

Project 505.0600

Ontwikkelen methoden voor het aantonen en bepalen van diergeneesmidde-
len op niet microbiologische wijze

Projectleider: H.J. Keukens

Rapport 90.39

Oktober 1990

Ontwikkeling van een bepalings-
methode voor residuen van
dihydrostreptomycine in melk,
ei, urine en nierbekkenvocht

G.M. Binnendijk

Afdeling: Diergeneesmiddelen

In samenwerking met ir P.L.M. Berende en het Proefstation Rundvee-
houderij, de Schapenhouderij en de Paardenhouderij, afd. Melkwinning.

Goedgekeurd door: H.J. Keukens

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouw-
produkten.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bron-
vermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

programmabeheer en informatieverzorging (2x)

afdeling Diergeneesmiddelen (6x)

afdeling Microbiologie

afdeling Toxicologie (ir P.L.M. Berende)

circulatie

bibliotheek

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden

Directie Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees

Directie Veehouderij en Zuivel

Veterinaire Dienst (2x)

Proefstation Rundveehouderij de Schapenhouderij en de Paardenhouderij,
afd. Melkwinning

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene
(dr R.W. Stephany)

Secretaris ORA-Gezondheidsdienst voor Pluimvee te Doorn
(drs M. Vertommen)

Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees - Kringlaboratorium
Nijmegen (dr J.F.M. Nouws)

Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees - Centraal Laboratorium,
(L.M.H. Frijns) (2x)

Rijksuniversiteit Utrecht, Vakgroep Voedingsmiddelen van Dierlijke
Oorsprong (prof. A. Ruiter)

Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur, Veterinaire
Hoofdinspectie

Produktschap voor Zuivel

Produktschap Vee en Vlees

Produktschap Pluimvee en Eieren

Stichting Centraal Orgaan Zuivelcontrole

Centraal Orgaan Melkhygiëne

VOORWOORD

Met dank aan mw ir B.A. Slaghuis en dhr J.T. Nunninga, beide werkzaam op het Proefstation Rundveehouderij, de Schapenhouderij en de Paardenhouderij afdeling Melkwinning voor de medewerking bij het uitscheidingsexperiment na intramammaire toediening.

INHOUDSOPGAVE	<u>blz</u>
VOORWOORD	1
SAMENVATTING	4
1 INLEIDING	6
2 MATERIAAL EN METHODE	7
2.1 Reagentia	7
2.2 Instrumentatie en chromatografische omstandigheden	8
2.3 Monstervoorbewerking	11
2.3.1 Extractie	11
2.3.2 Opzuivering en concentrering	11
2.4 Uitscheidingsproef	12
2.4.1 Intramusculaire toediening	12
2.4.2 Intramammaire toediening	13
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	13
3.1 Derivatisering	13
3.1.1 Inleidende experimenten	13
3.1.2 Post-columnderivatisering	14
3.2 Chromatografie	15
3.3 Monstervoorbewerking	17
3.4 Preconcentreren d.m.v. kolomshakelen	18
3.5 Karakterisering van de methode	20
3.6 Uitscheidingsexperimenten	23
3.6.1 Intramusculaire behandeling	24
3.6.2 Intramammaire behandeling	25
4 CONCLUSIES	27
LITERATUUR	27
BIJLAGE A: Programma voor de 231/401 Gilson injector t.b.v. injectie van extracten voor de bepaling van dihydrostreptomycine.	

SAMENVATTING

Beschreven wordt de ontwikkeling van een analysemethode voor de bepaling van residuen van dihydrostreptomycine in melk, ei, urine en nierbekkenvocht.

De uiteindelijke procedure bestaat uit een "off-line" zuivering over een Sep-Pak C₁₈ kolommetje gevolgd door HPLC met "on-line" precontractie en "post-column"-derivatisering met nitroprusside. Detectie vindt plaats bij 495 nm.

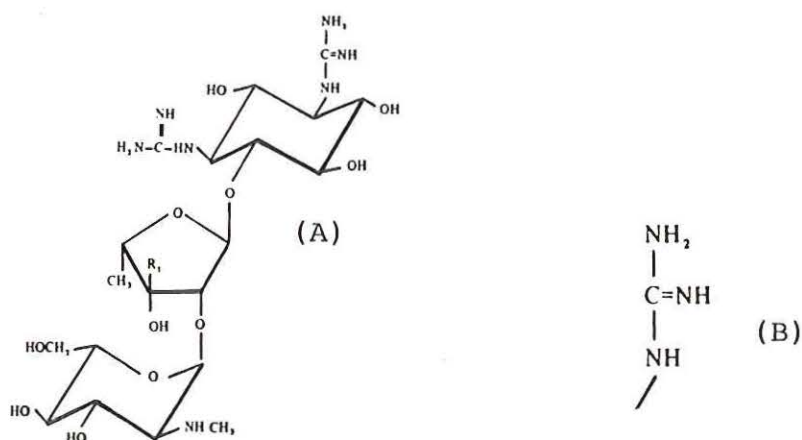
De gemiddelde terugvindingspercentages liggen tussen 89-107% met een variatie coëfficiënt van 4-8%.

De bepaalbaarheidsgrens ligt voor met nierbekkenvocht verzadigde filtreerpapierschijfjes bij 1,5 mg/kg; voor de andere matrices is de bepaalbaarheidsgrens lager dan 100 µg/kg.

Met de ontwikkelde methode zijn melkmonsters afkomstig van intramusculair en intramammair behandelde koeien onderzocht. Tot 48 uur na de laatste intramusculaire toediening kon dihydrostreptomycine in de melk worden aangetoond. Bij intramammare toediening was dit nog mogelijk tot 72 uur na toediening.

1 INLEIDING

Dihydrostreptomycine (DHS) is een aminoglycoside antibioticum en behoort tot de groep van streptamide-derivaten. Karakteristiek voor deze groep van verbindingen zijn, naast de suikerachtige structuur, de twee guanidine-groepen (zie figuur 1). Het wordt bereid d.m.v. de reductie van streptomycine (zie figuur 1). Beide verbindingen zijn alleen verkrijgbaar als sulfaat-zout.



Figuur 1: Structuurformules van (A) dihydrostreptomycine ($R_1 = CH_2OH$) en streptomycine ($R_1 = CHO$) en van (B) een guanidine-groep.

DHS, kan aan glas binden en heeft geen UV-licht absorptie anders dan in het korte golflengtegebied. DHS is een stabiele verbinding; stabiel over een groot pH-gebied, stabiel t.a.v. lucht en licht en stabiel bij verhoogde temperatuur. De pKa bedraagt 7,4 (1,2).

DHS wordt, o.a. in combinatie met penicilline, in de veterinaire geneeskunde toegepast o.a. voor de bestrijding van mastitis bij koeien maar ook het gebruik bij pluimvee en varkens werd beschreven (3).

