Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 90 (1999)

Heft: 6

Artikel: Eignung der extraktiven Dialyse zur Bestimmung von Dexamethason in Eiern mittels ELISA

Autor: Walser, Paul Eugen

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-981806

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: 14.12.2025

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

Eignung der extraktiven Dialyse zur Bestimmung von Dexamethason in Eiern mittels ELISA

Paul Eugen Walser, Chemisches Laboratorium des Kantons Graubünden, Chur

Eingegangen 8. September 1999, angenommen 25. Oktober 1999

Einleitung

Synthetische Adrenocoriticoidsteroide wie Dexamethason (DXM) (Abb. 1) und das Diastereomere Betamethason haben eine entzündungshemmende Wirkung (1). Insbesondere können mit diesen Glucocorticoiden gute Effekte gegen Hautkrankheiten wie Allergien und Ekzeme erzielt werden. Wegen der geringen toxischen Wirkung können sie in hohen Dosen verabreicht werden. Sie werden ausserdem zur Behandlung der Ketose bei Milchkühen verwendet. Wie gezeigt wurde, tritt DXM dabei in die Milch über (2). Aufgrund des Wirkungsspektrums bietet sich

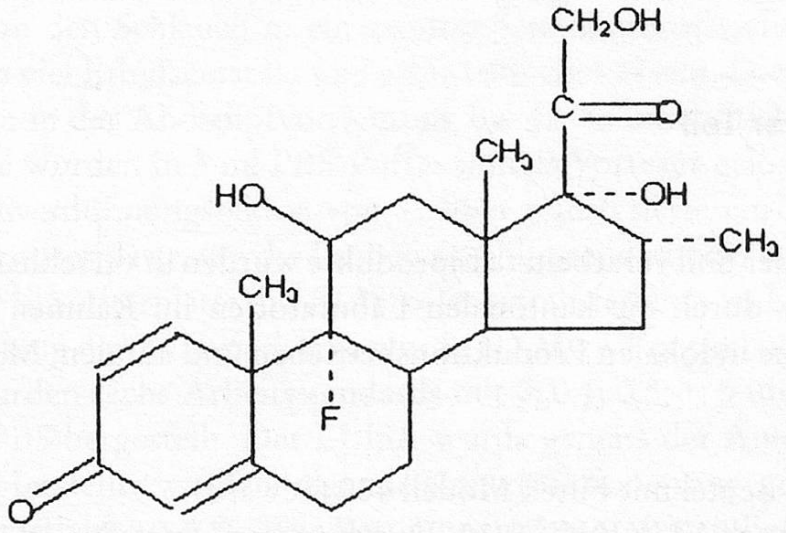

Abbildung 1 **Dexamethason**

eine illegale Anwendung in Hühnerfarmen an. Da bisher über die Bestimmung von DXM in Eiern nichts bekannt war, war es Ziel der Arbeit, eine einfache Methode zu liefern, welche sich für das Screening von Roheiern eignet.

Zum Nachweis von DXM in komplexen Matrizes wie Milch wurde eine dreiphasige Lösungsmittelextraktion in Kombination mit einem ELISA-Test vorgeschlagen (2). Das dreiphasige System besteht aus Wasser, Acetonitril, Dichlormethan und Hexan. Der Analyt befindet sich dabei in der mittleren Phase aus Acetonitril und Dichlormethan. Ein alternatives Verfahren bietet die extraktive Dialyse im Zweiphasensystem. Die extraktive Dialyse ist bereits zur Bestimmung anderer Tierarzneimittel wie Clenbuterol und Chloramphenicol verwendet worden (3, 4). Dabei tritt der Analyt aus der wässerigen Phase durch eine Cellulosemembran in eine nichtwässerige Lösungsmittelphase über. Während der Stoffaustausch bei der klassischen Dialyse nur in einer wässerigen Phase verläuft, wird bei der zweiphasigen Dialyse die Partition des Analyten zwischen den beiden Phasen ausgenutzt. Durch Verdampfen des organischen Lösungsmittels erhält man im Gegensatz zur klassischen Dialyse eine Aufkonzentrierung. Der Extrakt enthält nur niedermolekulare Verbindungen. Am einfachsten gestaltet sich die extraktive Dialyse, wenn man die Probe in einen Dialyseschlauch gibt und diesen in einer grösseren Menge Lösungsmittel längere Zeit extrahiert (5), aber auch das umgekehrte Vorgehen ist möglich (3, 4). Apolare Analyten wie die Steroidhormone und deren Abkömmlinge sind für die extraktive Dialyse gegenüber polareren Stoffen wie den Sulfonamiden für die extraktive Dialyse prädestiniert. Zur Isolierung von DXM aus Urin ist von (6) eine zweimalige Extraktion in Ethylacetat gewählt worden. Aus diesem Grunde wurde für die extraktive Dialyse von Eiern als Lösungsmittel ebenfalls Ethylacetat verwendet.

