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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 86 (1995)

Heft: 4

Artikel: Methode zur fluorimetrischen Bestimmung von Neomycin in der Niere und in der Leber mit HPLC und Nachsäulenderivatisation = Method for the fluorimetric determination of neomycin in kidney and liver by HPLC and post-column derivatization

Autor: Guggisberg, Dominik / Koch, Herbert

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-983639

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. 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. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

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. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

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. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 09.12.2025

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

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **86,** 449–457 (1995)
Eingegangen 30. Mai 1995. Angenommen 7. Juni 1995

Methode zur fluorimetrischen Bestimmung von Neomycin in der Niere und in der Leber mit HPLC und Nachsäulenderivatisation

Method for the Fluorimetric Determination of Neomycin in Kidney and Liver by HPLC and Post-column Derivatization

Key words: Neomycin, Kidney, Liver, Post-column derivatization, Fluorescence detection, o-Phthaldialdehyd

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

Einleitung

Neomycin gehört in die Familie der Aminoglycosid-Breitband-Antibiotika, wirkt gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und wird sowohl in der Human- sowie in der Veterinärmedizin häufig eingesetzt (Abb. 1). Neomycin soll sich speziell in der Niere anreichern (1). Neomycin (Handelsnamen: Biosol, Emorex K, Neomycin-Penicillin, Quadrex, Vetmix ...) mit seinem breiten Wirkungsspektrum als Antibiotikum und seiner hervorragenden Stabilität ist in der Veterinärmedizin sowohl in der Therapie von bakteriellen Infektionen als auch in der Prophylaxe und zur Effizienzsteigerung der Futteraufnahme stark verbreitet. Rückstände dieses Arzneimittels in der Milch und im Fleisch (speziell in der Leber und der Niere) können für den Konsumenten eine potentielle gesundheitliche Gefahr darstellen (Resistenzbildung).

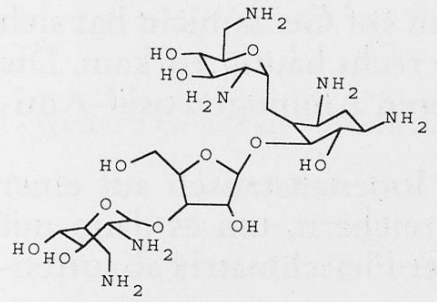


Abb. 1. Chemische Struktur von Neomycin B

Generelle Wartezeiten sind z. B. für Neomycin-Penicillin wie folgt vorgeschrieben: Milch: 3 Tage / Fleisch und übrige Organe: 5 Tage / Niere und Injektionsstelle: 45 Tage.

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

Für den Toleranzwert gilt der EG-4-Plattentest: Hemmzone 2 mm auf einer der 4 Platten. Für den Grenzwert gilt der B-subtilis-Test: Hemmzone 4 mm bei pH = 6. Neuerdings werden aber auch weit empfindlichere Tests für Neomycin empfohlen, die sich auf HPLC stützen.

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

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

Bisher sind ein paar Arbeiten erschienen, die aufzeigen, wie Neomycin grundsätzlich durch Vor- oder Nachsäulenderivatisierung nachgewiesen (2, 3) und wie Neomycin in der Milch (4, 5) bestimmt werden kann. Für den Nachweis von Neomycin in Fleisch und Innereien sind ebenfalls einige Publikationen erschienen (6–8). *B. Shaikh* et al. (6) beschreiben eine HPLC-Methode für den Nachweis von Neomycin aus Fleisch mit Ionenpaarchromatographie und Nachsäulenderivatisation mit o-Phthaldialdehyd (OPA). Dabei wird Neomycin von Streptomycin und Dihydrostreptomycin selektiv abgetrennt. *B. Shaikh* und *J. Jackson* (7) zeigen in einer neueren und verbesserten Studie, wie Neomycin aus Nieren nachgewiesen wird. Die Methode beruht ebenfalls auf der Ionenpaarchromatographie mit Nachsäulenderivatisation. Die Methode kann Neomycin von Streptomycin und Dihydrostreptomycin unterscheiden, jedoch kann Gentamicin C_{1a} nicht von Neomycin getrennt werden. *F. Schenck* (8) hat eine MSPD-Methode für den Nachweis von Neomycin in Niere entwickelt. MSPD bedeutet «matrix solid phase dispersion» und ist eine neuere Technik in der Extraktion von Arzneimittelstoffen aus tierischen Geweben, die von *Barker* et al. (9) entwickelt wurde.