DHS metaboliseert niet maar verlaat het lichaam onveranderd, voornamelijk via de urine. Bij te hoge dosering kan accumulatie in de nier optreden. De binding met eiwitten is zeer laag (4).

Voor de controle op residuen van DHS in biologische matrices blijkt geen methode beschikbaar die breed inzetbaar, snel, selectief en gevoelig genoeg is. HPLC-methoden werden beschreven voor de bepaling van DHS in plasma en serum (5-8). Voor andere biologische matrices werden microbiologische (9) en elektroforese (10) methoden beschreven.

Echter geen ervan beschikt over alle voornoemde eigenschappen.

Doelstelling bij dit onderzoek was te komen tot een specifieke analysemethode, toepasbaar voor melk, ei, urine en nierbekkenvocht, met een bepaalbaarheids grens van 100 µg/kg. Dit niveau ligt beneden de actiegrens welke in de meeste landen wordt gehanteerd.

In dit rapport wordt de ontwikkeling beschreven van een methode welke gebaseerd is op de bepaling van DHS met HPLC gecombineerd met "post-column" derivatisering.

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Reagentia

Alle toegepaste chemicaliën waren, tenzij anders vermeld, van p.a.-kwaliteit (Merck, Darmstadt, FRG). Water werd gezuiverd met een Milli-Q zuiverings systeem (weerstand minimaal 10 Mohm/cm) (Millipore, Milford, MA, USA). Alle pH-instellingen werden uitgevoerd met azijnzuur (10-100%).

De standaardstoffen dihydrostreptomycinesulfaat en streptomycinesulfaat (equivalent met respectievelijk 770 µg/mg en 750 µg/mg actieve stof, U.S.P.C. inc. Rockville, MD, USA) werden opgelost in water (100 µg/ml) en doorverdund met 0,01 M natriumacetaat/0,08 M natriumheptaansulfonaat (Aldrich, Steinheim, FRG) pH 4,0. Laatst genoemde oplossing werd eveneens gebruikt bij de off-line opconcentrering/clean-up m.b.v. Sep-Pak C₁₈ (Millipore) en bij het aanvullen tot volume van het eindextract. Ei-monsters werden vooraf verdund met 0,9% natriumchloride oplossing in water. Voor injectie werden de monsteroplossingen gefiltreerd over een 0,45 µm filter (Gelman, Arm Arbor, MI, USA).

Het HPLC-opconcentreringseluens was 0,01 M natriumacetaat/0,02 M natriumhexaansulfonaat (Aldrich) pH 4,0 en het eluens was 0,05 M natriumacetaat/0,013 M natriumhexaansulfonaat pH 6,0 gemengd met aceton (90 + 10 v/v). Alle oplossingen die hexaan- of heptaansulfonaat bevatten werden gefiltreerd (0,45 µm, type HA, Millipore). Natriumnitroprusside is een giftige stof. Daarom werd bij de bereiding van het derivatiseringsreagens gewerkt in een afzuigkast en gebruik gemaakt van handschoenen. Vanwege de zeer sterke invloed van licht op het derivatiseringsreagens werden alle handelingen dienaangaande uitgevoerd onder uitsluiting van UV-licht. Bij de bereiding van het reagens komt gas vrij. Het derivatiseringsreagens werd tegen het licht beschermd en werd als volgt bereid: 0,8 g natriumnitroprusside oplossen in 178 ml water, achtereenvolgens toevoegen 2 ml 40% natronloog en 4 ml 30% waterstofperoxide. Deze oplossing gedurende een nacht roeren op een magneetroerder (200 r.p.m.) en voor gebruik affiltreren over een vouwfilter (type 595, S&S, Dassel, FRG). Het injectiepreparaat, Streptoprocpen (Per ml: procaïnebenzylpenicilline 200.000 I.E., dihydrostreptomycinebase(als sulfaat) 200 mg respectievelijk 250 mg), t.b.v. de uitscheidingsproef na intramusculaire toediening was afkomstig van A.U.V., (Cuijk, The Netherlands). Het preparaat Nafpenzal 72, laktatie-injector (per injector à 3 gram: 100 mg nafcilline (als natriumzout), 300.000 I.E. natrium-penicilline-G en 100 mg dihydrostreptomycine-base (als sulfaat) was afkomstig van Mycofarm (De Bilt, The Netherlands).

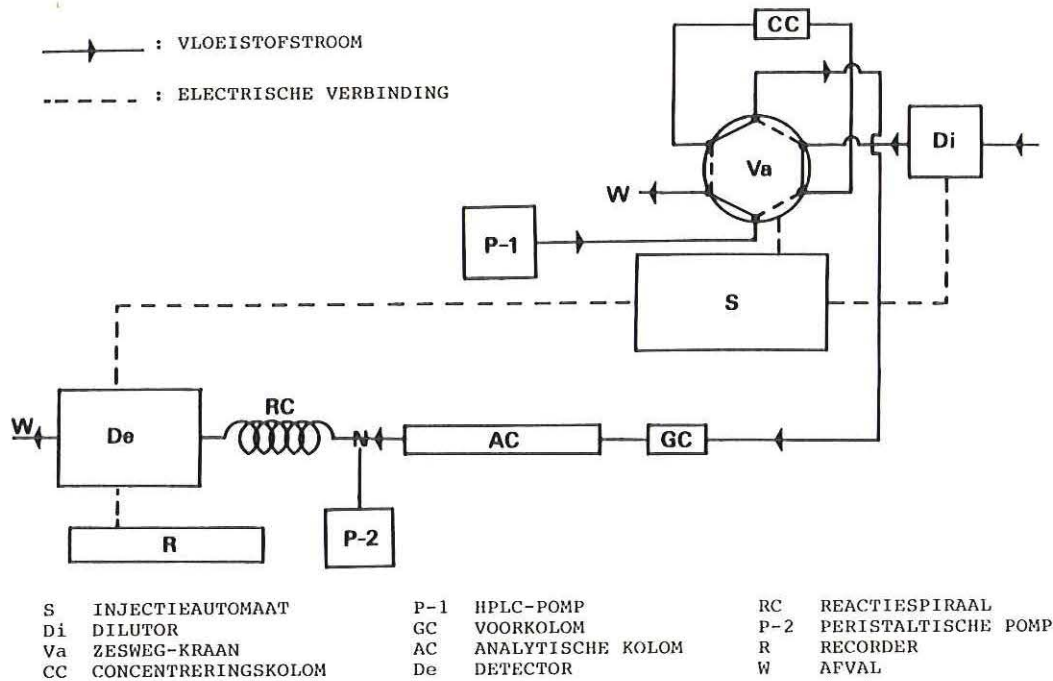
2.2 Instrumentatie en chromatografische omstandigheden

Bij de monsteropwerking werden gebruikt: coolspin centrifuge (3000 x g, -10°C, MSE, Crawley, Sussex, UK), Pierce evaporator (Rockford, IL, USA), pH meter (GC 820, Schott, Hofhiem a. TS., FRG), magneetroerder (200 r.p.m. IKA-werke, Staufen, FRG).

