (3)	53
Sulfathiazol (4)	79
Sulfapyridin (5)	86
Sulfamerazin (6)	71
Sulfamethizol (7)	55
Sulfadimidin (8)	79
Sulfamethoxypyridazin (9)	23
Sulfachlorpyridazin (10)	28
Sulfadoxin (11)	38
Sulfadimethoxin (12)	43

bei dieser Verstärkung und einer Einspritzmenge von 5 ng noch 1:40. Damit wird auch für die Sulfonamide 9–12 eine ausreichende Empfindlichkeit erreicht.

Das Eintauchen der Reaktionsschleife in ein Ultraschallbad trägt entscheidend zur Reproduzierbarkeit der Chromatogramme bei. Es ist jedoch darauf zu achten, dass die Temperatur des Ultraschallbades nicht wesentlich über 20 °C steigt, da sonst kleinere Derivatisierungsausbeuten erzielt werden. Durch die in das Ultraschallbad eingetauchte Kühlspirale kann die Temperatur auf einfache Art und Weise zwischen 18 und 20 °C gehalten werden.

Chromatogramme einer Fleisch- und Nierenprobe, die je mit 50 ppb der einzelnen Sulfonamide versetzt wurden (Abb. 5 und 6), zeigen die hohe Selektivität, die sich durch die Derivatisierung der Sulfonamide und Fluoreszenzdetektion ergibt. Im UV-Chromatogramm sind mehrere Sulfonamide von Verunreinigungen überlagert, womit eine Quantifizierung nur für wenige Sulfonamide möglich ist. Zudem zeigt sich, dass die Empfindlichkeit des UV-Detektors für die Überprüfung des Toleranzwertes bezüglich der Summe der Muttersubstanzen der Sulfonamide nur bedingt ausreicht.

Mit dem Fluoreszenzdetektor werden nur wenige Verunreinigungen erfasst, welche die Quantifizierung der Sulfonamide nicht stören. Zudem zeichnet sich das Fluoreszenzchromatogramm auch nach mehreren Einspritzungen von Probeextrakten durch eine stabile Basislinie aus (im Gegensatz zum UV-Chromatogramm).