Wir berichten in der folgenden Arbeit von einer HPLC-Analysenmethode für Neomycin in der Niere und der Leber von Grossvieh, Rind, Kalb und vom Schwein. Die Methode basiert auf jener für Gentamicin, die von uns unter (10) beschrieben ist. Im Verlaufe von Routineuntersuchungen auf Gentamicin hat sich nämlich gezeigt, dass ein zunächst unbekannter «Peak» recht häufig vorkam. Die Abklärung des Sachverhaltes durch Vergleich mit weiteren Aminoglycosid-Antibiotika hat die Identifikation von Neomycin ergeben.

Es geht in dieser Methode darum, Neomycin mit Ionenaustausch auf einer SCX-SPEC-Disk möglichst rein und quantitativ anzureichern, um es dann mit Ionenpaarchromatographie möglichst vollständig von der Fleischmatrix abzutren-

nen und durch Nachsäulenderivatisation sehr selektiv nachzuweisen. Dabei wird die Chromatographie so gewählt, dass Neomycin von Gentamicin basislinienge-trennt wird. Die Methode erlaubt sowohl Neomycin wie Gentamicin[1] in einem Arbeitsvorgang quantitativ nachzuweisen (Abb. 2).

1 Gentamicin
2 Neomycin

Abb. 2. Standardchromatogramm von Neomycin B und Gentamicin (chromatographische Bedingungen siehe Text)

Neomycin liegt als Gemisch der Hauptkomponente Neomycin B und der Nebenkomponente Neomycin C vor. Es wird in der vorliegenden Methode nur die Hauptkomponente Neomycin B (Anteil B gegenüber C > 90%) nachgewiesen. Die Auswertung der Resultate erfolgt über externen Standard.

Material und Methode

Standardsubstanz, Standardlösungen

Neomycinsulfat	
Gehalt:	90–95% Neomycinsulfat B, entsprechend einer Aktivität von 641 µg/mg der freien Neomycin B + C Base (gem. Angaben der Herstellerfirma)
Lieferant der Substanz:	Sigma Nr. N1876

Herstellung der Stammlösung und der Verdünnungslösungen

Neomycin-Stammlösung	32,8 mg Neomycinsulfat (90–95%) werden mit 10^{-3}M EDTA zu 20 ml gelöst (1 µg Neomycin/µl)
Standard I	100 µl der Stammlösung werden mit 10^{-3}M EDTA auf 10 ml aufgefüllt (10 ng Neomycin/µl)
Standard II	1 ml des Standards I wird mit 10^{-3}M EDTA auf 10 ml aufgefüllt (1 ng Neomycin/µl)

[1] Weitere Angaben zu Gentamicin (10)

Chemikalien für das Clean up

- Wasser, Milli-Q (Millipore-Waters), am Wasserstrahlvakuum 15 min mit Ultraschall entgast und mit Stickstoff gesättigt
- Trichloressigsäure (Merck z. A.): 5% gelöst in 0,001 mol/l EDTA
- K_2HPO_4 (Merck z. A.)
- Na_2SO_4 (Merck z. A.)
- EDTA (Titriplex III, Merck z. A.)
- Natriumhydroxid (Merck z. A.)
- Salzsäure (0,01 mol/l): 0,1 mol/l Salzsäure Titrisol Merck 9973 mit Wasser (Milli Q) 1:10 verdünnen
- Pufferlösung A: 0,1 mol K_2HPO_4 und 0,1 mol Na_2SO_4 in 1 Liter Wasser lösen und mit HCl auf pH = 6,2 justieren
- Pufferlösung B: 0,05 mol/l Natriumhydroxid (jeden Monat frisch herstellen!)

Geräte und Reagenzien für HPLC

Die Reagenzien für HPLC sowie für die Nachsäulenderivatisierung und die verwendeten Geräte und Hilfsmittel sind in (10) beschrieben.

Probenaufbereitung

Extraktion der Probe (Rindsleber, Rindsniere, Kalbsleber, Kalbsniere, Schweineleber und Schweineniere)

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

Die gelbe Lösung wird dekantiert, mit 30% NaOH-Lösung (w/v) auf pH = 6,2 ± 0,3 justiert und das Volumen mit der Pufferlösung A auf 40 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird bei 37 000 g ultrazentrifugiert (10 min, 18 °C).