Anschliessend an die Probenextraktion wurde zur quantitativen Bestimmung wie in (2) ein kompetitiver ELISA-Test eingesetzt. Nachdem für Dexamethason ein sehr preiswerter Kit zur Verfügung steht (7), stellt der ELISA die Methode der Wahl dar.

Experimenteller Teil

Proben

80 Proben Eier und verarbeitete Eiprodukte wurden in verschiedenen Kantonen der Ostschweiz durch die kantonalen Laboratorien im Rahmen einer Untersuchungskampagne in lokalen Produktionsbetrieben und auf dem Markt erhoben.

Material

- Stomacher® Beutel mit Filter, Modell 400 (Seward)
- Dialyseschlauch VISKING® 8/32, Durchmesser 6 mm, Nr. 44104 (Boehringer Ingelheim)
- Scintillationsfläschchen 20 ml aus Glas mit Schraubdeckel (Infochroma)

Reagenzien

- Dexamethason CAS-Nr. 50-02-2, D-1756 (Sigma)
- Acetonitril p.A.
- Dichlormethan p.A.
- Ethylacetat p.A.
- Hexan p.A.
- Dexamethason ELISA-Kit (Neogen® Corporation)
- PBS-Puffer: 8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1,44 g Natriumhydrogenphosphat und 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1 l Wasser lösen und pH-Wert kontrollieren (pH 7,4)

Geräte

- Visidry® Probeneindampfsystem (Supelco) oder TurboVap® II (Zymark)
- Mehrkanalkolbenhubpipette 100 µl variabel, 8-fach
- Mikrotiterplattenreader MR 5000 (Dynex Technologies)
- Mikrotiterplattenwascher MRW (Dynex Technologies)
- Auswertesoftware Biolinx® (Dynex Technologies)

Ausführung

Die Eier wurden geöffnet und in einem 100-ml-Urinbecher durch Schütteln homogenisiert. Die Eimasse wurde durch einen Stomacher® Filterbeutel geseiht, um eine gut pipettierbare Probe zu erhalten. Davon wurden 3 ml mittels einer Vollpipette in einen Dialyseschlauch eingefüllt. Dazu wurden 30 cm lange Abschnitte des Dialyseschlauches vorerst in Wasser einige Minuten äquilibriert. Das eine Ende wurde vor dem Einfüllen der Probe verknotet und das andere anschliessend unter Auspressen des Luftvolumens. Der gefüllte Schlauch wurde in ein Scintillationsfläschchen gegeben und mit ca. 15 ml Ethylacetat aufgefüllt. Dann wurden die Fläschchen 2 h auf einer Schüttelmaschine bei 100 U/min bewegt. Anschliessend transferierte man den Schlauch in ein zweites Scintillationsfläschchen und setzte nochmals gleich viel Ethylacetat zu und schüttelte über Nacht. Die Lösungsmittelextrakte wurden in der Abdampfvorrichtung bei 45 °C unter Stickstoff verblasen. Die Rückstände wurden in 3 ml PBS-Puffer mittels Vortexer gelöst. Daraus ergab sich ein Probenverdünnungsfaktor von 1. Man transferierte ein Aliquot in eine Deep Well Mikrotiterplatte, um die Proben anschliessend mit der Achtkanalpipette speditiv in die Mikrotiterplatte des ELISA-Tests transferieren zu können.