Inleidende experimenten bij het onderzoek van het derivatiseringsreagens werden uitgevoerd met een model DU 40 spectrofotometer (Beckman, Irvine, CA, USA).

Het kolomschakel-HPLC-systeem zoals weergegeven in figuur 2 bestond uit: HPLC-pomp (Spectroflow 400, ABI, Ramsey, NY, USA), injectieauto-maat (model 231 sample injector/ 401 dilutor, Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France), UV/Vis-detector met wolfram-lamp (model 783, ABI), peristaltische slangenpomp (Breda Scientific, Breda, The Netherlands) uitgerust met 0,1 ml/min slang (Skalar, Breda, The Netherlands) met in het uiteinde van deze slang een injectienaald ($22\text{G} \times 1\frac{1}{4}$, 0,7x30 mm Nr.12, Terumo, Leuven, Belgium) met in het Luer-koppelingsgedeelte een propje glaswol wat als filter van het derivatise-ringsreagens diende, PTFE-coil (4 m x 0,5 mm I.D., Chrompack, Middelburg, The Netherlands), 1/16 in. x 0,75 mm TEE (Valco, Houston, FL, USA), concentreringskolom 10 x 3 mm (Chrompack) gevuld met Sep-Pak C_{18} materiaal (Millipore) en analytische kolom 125 x 4 mm I.D. gevuld met LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) met een 4 x 4 mm I.D. voorkolom ge-vuld met voornoemd kolommateriaal (Merck). Tijdens de ontwikkelings-fase werd ook gebruik gemaakt van een 100 x 3 mm I.D. kolom gevuld met Lichrosorb RP 18 materiaal als analytische kolom (Chrompack) en Perisorb RP 18, 30-40 μm (Merck), Hypersil ODS 30 μm (Shandon Scientific Ltd, Astmoor, Runcorn, UK), Bondapak/Corasil, 30-40 μm (Millipore) en Baker C_{18} SPE (J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J., USA) als materiaal voor de concentreringskolom. Chromatogrammen werden geregistreerd m.b.v. een integrator (Chromatopac C-R2A, Shimadzu, Kyoto, Japan) of met een recorder (BD 41, Kipp & zonen, Delft, The Netherlands).

Het eluensdebiet was 1 ml/min (bij Lichrosorb RP 18 kolom 0,6 ml/min), de snelheid bij het injecteren en opconcentreren was 1,5 ml/min en het debiet van het derivatise-ringsreagens was 0,1 ml/min.



Figuur 2: schematische weergave van de HPLC-opstelling. De schakelkraan (Va) en de dilutor (Di) zijn onderdelen van de injectieautomaat (S).

De procedure bij opconcentreren en scheiding was als volgt:

De concentreringskolom (CC) werd eerst m.b.v. de dilutor gespoeld met achtereenvolgens 750 µl water, 1000 µl acetonitril, 750 µl water en 2250 µl gebufferde hexaansulfonaatoplossing. Vervolgens werd m.b.v. de dilutor het monster (400-1000 µl) op de concentreringskolom gebracht en deze kolom werd nagespoeld (400-1000 µl, totaal met injectievolume 1400 µl). De kraan (Va) werd gedurende 3 minuten in het hoge druksysteem geschakeld waardoor het monster m.b.v. de HPLC-pomp (P-1) van de concentreringskolom werd geëluëerd waarna de eigenlijke scheiding plaats vond. Met behulp van de peristaltische pomp (P-2) werd het reagens toegevoegd. Dit werd in de reactiespiraal (RC) gemengd met eluens. Alle besturingshandelingen werden uitgevoerd middels de injectieautomaat. De totale procedure duurde circa 16 minuten per monster.

De detectorinstelling was als volgt: 0,02 a.u.f.s. bij een golflengte van 495 nm, rise time 5 seconden.

2.3 Monstervoorbewerking

Bij het onderzoek werden de volgende matrices onderzocht: kippe-ei, koemelk, varkensurine en in het nierbekken (varkensnier) geplaatste filtreerschijfjes.

2.3.1 Extractie

Heel ei werd gemengd m.b.v. een Omnimixer en vervolgens werd het homogenaat gemengd met 0,9% natriumchloride oplossing (verhouding ei : oplossing, 1+2 v/v). Hierna werd de pH ingesteld op 4,0 en werd gedurende 5 minuten gecentrifugeerd (3000 x g). Van de bovenstaande oplossing werd 10 ml opgewerkt zoals beschreven in 2.3.2

Melk (40-60 ml) werd eerst ontroomd door 5 minuten te centrifugeren (3000 x g, -10°C) waarna de bovenliggende vetlaag werd verwijderd. Vervolgens werd de pH ingesteld op 4,0 en hierna werd wederom gecentrifugeerd (5 minuten, 3000 x g). Hierna werd 5 ml opgewerkt zoals beschreven in 2.3.2.

Urine werd eerst over een papierfilter gefiltreerd. Hierna werd de pH op 4,0 gebracht en werd 5 ml urine over een met methanol en water geconditioneerde Sep-Pak C₁₈ cartridge geleid. De cartridge werd nagespoeld met 2 ml water en het totale eluaat van 7 ml werd opgewerkt zoals in 2.3.2 beschreven.

Aan een filtreerschijfje, verzadigd met circa 100 µl nierbekkenvocht, werd 2 ml gebufferde natriumheptaansulfonaat-oplossing toegevoegd. Deze oplossing werd gefiltreerd over een 0,45 µm filter en 1 ml van deze oplossing werd direct geïnjecteerd.

2.3.2 Opzuivering en concentrering

Het onder 2.3.1 verkregen monsterextract werd gemengd met 40 ml gebufferde tegenionoplossing (0,01 M natriumacetaat/0,08 M natriumheptaansulfonaat pH 4,0) en het totaal werd over een Sep-Pak cartridge geleid

(geconditioneerd met 5 ml methanol, water en gebufferde tegenionoplossing). De cartridge werd nagespoeld met 2 ml gebufferde tegenionoplossing en daarna gedroogd met 3 ml lucht. Vervolgens werd geelueerd met 3 ml methanol in een gecalibreerde puntbuis en onder stikstof bij 50°C ingedampt tot een volume van circa 400 µl. Hierna werd aangevuld tot 2 ml met de gebufferde tegenionoplossing en werd met 2 ml hexaan geëxtraheerd op een vibrofix (1250 r.p.m.). Fasescheiding werd bewerkstelligd d.m.v. centrifugeren bij 1000 x g. De waterige fase werd voor injectie in het HPLC systeem gefiltreerd over een 0,45 µm filter.