Reinigung der Probe

Eine SCX-SPEC-Disk (3 ml, Spectronex Art.-Nr. 531-04-20) wird mit 2 ml Pufferlösung A konditioniert. Die 40 ml Probelösung werden langsam durchgesaugt (leichtes Vakuum ist evtl. nötig). Nachgewaschen wird mit 1 ml Wasser. Die Disk wird trocken gesaugt (2 min mit Vakuum). Neomycin wird mit 350 µl Pufferlösung B direkt in ein Autosampler-Vial eluiert. Die basische Lösung wird mit 75 µl 1 mol/l Salzsäure sauergestellt. Die Lösung (425 µl) wird gut gemischt, davon werden 20 µl direkt in das HPLC-System injiziert.

Apparatur	Waters 600 E
Mobile Phase	A: 22–23% Acetonitril B: 77–78% (0,05 mol/l) d,l-Campher-10-sulfonat-puffer pH = 2,2
Vorsäule	Nucleosil 5-C18-AB (5 µm) 8 mm x 3 mm
Analytische Säule	Nucleosil 5-C18-AB (5 µm) 125 mm x 3 mm
Fluss	0,6 ml/min
Ofentemperatur	45 °C
Einspritzvolumen	20 µl
Elutionsdauer	7–9 min
	Nachsäulenderivatisation mittels Merck-Hitachi 655A-13, Flow 0,15[2], der Reaktionsweg 3 (300 cm) ist auf 43 °C thermostatisiert
Fluoreszenz-Detektor	SFM-23 Kontron (340 nm EX., 440 nm EM.) Sensitivity, 6,0, medium
Auswertestation	Baseline Millipore Waters

Wiederfindungen

Kalbsleber (5 g) wurde in vierfacher Ausführung mit 50 µl und in fünffacher Ausführung mit 75 µl der Standardlösung I (entsprechend 100 ppb und 150 ppb) dotiert. Ebenso wurde ein Ansatz mit undotierter Kalbsleber analysiert. Siehe dazu Abbildungen 3–5.

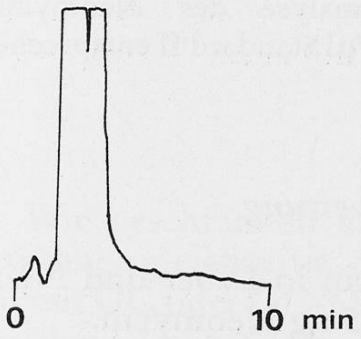


Abb. 3. Kalbsleber eines nicht behandelten Tieres

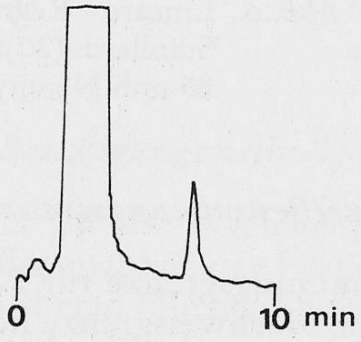


Abb. 4. Kalbsleber mit 100 ppb Neomycin dotiert

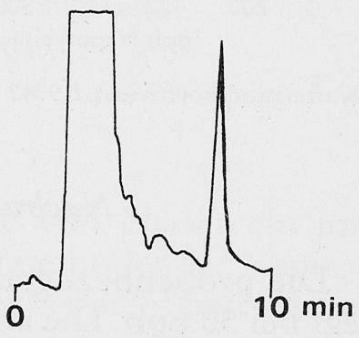


Abb. 5. Kalbsleber mit 150 ppb Neomycin dotiert

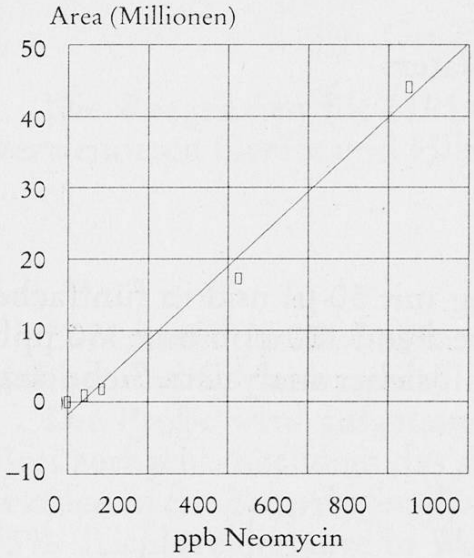
[2] Ein Flow von 0,15 entspricht 0,25 ml/min als Gesamtmenge der Lösungen A, B und C. Die Herstellung dieser drei Lösungen A, B und C für die Nachsäulenderivatisierung ist in (10) beschrieben.