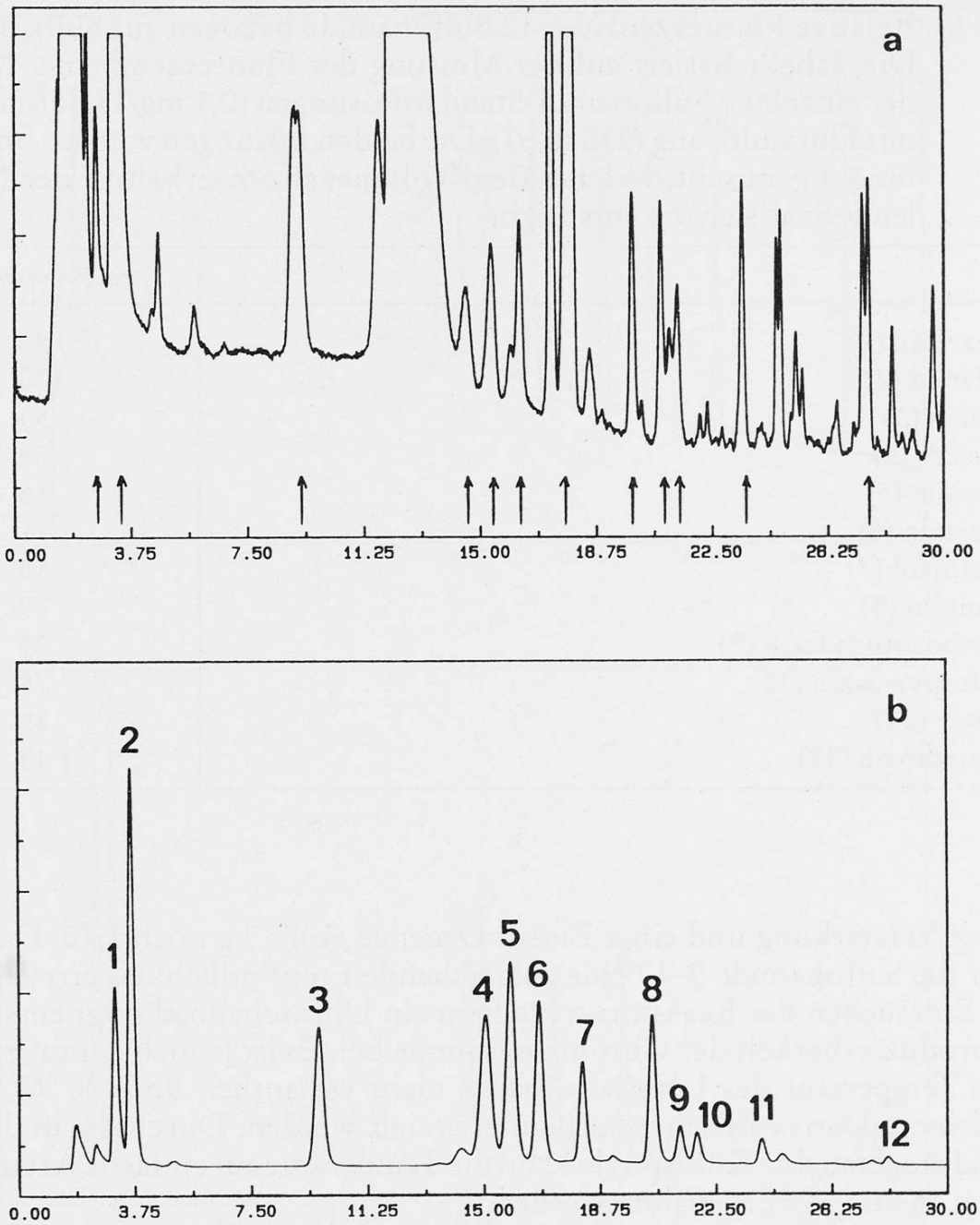

Abb. 5. Chromatogramm einer Schweinefleischprobe mit einem Sulfonamid-Zusatz von 50 ppb
a = UV-Detektion. Die Pfeile markieren die Stellen, an denen die Sulfonamide eluieren
b = Fluoreszenzdetektion

1 = Sulfaguanidin	5 = Sulfapyridin	9 = Sulfamethoxypyridazin
2 = Sulfanilamid	6 = Sulfamerazin	10 = Sulfachlorpyridazin
3 = Sulfadiazin	7 = Sulfamethizol	11 = Sulfadoxin
4 = Sulfathiazol	8 = Sulfadimidin	12 = Sulfadimethoxin