2.4 Uitscheidingsproef

2.4.1 Intramusculaire toediening

Twee koeien kregen een intra-musculaire injectie met streptoprocpen. De dosering dihydrostreptomycine bedroeg 10 mg/kg lichaamsgewicht (respectievelijk 27,5 ml en 26,0 ml). De injectie werd na 24 en 48 uur herhaald. Het preparaat werd om ca. 8.00 uur toegediend en de koeien werden om 7.30 uur en 16.30 uur gemolken. Melkmonsters van 100 ml van elk melkmaal vanaf één melkmaal voorafgaand (blanco) aan het tijdstip van injiceren werden verzameld. De avondmelk werd binnen 30 minuten na monsternamen bij 4°C geplaatst. De daaropvolgende morgen om 8.00 uur werden de monsters bij -20°C geplaatst. De ochtendmelk werd direct na melken bij -20°C geplaatst.

De dieren liepen dag en nacht in de weide, waar ze de beschikking hadden over volop gras. Daarnaast werden ze tweemaal per dag tijdens het melken bijgevoerd met een beetje krachtvoer.

Bijzonderheden over gebruikte koeien:

ras	geboortedatum	kalfdatum	fysiologische status	gewicht
50% HF	15-11-1985	16-01-1990	ca. 3 mnd drachtig	550 kg
25% HF	02-12-1986	19-03-1990	ca. 1 mnd drachtig	520 kg

2.4.2 Intramammaire toediening

Van een koe werd het "rechtsachter-kwartier" eenmalig behandeld met de laktatie-injector Nafpenzal 72. De intramammaire dosering aan dihydrostreptomycinesulfaat was zodoende 100 mg absoluut. Het preparaat werd om circa 17.00 uur toegediend. De koe werd dagelijks om 6.30 uur en 15.45 uur gemolken. Van de kwartieren werd de melk afzonderlijk verzameld. De melk van het melkmaal voorafgaand aan de behandeling werd bij de analyse gebruikt als blanco. Bij de eerste vier melkmalen werd na behandelingen de avondmelk na monsternamen bij 4°C en de daaropvolgende morgen bij -20°C geplaatst; de ochtendmelk werd dezelfde ochtend bij -20°C geplaatst. De daaropvolgende melkmonsters werden niet ingevroren maar wel gekoeld bewaard.

3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Derivativering

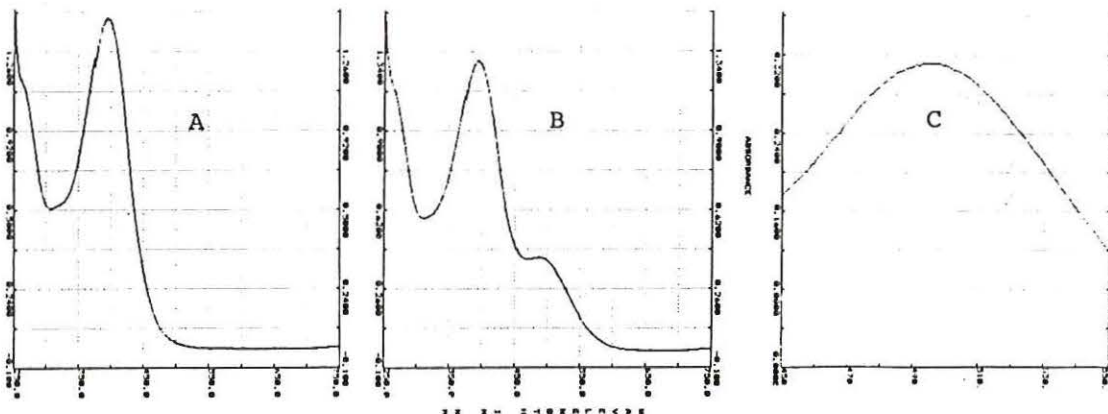
3.1.1 Inleidende experimenten

Aminoglycoside antibiotica absorberen alleen licht bij golflengten welke liggen rond 200 nm. Omdat in dit gebied zeer vele componenten absorberen blijkt derivativering of een zeer uitgebreide monstervoorbewerking noodzakelijk. Gezien de complexe matrices ligt derivativering dan voor de hand.

Door Kubo (5,6) werden twee verschillende post-column derivatiseringsreagentia, respectievelijk B-nathoquinone-4-sulfonaat en ninhydrine, beschreven voor de bepaling van DHS in serum. Geen van beide reagentia bleek, vanwege te geringe selectiviteit en gevoeligheid, toepasbaar voor de door ons onderzochte matrices. Oplossingen van fluorescamine en o-phtalaldehyde bleken eveneens ongeschikt als derivatiseringsreagens.

Bij de dunne laag chromatografie werd het gebruik van natriumnitroprusside als kleurreagens voor de detectie van guanidines beschreven (11).

Uit figuur 3 blijkt dat DHS, opgelost in water, reageert met het reagens. Het absorptiemaximum van het reactieproduct ligt bij 495 nm en de molaire extinctiecoëfficiënt is 3×10^3 . De reactie bleek snel te verlopen. Bijna onmiddellijk na het mengen werd de maximale absorptie bereikt. Van het reactiemechanisme is binnen ons laboratorium niets bekend.



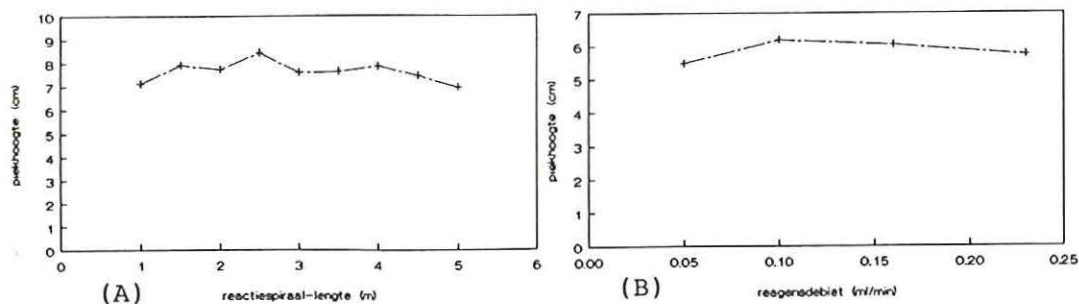
Figuur 3: UV/Vis-spectra van (A) natriumnitroprusside-oplossing gemeten t.o.v. water, (B) een mengsel van oplossingen van natriumnitroprusside en dihydrostreptomycine (1 mg/ml) t.o.v. water en (C) als B maar nu t.o.v. de natriumnitroprusside-oplossing.

Het reagens werd vervolgens getest onder post-column derivatiseringsomstandigheden. DHS werd opgelost in een door Wahl (7) toegepast eluens (0,02 M natriumhexaansulfonaat en 0,025 M natriumfosfaat in acetonitril-water (8:92)) en dit werd gemengd met het reagens. De reactie bleek onder de beschreven omstandigheden niet te verlopen. De reactie werd zowel door acetonitril als door fosfaat-ionen gehinderd, maar niet door methanol, aceton en acetaat-ionen.