Tabelle 1. Wiederfindungen bei dotierten Kalbslebern

Kalbsleber: dotierter Gehalt (ppb)	Anzahl Wieder-holungen	Mittelwert (ppb)	Standard-abweichung (ppb)	Relative Standard-abweichung (%)	mittlere Wiederfindung (%)
100 ppb	4	86,4	6,3	7,3	86
150 ppb	5	126,7	7,5	5,9	85

Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, liegt die Wiederfindung zwischen 85 und 86%. Dabei sind die relativen Standardabweichungen unterhalb 10%.

Wie die Abbildung 6 zeigt, ist der Neomycin-Standard über einen weiten Bereich linear und geht nahezu durch den Nullpunkt.



Korrelationskoeffizient: 0,9942

Abb. 6. Lineare Regressionsanalyse des Neomycin-Standards (20 µl x 1 ng/µl Standard II entsprechen 85 ppb Neomycin)

Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze/Auswertung

Die probenbezogene Bestimmungsgrenze für Neomycin in Leber und Niere liegt bei 50 ppb. Die analytische Nachweisgrenze liegt bei 5 ng Neomycin.

Die Auswertung der Resultate erfolgt über externen Standard. Dabei entsprechen 20 µl x 1 ng/µl (Standard II) genau 85 ppb Neomycin bei 100% Wiederfindung.[3]

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

Durchführung und Resultate

Da Neomycin mit den in der Veterinärmedizin häufig verwendeten Aminoglycosiden Gentamicin und Streptomycin strukturell sehr ähnlich ist, musste die Chromatographie so gewählt werden, dass Neomycin von den erwähnten Aminoglycosiden eindeutig abgetrennt wird. Die Chromatogramme (Abb. 4, 5, 7 und 8) zeigen die hohe Selektivität im Fluoreszenzbereich und die saubere Abtrennung von Gentamicin gegenüber der Lebermatrix. Wichtig ist die Analyse von Neomycin-Standards nach der Messung von positiven Proben. Die Empfindlichkeit der Derivatisierung mit OPA kann wegen der Instabilität von OPA (Oxidation) im Laufe von mehreren Stunden abnehmen!

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen zudem zwei Schlachthofproben (Kalbslebern), bei denen Neomycin nachgewiesen wurde. Wie aus der Abbildung 8 ersichtlich, ist der gemeinsame Nachweis von Neomycin und Gentamicin auch schon festgestellt worden.

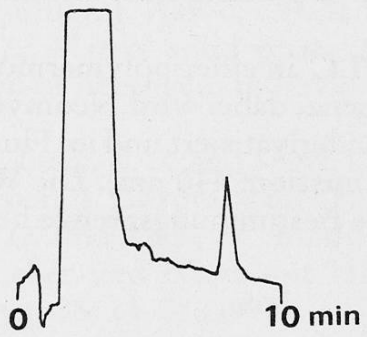


Abb. 7. Positive Schlachthofprobe (ca. 70 ppb Neomycin enthaltend)

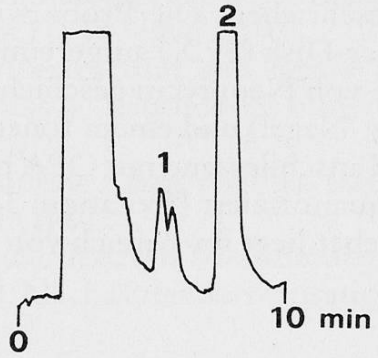


Abb. 8. Positive Schlachthofprobe (> 500 ppb Neomycin und ca. 60 ppb Gentamicin enthaltend)

Bestätigungsmethoden

Wir beschränken uns dabei auf die Nachweismethode von Neomycin und erwähnen gleichzeitig, dass völlig unabhängige Bestätigungsmethoden für Neomycin mit GC oder GC-MS der geringen Flüchtigkeit wegen bisher nicht beschrieben wurden.

Das Resultat einer Übersichtsuntersuchung

Während drei Monaten (Januar bis März 1995) wurden 40 Importkalbslebern auf Neomycin und Gentamicin untersucht. Dabei konnte in sieben Lebern (17,5%) Neomycin (> 50 ppb) festgestellt werden (Abb. 9). Gentamicinrückstände wurden in zwei Kalbslebern (5%) nachgewiesen.