Zur Herstellung der Kalibrierkurve wurde DXM zu 1 mg/ml in Ethylacetat gelöst. Daraus wurden sechs Arbeitsstandards mit 0; 0,1; 0,5; 1; 5 und 10 µg/l durch Verdünnen in PBS hergestellt. Der ELISA wurde gemäss der Anleitung durchgeführt (7). Vom Hersteller wurden folgende Kreuzreaktionen angegeben: Flumethason 49 %, Betamethason 1,5 %. Zur Bestätigung von positiven Befunden wird auf HPLC- (6, 8, 9) und GC/MS-Methoden (8) verwiesen. Zur Dekonjugation von Me-

taboliten können bewährte enzymatische Aufschlussmethoden verwendet werden (2). Weitere Metaboliten haben eine veränderte Struktur (9).

Gespikte Proben wurden durch Zusatz von DXM-Standardlösung zu Eihomogenat in 10-ml-Messkölbchen hergestellt. Die gespikten Proben wurden sowohl mit der Dialyse als auch mit der Dreiphasenextraktion (2) zur Ermittlung von Wiederfindung und Wiederholbarkeit untersucht.

Resultate

Die als Splinefunktion berechnete Kalibrierkurve ist in Abbildung 2 als Abhängigkeit der relativen Extinktion B% von der logarithmischen Konzentration dargestellt, d. h. die gemessenen Extinktionswerte wurden auf die maximale Extinktion des Nullstandards normiert. Die Bestimmungsgrenze wurde vom tiefsten Standard abgeleitet und betrug 0,1 µg/l, entsprechend ca. 80 B%. In allen untersuchten Eierproben war DXM nicht nachweisbar. Die Tabelle 1 zeigt die erzielten Resultate von gespikten Proben, wobei auf jedem Niveau vier Bestimmungen durchgeführt wurden. Für die mit dem Kit gelieferte Urinkontrollprobe von 5 µg/l wurde eine Wiederfindung von 108,7 % erhalten.

Die gespikten Proben wurden auch nach der Methode der Dreiphasen-Extraktion als Einfachbestimmung untersucht. Diese Wiederfindungen wurden ebenfalls in die Tabelle 1 eingetragen. Die mittlere Wiederfindung von 94,9 % stimmte sehr gut mit dem Literaturwert (2) von 96 % für Milch überein. Bei der ex-

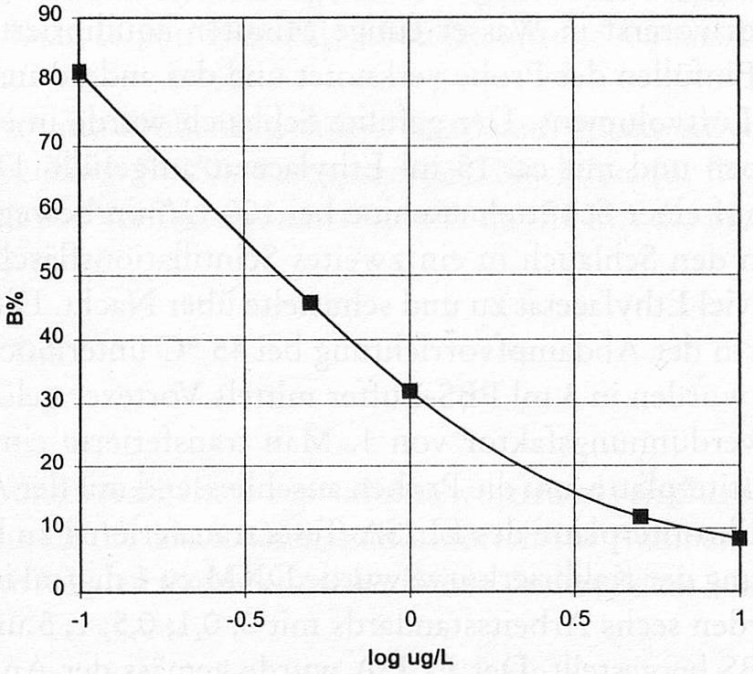

Abbildung 2 **Kalibrierkurve von Dexamethason für den ELISA, berechnet als Splinefunktion von B% (relative Extinktion bezüglich der Nullprobe) *versus* logarithmische Konzentration (Standards ■)**