3.1.2 Post-columnderivatisering

De reactie van DHS met natriumnitroprusside werd getest onder post-column derivatiseringsomstandigheden (keuze van het eluens wordt in

hoofdstuk 3.2 besproken). Zowel de reactiespiraallengte (reactietijd) als het reagensdebiet werden gevarieerd. Uit figuur 4 blijken beiden nauwelijks van invloed te zijn op de signaalhoogte.



Figuur 4: piekhoogte van dihydrostreptomycine (A) als functie van de reactiespiraallengte (reagensdebiet 0,10 ml/min) en (B) als functie van het reagensdebiet (spiraallengte 1,5 m). Overige instellingen zie tekst.

Hoewel deze experimenten niet werden uitgevoerd met het uiteindelijk gekozen chromatografische systeem maar met de Lichrosorb RP 18 kolom (0,6 ml/min) valt uit figuur 4 op te maken dat geen grote gevoeligheidswinst valt te behalen door verdere optimalisering van voornoemde parameters t.a.v. het uiteindelijk chromatografische systeem.

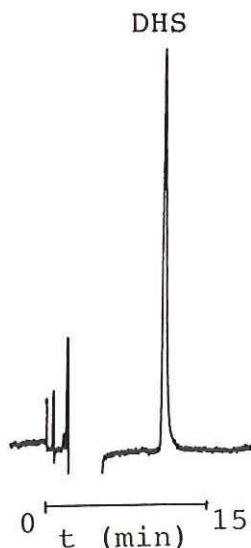
Na het toevoegen van de waterstofperoxide bij de bereiding van het reagens ontstaat een gas. Deze reactie in het reagens is van invloed op de ruis in het chromatogram. Naar de samenstelling van het reagens werd geen verder onderzoek verricht.

3.2 Chromatografie

De in de literatuur beschreven scheidingssystemen zijn gebaseerd op ion-paar chromatografie; een alkaansulfonaat als tegenion en acetonitril in de mobiele fase en met octadecyl beladen silica als stationaire fase.

Wahl (7) beschreef een scheiding welke werd uitgevoerd bij pH 6,0 terwijl anderen (5,6,8) kozen voor een lagere pH (gebied 3,0-3,3).

Gezien de pKa van DHS (=7,4) zal bij de lagere pH meer retentie worden verkregen waardoor het gehalte aan o.a. tegenion lager kan zijn. In combinatie met de post-columnreactie, welke alleen bij hogere pH verloopt (circa pH 11), is het echter noodzakelijk over een eluens te beschikken waarvan de pH makkelijk omslaat tot de voor de reactie gewenste pH. Daarom werd het chromatografische systeem beschreven door Wahl gekozen als uitgangspunt. Acetonitril en fosfaat werden, omdat deze stoffen de post-columnreactie remmen, vervangen door respectievelijk aceton en acetaat. Met methanol als "modifier" was dihydrostreptomycine wel goed chromatografeerbaar; streptomycine echter niet. In de literatuur werden voor de scheiding de volgende kolommaterialen beschreven: μ -Bondapak C₁₈, Lichrosorb RP 18, Ultrasphere Ion Pair, en Radial-Pak C₁₈ (5-8.) Uit praktische overwegingen werd door ons in eerste instantie een 100 x 3 mm I.D. kolom met Lichrosorb RP 18 toegepast. Later werd overgestapt op een 125 x 4 mm I.D. kolom gevuld met Lichrospher 100 RP 18. Niet alleen in kwaliteit maar vooral in duurzaamheid was laatstgenoemde kolom superieur aan de Lichrosorb-kolom. Het uiteindelijke scheidingssysteem was: 0,05 M natriumacetaat/0,013 M natriumhexaansulfonaat pH 6,0 + aceton (90+10 v/v) als eluens en met als kolom 125 x 4 mm I.D. Lichrospher 100 RP 18. Voor een chromatogram van een standaardoplossing zie figuur 5.



Figuur 5: Chromatogram van een standaard dihydrostreptomycine (1 μ g/ml, 0,02 AUFS, 400 μ l injectie). Voor experimentele omstandigheden zie tekst.

3.3 Monstervoorbewerking

In eerste instantie werd geprobeerd om ruwe extracten, in combinatie met kolomschakelen, te injecteren. Om aan het gestelde doel, zoals in de inleiding geformuleerd, te kunnen voldoen bleek een monstervoorbewerking noodzakelijk. Alleen door Kurosawa (8) werd een monstervoorbewerkingprocedure beschreven m.b.v. Sep-Pak C₁₈. Verder werd geen monstervoorbewerking anders dan onteiwitten m.b.v. methanol of perchloorzuur beschreven voor de bepaling van DHS.

Op basis van de fysische eigenschappen van DHS werden met behulp van standaarden een aantal oriënterende experimenten uitgevoerd.

DHS bleek, opgelost in waterig milieu, nagenoeg onvertraagd van een met methanol en water geconditioneerde Sep-Pak C₁₈ te elueren (recovery bij 5 ml standaardoplossing gevolgd door 2 ml water was 105%). Deze opzuiveringsstap bleek erg effectief bij de opwerking van urine. Gele kleurstoffen die in het chromatogram stoorden konden zodoende verwijderd worden.

DHS bleek, indien opgelost in een oplossing van 0,02 M natriumhexaansulfonaat pH 4,0, niet extraheerbaar met hexaan (verhouding 1+2). Deze partitie werd, met uitzondering voor schijfjes verzadigd met nierbekenvocht, algemeen toegepast om het uiteindelijke extract te zuiveren van resterende apolaire componenten.

Opconcentreren van DHS was mogelijk door DHS, opgelost in 10 ml water + fysiologische zoutoplossing (1+2) te mengen met 40 ml 0,01 M natriumacetaat/0,08 M natriumheptaansulfonaat pH 4,0 en deze oplossing over een vooraf geconditioneerde Sep-Pak C₁₈ te leiden (recovery 97%). Bij lagere concentraties aan heptaansulfonaat, in ieder geval vanaf 0,04 molair, bleek verlies op te treden (recovery 88%). Standaarden bleken daarna met 3 ml aceton goed van de Sep-Pak te elueren. In de aanwezigheid van monstermatrix bleek de elutie met aceton echter niet succesvol (recovery 55%). Met methanol als elutiemiddel werd zowel voor standaarden als voor monsters met toevoeging een recovery van minimaal 95% gevonden. Deze concentrerings- en zuiveringsstap werd met succes toegepast bij ei, urine en melk.