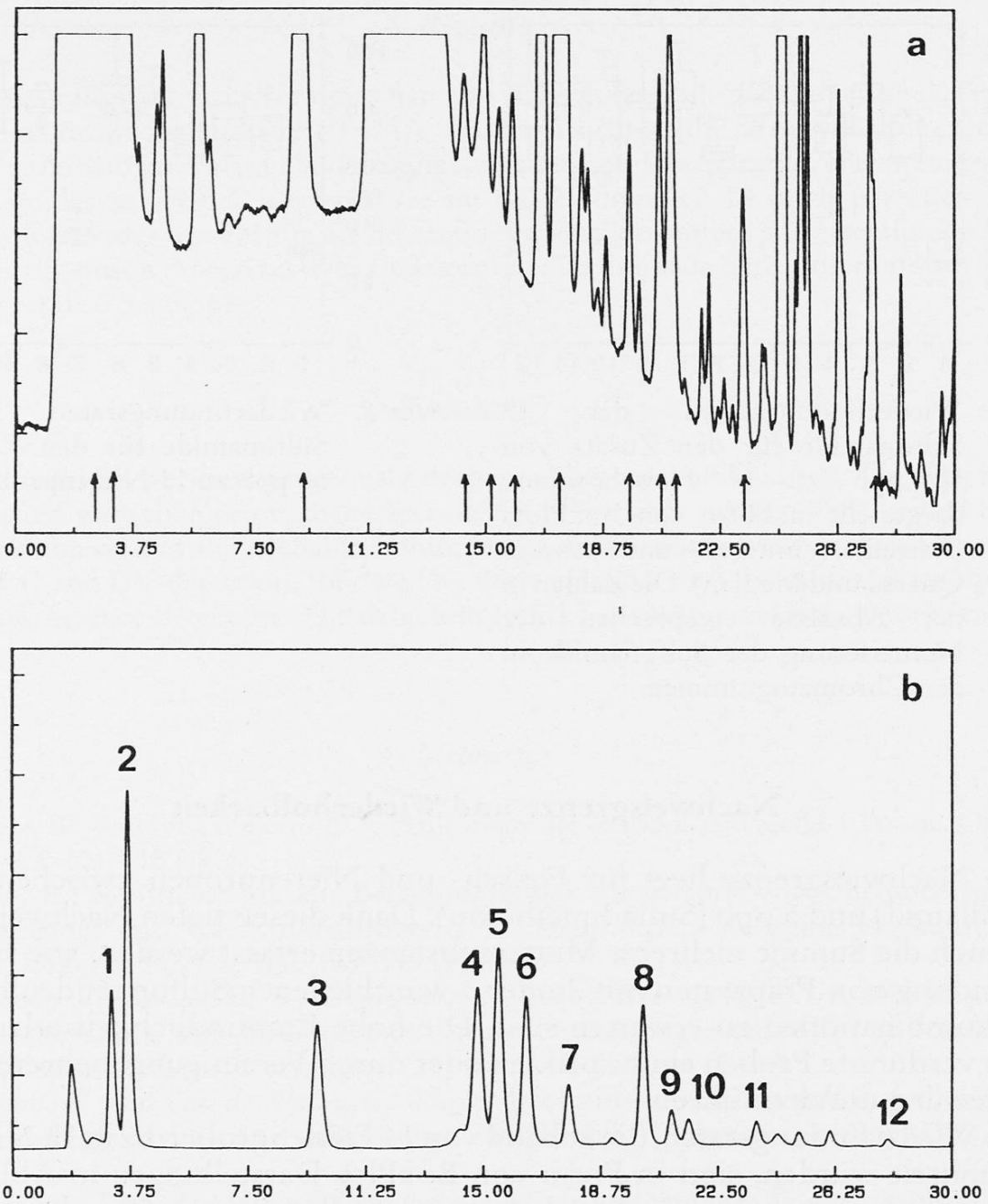

Abb. 6. Chromatogramm einer Schweinenierenprobe mit einem Sulfonamid-Zusatz von 50 ppb

a = UV-Detektion. Die Pfeile markieren die Stellen, an denen die Sulfonamide eluieren

b = Fluoreszenzdetektion

1 = Sulfaguanidin	5 = Sulfapyridin	9 = Sulfamethoxypyridazin
2 = Sulfanilamid	6 = Sulfamerazin	10 = Sulfachlorpyridazin
3 = Sulfadiazin	7 = Sulfamethizol	11 = Sulfadoxin
4 = Sulfathiazol	8 = Sulfadimidin	12 = Sulfadimethoxin

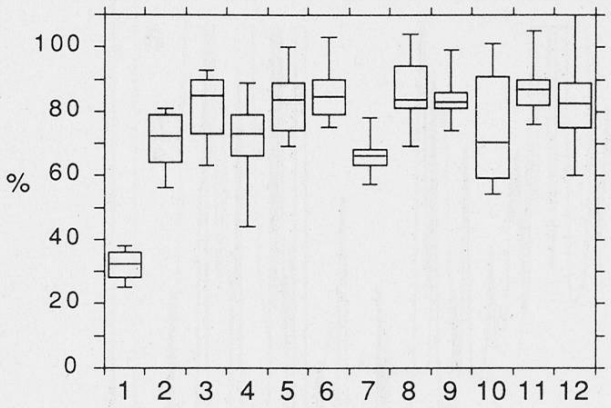

Abb. 7. Wiederfindungsraten der 12 Sulfonamide für den Zusatz von 50 ppb zu 14 Fleischproben, dargestellt in Form von BoxPlots (Extrema, unterer und oberer Quartil und Median). Die Zahlen in der Abszisse entsprechen der Numerierung der Sulfonamide in den Chromatogrammen