traktiven Dialyse waren die Wiederfindungen mit 58 % zwar deutlich geringer, aber konstant. Die Wiederholbarkeit (relative Standardabweichung RSD 5,9 %) entsprach hingegen etwa der Dreiphasen-Extraktion (RSD 4 %) gemäss (2).

Tabelle 1
Wiederfindung und Wiederholbarkeit für die extraktive Dialyse (a) sowie Wiederfindung für die Dreiphasen-Extraktion (b) von gespikten Eierproben

Zusatz (µg/l)	*Mittelwert (a) (µg/l)*	*Wiederfindung (a) (%)*	*Relative Standardabweichung (a) (%)*	*Wiederfindung (b) (%)*
0	nn			
0,2	0,131	65,5	8,7	102,5
1	0,500	50,0	3,0	97,3
2	1,135	56,7	6,8	93,4
5	2,984	59,7	2,9	86,3
Mittelwert		58,0	5,9	94,9

nn = nicht nachweisbar

Diskussion

DXM wird häufig als Derivat appliziert. Da der Stoffwechsel rasch verläuft, wird freies DXM freigesetzt (6). Für eine tiefe Nachweisgrenze ist eine Probenverdünnung bei der Probenaufarbeitung zu vermeiden. Durch die gewählten Extraktionsverfahren kann ein günstiger Probenverdünnungsfaktor von z. B. 1 eingehalten werden.

Es zeigte sich, dass mit der extraktiven Dialyse gut reproduzierbare Wiederfindungen erhalten werden. Wegen der hohen Empfindlichkeit des ELISA-Tests kann eine mittlere Wiederfindung von 58 % akzeptiert werden. In der Richtlinie (10) wird empfohlen, eine Korrektur der Wiederfindung vorzunehmen, wenn der Vertrauensbereich kleiner ist als die Abweichung von 100 %, was hier eindeutig der Fall ist ($t_{0,95} = 3,18$). Die Wiederfindungen für die extraktive Dialyse von Chloramphenicol in Milch (3) wurden bei 5 µg/l als 73 % (RSD 7,9 %) und für Clenbuterol in Urin (4) bei 100 µg/l als 82,5 % (RSD 5,4 %) angegeben, was mit den Resultaten für DXM gut korreliert. Demgegenüber wurde für Sulfonamide in Eiern eine Wiederfindung von nur 36–42 % erreicht (unpublizierte Daten).

Die Dreiphasen-Extraktion ergab optimale Resultate auch bei der Extraktion von Eiern, bedingte aber die Verwendung von toxischen Lösungsmitteln wie Dichlormethan und Acetonitril. Die resultierende Wiederfindung erreichte praktisch 100 %, wie für Milch berichtet wurde (96 % in (2)). Diese hohe Effizienz lässt sich

durch die vollständige Durchmischung der Phasen bei der Extraktion erklären. Mit beiden Methoden lassen sich auch bei vielen anderen Fremdstoffen und weiteren Probenmatrices gute Resultate erzielen. Die Eignung der Verfahren wurde hier nur an einem ausgewählten Beispiel veranschaulicht.

Zusammenfassung

Die extraktive Dialyse ist eine apparativ einfache und arbeitssparende Methode zur Extraktion und Konzentration von Tierarzneimitteln aus Lebensmittelproben, besonders von wenig polaren Stoffen, wie z. B. den Adrenocorticoidsteroiden. Die Methode wurde am Beispiel der Bestimmung von Dexamethason in Eiern und Eiprodukten dargestellt. Da Dexamethason hauptsächlich in freier Form vorliegt, eignet sich diese Methode für das Screening. Zusammen mit der ELISA-Technik können viele Proben zuverlässig und mit wenig Aufwand bei einer Bestimmungsgrenze von 0,1 µg/l untersucht werden.