Door Barends (4) werd aangegeven dat aminoglycoside antibiotica aan glas kunnen binden. Daarom werd besloten na de clean-up/opconcentreringsstap niet tot droog in te dampen om zodoende heroplossingsproblemen te voorkomen. Het eluaat van de Sep-Pak werd ingedampt totdat na genoeg alle methanol was verdampt en circa 400 µl waterige fase resteerde (dood volume van Sep-Pak). Om kwantitatief te kunnen werken werd na indampen aangevuld tot 2 ml in een gecalibreerde puntbuis. Bij de totale monstervoorbewerking werd, afhankelijk van de matrix, een faktor 1,5-2,5 geconcentreerd.

3.4 Preconcentreren d.m.v. kolomschakelen

Bij een inwendige diameter van de analytische kolom van 3 tot 4 mm is een injectievolume van 200 µl het maximum. Uitgaande van een eindextract van 2 ml en een 200 µl injectie zou de bepaalbaarheidsgrens te hoog uitvallen. Daarom werd, analoog aan b.v. de bepaling van carbadox en metabolieten (3), gekozen voor kolomschakeling. Een relatief groot volume wordt op een kleine kolom geïnjecteerd. Het kolommetje wordt eventueel gespoeld en wordt vervolgens in het hoge druk systeem geschakeld.

Om de toepassingsmogelijkheden van diverse pakkingsmaterialen voor de concentreringskolom te testen werd 1 ml standaard in 0,01 M natriumacetaat/0,01 M natriumhexaansulfonaat pH 4,0 geïnjecteerd op een 10 x 2,1 mm I.D. concentreringskolom (20 µm screens). Na injectie werd de kolom gespoeld met een variabel volume 0,01 M natriumacetaat/0,01 M natriumhexaansulfonaat pH 4,0, tegenstroom geëluëerd gedurende 5 minuten en vervolgens werd de DHS-piekhoogte vastgesteld. In totaal werden vijf typen kolom materiaal getest. Zowel bij Sep-Pak als bij Hypersil bleek na spoelen met 4 ml geen doorbraak op te treden. Bij alle andere materialen trad reeds bij de injectie (volume <1 ml) doorbraak op. Gezien de beschikbaarheid werd voor Sep-Pak C₁₈ als pakkingsmateriaal gekozen.

Dit materiaal werd verder getest met behulp van monsters met toevoegingen van DHS. Bij monsterextracten bleek het signaal in de tijd onafhankelijk van het spoelvolume van de concentreringskolom af te nemen. Als voorbeeld zie tabel I.

Tabel I: Piekhoogten DHS (cm) van monsters en standaarden in de tijd

injectie van:	piekhoogte DHS (cm)
standaard	8,50
standaard	8,30
monster met toevoeging	5,00
monster met toevoeging	1,50
standaard	7,80
standaard	8,05

Uit tabel I blijkt dat, hoewel uit het zelfde flesje geïnjecteerd, bij het monster met toevoeging een enorme afname voor de tweede injectie optreedt, terwijl voor de standaarden een constante piekhoogte wordt waargenomen, ook nadat monsters zijn geïnjecteerd.

Ook bij verlenging van de tegenstroomspoeltijd tot 10 minuten (= 86 keer het kolomvolume) bleek het effect op te treden, waarschijnlijk veroorzaakt door overbelading door matrix van de concentreringskolom. Daarom werd de concentreringskolom voor iedere injectie gespoeld c.q. geactiveerd.

Tabel II: Spoelschema van concentreringskolom (10x3 mm I.D.)

Vloeistof	volume (μ l)	aantal keren het kolomvolume
water	750	11
acetonitril	1000	14
water	750	11
0,01 M natriumacetaat/	2250	32
0,02 M hexaansulfonaat		

Tabel II geeft een overzicht van de uiteindelijke spoelprocedure. Met dit systeem kon goed reproduceerbaar geïnjecteerd worden ($n=14$, $VC=5\%$). Er werd geen afname van het signaal in de tijd waargenomen bij injectie van monsters met standaardtoevoegingen.

De concentreringskolom werd dagelijks vervangen.

3.5 Karakterisering van de methode

Met de uiteindelijke methode werden verschillende experimenten uitgevoerd om de toepasbaarheid te bepalen.

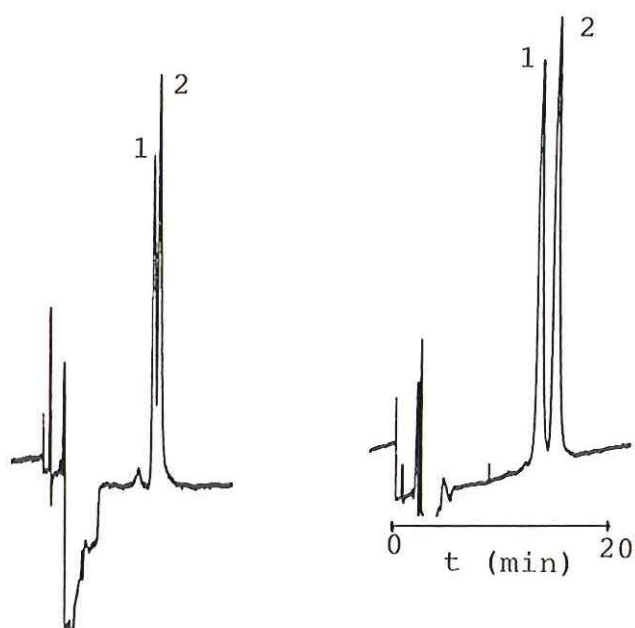
Om de lineariteit vast te stellen werd van een standaardreeks $400 \mu\text{l}$ geïnjecteerd. Op basis van piekhoogte was de ijklijn recht ($r^2=0,9998$) tussen $0,10$ en $5,0 \mu\text{g/ml}$ (absoluut gezien tussen 40 ng en 2000 ng). Op basis van piekoppervlakte was de ijklijn tot minimaal $50 \mu\text{g/ml}$ recht ($r^2=0,9998$).

Om de selectiviteit van de methode te testen werd een aantal diergeneesmiddelen op het systeem geïnjecteerd met een concentratie welke overeenkomt met minimaal 30 mg/kg van de desbetreffende component in biologische matrices. Geen van de verbindingen vermeld in tabel III stoorde de bepaling van DHS.

Tabel III : Overzicht van diergeneesmiddelen welke niet storen bij de bepaling van dihydrostreptomycine tot een niveau van minimaal 30 mg/kg biologische matrix.

neomycine	kanamycine	gentamycine
chlooramfenicol	sulfaguanidine	monensin
salinomycine	narasin	tetracycline
chloortetracycline	doxycycline	rifamycine
ampicilline	penicilline	cloxacilline
lincomycine	erythromycine	oleandomycine
spiramycine	tylosine	avoparcine
bacitracine	novobiocine	spectinomycine

Streptomycine gaf wel een piek in het chromatogram te zien. Door aanpassing van het eluens kunnen beide componenten van elkaar gescheiden worden (zie figuur 6).