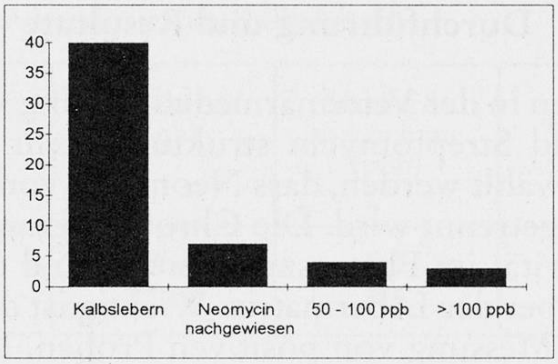


Abb. 9. Übersichtsuntersuchung Januar bis März 1995

Zusammenfassung

In Anlehnung an unsere frühere Arbeit (10) wird eine Nachsäulenderivatisationsmethode zur quantitativen Bestimmung von Neomycin in Niere und Leber von Schweinen, Rindern und Kälbern beschrieben. Die Probe wird mit Trichloressigsäure extrahiert und an einer Kationentauscher-Disk (SCX) aufgereinigt.

Die Analyse von Neomycin geschieht mit HPLC an einer polymermodifizierten C-18-Säule (Macherey-Nagel) und einem Ionenpaarreagenz, dabei wird Neomycin von Gentamicin getrennt und anschliessend mit OPA nachsäulenderivatisiert und im Fluoreszenzdetektor detektiert und quantifiziert (Exitation: 340 nm, Emission: 440 nm). Die Wiederfindung für Neomycin in Leber liegt im Bereich von 85%. Die Bestimmungsgrenze beträgt 50 ppb.

Résumé

En relation avec notre publication (10), une méthode de dérivatisation post-colonne est pérsenteé pour la détermination quantitative des résidus de néomycine dans le foie et le rein de porcs et de bœufs. L'échantillon est extrait avec de l'acide et purifié sur un disque (SCX).

La néomycine et la gentamicine sont séparées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse avec une colonne spéciale modifiée (Macherey-Nagel). Une dérivatisation post-colonne avec OPA permet une détection à haute spécificité dans le domaine de la fluorescence (excitation: 340 nm, émission: 440 nm). Le taux de récupération dans le foie est de 85 %.

Summary

In relation with our publication (10), a method based on post-column-derivatization is presented for the quantitative determination of neomycin residues in liver and kidney of pork, beef and calf. The sample is extracted with trichloroacetic acid and further clean up is achieved by a solid-phase extraction on a SCX-disc.

Neomycin is separated from gentamicin on a C18-polymermodified reversed-phase column (Macherey-Nagel). The derivative of neomycin is highly specifically detected and quantified after post-column derivatization with OPA by fluorescence detection (exitation: 340 nm, emission: 440 nm). Recovery in liver: 85%.

Literatur

1. *Mercer, D. H.:* Antimicrobial drugs in food-producing animals. Vet. Clin. North Am. **5,** 3–34 (1975).
2. *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).
3. *Ahuja, S.:* Chemical derivatization for the liquid chromatography of compounds of pharmaceutical interest. J. Chromatogr. Sci. **17,** 168–172 (1979).
4. *Larocque, L.* and *Neville, G. A.:* A practical evaluation of the delvotest P multi plate test in screening raw milk for antibiotics. J. Food Prot. **49,** 868–870 (1986).
5. *Shaikh, B.* and *Jackson, J.:* Determination of neomycin in milk by reversed phase ion-pairing liquid chromatography. J. Liquid Chromatogr. **12,** 1497–1515 (1989).
6. *Shaikh, B., Allen, E. H.* and *Gridley, J. C.:* Determination of neomycin in animal tissues, using ion-pair liquid chromatography with fluorometric detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68,** 29–36 (1985).
7. *Shaikh, B.* and *Jackson, J.:* Improved liquid chromatographic determination of neomycin B in bovine kidney. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **76,** 543–548 (1993).
8. *Schenck, F. J.:* Matrix solid phase dispersion extraction and liquid chromatographic determination of neomycin in bovine kidney tissue. Laboratory Information Bulletin **7,** 1–9 (1991).
9. *Barker, S. A., Long, A. R.* and *Short, C. R.:* Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. J. Chromatogr. **475,** 353–361 (1989).
10. *Guggisberg, D.* und *Koch, H.:* Methode zur quantitativen Bestimmung von Gentamicin in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC und Nachsäulenderivatisation. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **86,** 14–28 (1995).

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