Résumé

La dialyse extractive représente un procédé simple et relativement rapide pour l'extraction de résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires. Les substances de faible polarité sont favorisées comme par exemple les adrenocorticoidsteroides. La méthode a été appliquée au dosage de la dexamethasone dans les œufs et les ovoproduits. Parce que la dexamethasone est présente principalement sous sa forme libre, la téchnique proposée se prête en vue du screening. En combinaison avec le dosage par ELISA il est possible de contrôler rapidement de grandes séries d'échantillons avec une limite de détermination de 0,1 µg/l.

Summary «Performance of the Extractive Dialysis for the Determination of Dexamethasone in Eggs by Using ELISA»

The extractive dialysis is a simple and efficient method for the extraction and concentration of veterinary drugs from foods, especially in the case of weakly polar compounds such as the adrenocorticoidsteroids. The method was applied to the determination of dexamethasone in eggs and egg products. Because dexamethasone is present mainly in its free form the method is suitable for screening purposes. In combination with the ELISA technique many samples can be screened with this reliable method. A quantitation limit of 0,1 µg/l can easily be achieved.

Key words

Eggs, Dialysis, Solvent extraction, Adrenocorticoidsteroid hormones, ELISA

Literatur

1 *Budavari, S.:* The Merck Index, Merck & Co., Inc., 11. Ed., 463 (1989).

2 *Reding, J., Sahin, A., Schlatter, J.* und *Naegeli, H.:* Dexamethasone and flumethasone residues in milk of intramuscularly dosed cows. J. vet. Pharmacol. Therapy **20**, 198–203 (1997).

3 *Dominguez, L., Blanco, J.L., Moreno, M.A., Diaz, S.D., Prieta, J., Camara, J.M., Bayo, J.* and *Suarez, G.:* Diphasic dialysis: A new membrane method for a selective and efficient extraction of low molecular weight organic compounds from aqueous solutions. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **75,** 854–857 (1992).
4 *Bayo, J., Blanco, J.L., Moreno, M.A., Prieta, J., Diaz, S.D., Suarez, G.* and *Dominguez, L.:* Chloramphenicol extraction from milk by using the diphasic dialysis method followed by liquid chromatographic determination. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **77,** 854–856 (1994).
5 *Brandenberger, H.* and *Bucher, M.:* Extractive Dialysis. In: Oliver, J.S., Forensic toxicology. Croom Helm, London 1980.
6 *Derendorf, H., Rohdewald, P., Hochhaus, G.* and *Möllmann, H.:* HPLC determination of glucocorticoid alcohols, their phosphates and hydrocortisone in aqueous solutions and biological fluids. J. Pharmaceutical Biomed. Analysis **4,** 197–206 (1986).
7 *Anonym:* Instruction for dexamethasone kit, Neogen® Corporation (4/1999).
8 *Mallinson, E.Th., Dreas, J.S., Wilson, R.T.* and *Henry, A.C.:* Determination of dexamethasone in liver and muscle by liquid chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. **43,** 140–145 (1995).
9 *Gaignage, Ph., Lognay, G., Marlier, M., Severin, M.* and *Dreze, Ph.:* Applications of chromatographic and spectrometric techniques to the study of dexamethasone related compounds. Chromatographia **28,** 623–630 (1989).
10 *Thompson, M., Ellison, S.L.R., Fajgelj, A., Willetts, P.* and *Wood, R.:* Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. IUPAC/AOAC/EURACHEM Technical Report 1996.

Paul E. Walser, Chemisches Laboratorium des Kantons Graubünden, Planaterrastrasse 11, CH-7000 Chur, E-Mail: paul.walser@klgr.gr.ch