Figuur 6: Chromatogrammen van mengsel van dihydrostreptomycine en streptomycine (1 $\mu\text{g/ml}$), (A) eluens met 10% aceton, 400 μl injectie en (B) met 8% aceton, 800 μl injectie. Voor experimentele omstandigheden zie tekst.

Vervolgens werd het gemiddelde terugvindingspercentage vastgesteld. Circa 15 minuten na toevoeging werden de monsters geanalyseerd. De resultaten zijn weergegeven in tabel IV.

Tabel IV: Terugvindingspercentages voor melk, ei, urine en schijfjes (toevoeging aan ei, melk en urine: 1 mg/kg, schijfjes: 10 mg/kg).

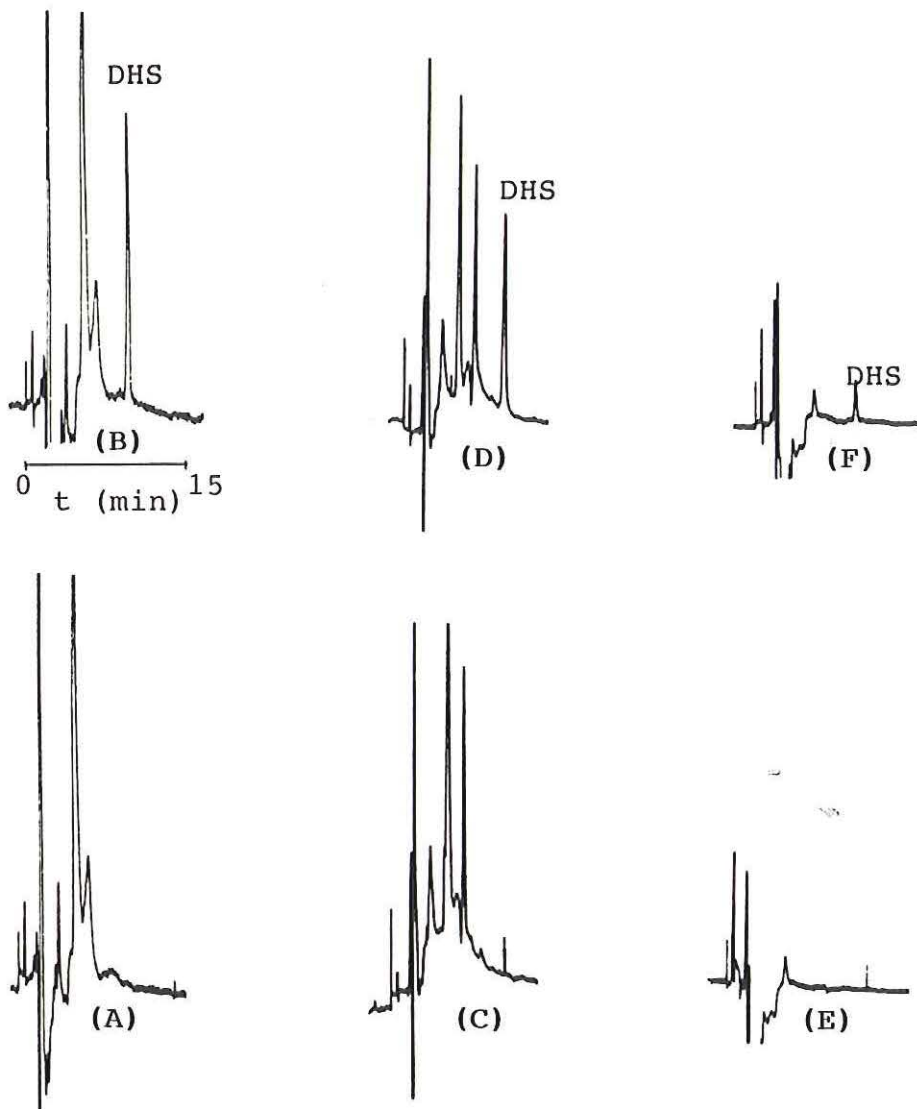
Matrix	gemiddelde terugvindingspercentage (%)	variatie coëfficiënt (%)	aantal waarnemingen
melk	106,6	6,1	14
ei	99,1	8,1	10
urine	89,2	6,0	5
schijfjes	107,2	4,3	6

Het hoge niveau van de terugvindingspercentages wijst op het feit dat geen verlies optreedt ten gevolge van matrixinvloeden of ten gevolge van de toegepaste analysemethode. Het niveau voor urine ligt wat lager dan dat van de andere matrices. Dit kan verklaard worden door het feit dat bij de pH-instelling erg veel azijnzuur nodig was om pH 4,0 te bereiken. Voor deze volumefout is niet gecorrigeerd bij de berekening van het terugvindingspercentage.

De gecallibreerde puntbuisjes bleken niet erg betrouwbaar (maatstreep 2 ml bleek 1,92 ml, VC 13%, n=10). De nauwkeurigheid van de methode kan zeer waarschijnlijk verbeterd worden door streptomycine als interne standaard te gebruiken.

Aan de hand van chromatogrammen van onafhankelijke blanco monsters werden de bepaalbaarheidsgrenzen berekend ($\bar{x}_{bl} + 6s$). Voor ei werd een bepaalbaarheidsgrens van 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gevonden (n=10), voor melk een waarde van 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (n=10) en voor schijfjes 1,5 mg/ml (n=6). Van urine was slechts één blanco monster beschikbaar en wordt om die reden buiten beschouwing gelaten. Het ruïsniveau kan enigzins variëren bijvoorbeeld als gevolg van de toestand van de pompslang maar ook de ouderdom van het derivatiseringsreagens is van invloed.

Voor chromatogrammen van blanco's, blanco's met toevoegingen en een positief monster zie figuur 7.

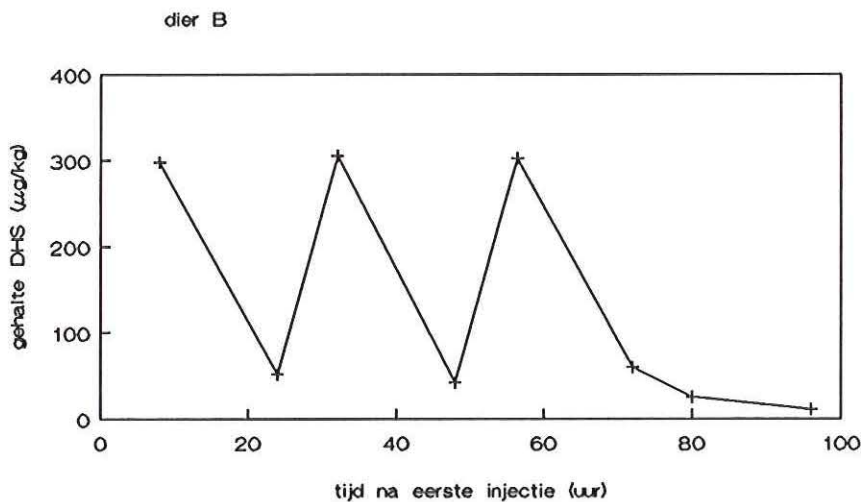


Figuur 7: Chromatogrammen verkregen met de uiteindelijke procedure. De onderste chromatogrammen zijn blanco's, de bovenste chromatogrammen zijn monsters met dihydrostreptomycine : (A) blanco ei, (B) blanco ei met toevoeging van DHS, 1 $\mu\text{g/ml}$, (C) blanco melk, 1 ml injectie, (D) positief monster melk, 302 $\mu\text{g/ml}$, 1 ml injectie, (E) blanco nierbekkenvocht, 1 ml injectie en (F) blanco nierbekkenvocht met toevoeging van DHS, 1 $\mu\text{g/ml}$, 1 ml injectie.