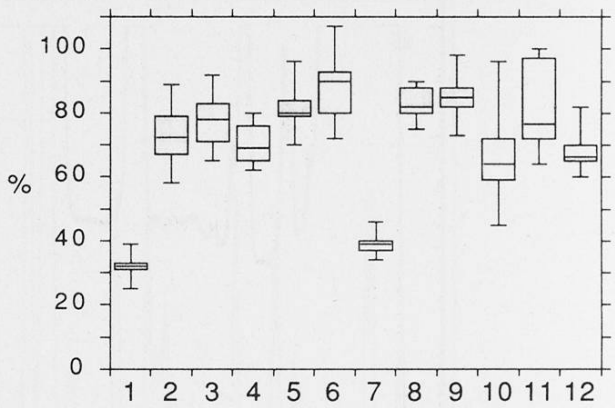

Abb. 8. Wiederfindungsraten der 12 Sulfonamide für den Zusatz von 50 ppb zu 13 Nierenproben

Nachweisgrenze und Wiederholbarkeit

Die Nachweisgrenze liegt für Fleisch- und Nierenproben zwischen 0,5 ppb (Sulfanilamid) und 5 ppb (Sulfadimethoxin). Dank diesen tiefen Nachweisgrenzen kann auch die Summe mehrerer Muttersubstanzen erfasst werden, wie sie bei der Verwendung von Präparaten mit 2 oder 3 verschiedenen Sulfonamiden bzw. Präparatekombinationen zu erwarten sind. Die hohe Empfindlichkeit erlaubt auch, stärker verdünnte Proben einzuspritzen oder durch Vereinigung mehrerer Proben ein Screening durchzuführen.

Die Wiederfindungsraten, die anhand von 14 Fleischproben bzw. 13 Nierenproben ermittelt wurden, sind in Form von BoxPlot-Darstellungen in Abbildung 7 und 8 wiedergegeben. Die Zusätze betrugen bei allen Proben 50 ppb pro Sulfonamid.

Zusammenfassung

12 Sulfonamide werden in Fleisch und Nieren durch Extraktion der Proben mit Dichlormethan/Aceton 1:1 bestimmt. Der Rohextrakt wird mittels Festphasenextraktion an einer Kationenaustauscherkartusche gereinigt. Die chromatographische Trennung der Sulfonamide durch HPLC erfolgt an einer RP-18-Säule mit anschliessender UV-Detektion. Danach werden die Sulfonamide durch eine Nachsäulenderivatisierung mit Flurescamin und anschliessender Fluoreszenzdetektion quantifiziert. Für Routineuntersuchungen liegt die Nachweisgrenze bei 0,5 bis 5 ppb.

Résumé

12 sulfonamides ont été déterminés dans la viande et les reins par extraction des échantillons avec dichlorométhane/acétone 1:1. L'extrait brut a été purifié au moyen d'une extraction de la phase solide sur une cartouche d'échangeur de cations. La séparation chromatographique des sulfonamides par HPLC a été réalisée sur une colonne RP-18 suivie par une détection UV. Les sulfonamides ont ensuite été déterminés quantitativement par détection de fluorescence après obtention de dérivés avec flurescamine. La limite de détection pour des analyses de routine est de 0,5 à 5 ppb.

Summary

12 sulfonamides were simultaneously determined in meat and kidney. The drug residues were extracted with dichloromethane/acetone 1:1. The crude extract was purified by solid phase extraction on a cation exchange column. The sulfonamides were analysed by reversed phase HPLC and UV-detection, followed by derivatisation with flurescamine and quantitation by fluorescence detection. The detection limits for routine analysis were between 0.5 and 5 ppb.

Literatur

1. *Horwitz, W.*: Analytical methods for sulfonamides in foods and feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **64**, 104–130 (1981).
2. *Malisch, R.*: Multimethode zur Bestimmung der Rückstände von Chemotherapeutica, Antiparasitica und Wachstumsförderern in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **182**, 385–399 (1986).
3. *Wyhowsky de Bukanski, B., Degroodt, J.-M.* and *Beernaert, H.*: A two-dimensional high-performance thin-layer chromatographic screening method for sulfonamides in animal tissues. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **178**, 242–245 (1988).
4. *Haagsma, N.* and *van de Water, C.*: Rapid determination of five sulfonamides in swine tissue by high-performance liquid chromatography. J. Chromatography **333**, 256–261 (1985).
5. *Sista, H. S., Dye, D. M.* and *Leonard, J.*: High-performance liquid chromatographic method for determination of sulfapyridine in human saliva using post-column, in-line derivatisation with fluorescamine. J. Chromatography **273**, 464–468 (1983).

B. Pacciarelli
Kantonales Laboratorium
Postfach
CH-8030 Zürich