3.6 Uitscheidingsexperiment

3.6.1 Intramusculaire toediening

De resultaten van het uitscheidingsexperiment zijn weergegeven in tabel V. Hieruit blijkt dat, bij 400 µl injectie, DHS tot 2 melkmalen (24 uur) na de laatste toediening (10 mg/kg i.m.) in melk aangetoond kan worden en bij 1 ml injectie op het HPLC-systeem tot 4 melkmalen (48 uur) na toediening. De hoogste concentraties aan DHS worden in de melk van het melkmaal volgend op de intramusculaire toediening gevonden. Dit niveau blijkt na iedere injectie bereikt te worden (na 8,5-32,5 en 56,5 uur). Het gehalte wordt niet hoger als gevolg van herhaalde behandeling. De concentratie na 24, 48 en 72 uur blijkt vrij constant. De waarden gevonden voor dier B zijn ook grafisch in figuur 8 weergegeven.



Figuur 8: Uitscheidingscurve van dihydrostreptomycine via melk na intramusculaire behandeling van koe B (zie ook tabel V).

Het relatief lage gehalte van DHS in melk is een gevolg van het feit dat het transport vanuit het plasma naar de melk moeizaam verloopt. Deze barrière kan alleen goed door apolaire verbindingen genomen worden. In melkvet behoeft, na intramusculaire toediening, geen DHS te worden verwacht (12).

De uitscheiding via de melk verloopt voor beide dieren nagenoeg gelijk.

Tabel V : Gehalte aan dihydrostreptomycine ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in melk na intramusculaire toediening van DHS. Na 24 en 48 uur werd de toediening herhaald. Twee koeien werden behandeld.

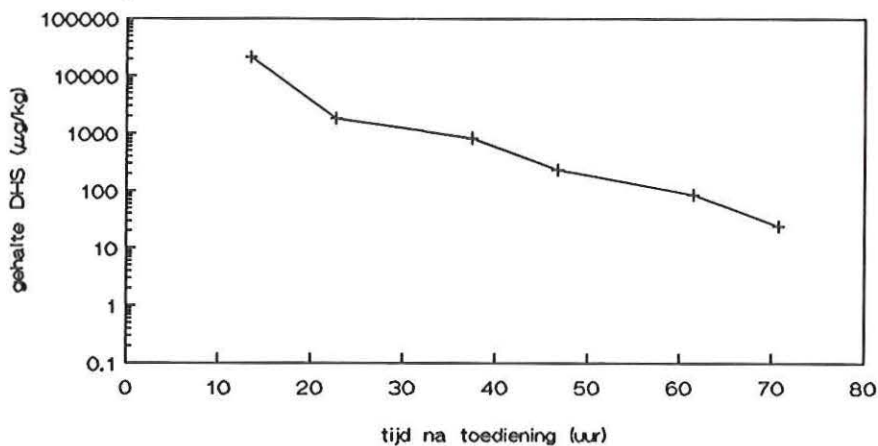
tijd na 1 ^e toediening (uur)	gehalte dihydrostreptomycine ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	dier A	dier B
8,5	280	298
24	80	52
32,5	310	305
48	62*	40*
56,5	320	302*
72	120	60*
80,5	<50	25*
96	n.a.	11*

* : De gehalten zijn bepaald m.b.v. 1 ml HPLC-injectie. Bij het gehalte van 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was de signaalruisverhouding 3:1.

n.a.: niet geanalyseerd.

3.6.2 Intramammaire toediening

Uit figuur 9 en tabel VI blijkt dat DHS nog tot en met het zesde melkmaal (71 uur) na toediening in melk van het behandelde kwartier kan worden aangetoond. De hoogste concentratie aan DHS is 21,5 mg/kg, en wordt gevonden in melk van de melkbeurt na toediening. Uiteraard liggen de gehalten bij deze toedieningsvorm vele malen hoger dan na intramusculaire injectie omdat het preparaat via de speen rechtstreeks in het uiercompartiment wordt ingespoten.



Figuur 9: Uitscheidingscurve van dihydrostreptomycine via melk van het behandelde kwartier na intramammaire behandeling.

In de melk van de niet behandelde kwartieren kon geen DHS worden aangetoond. Daarom werd alleen melk van het behandelde kwartier onderzocht.

Er werd bij de analyse 1 ml monsterextract geïnjecteerd.

Tabel VI: Gehalte aan dihydrostreptomycine (µg/kg) in melk van het behandelde kwartier na intramammaire toediening.

tijd na toediening (uur)	gehalte dihydrostreptomycine (µg/kg)
13,5	21500
23	1820
37,5	825
47	233
61,5	86
71	24
85,5	<15

4 CONCLUSIES

Een snelle, relatief gevoelige en selectieve methode is ontwikkeld voor de bepaling van residuen van dihydrostreptomycine in melk, ei, urine en in met nierbekkenvocht verzadigde filtreerschijfjes.

De bepaalbaarheidsgrens ligt lager dan 100 µg/kg. Alleen voor de met pré-urine verzadigde schijfjes bedraagt deze 1,5 mg/kg. Dit is even hoog als met de EEG 4-platentest; de detectiegrens van de Nieuwe Nederlandse Niertest is groter dan 30 mg/kg.

Het totaal gemiddelde terugvindingspercentage is 101% (n=29), schijfjes niet meegerekend.

Minimaal 25 monsters kunnen per dag per persoon per opstelling worden geanalyseerd. De methode werd getest op praktijkmonsters melk. Na intramusculaire injectie kon nog tot maximaal 48 uur na toediening dihydrostreptomycine in de melk worden aangetoond. Na intramammaire injectie kon nog tot 71 uur na toediening dihydrostreptomycine worden aangetoond.

Door verdere optimalisering van de methode is het zeer waarschijnlijk mogelijk de bepaalbaarheidsgrens te verlagen.

LITERATUUR

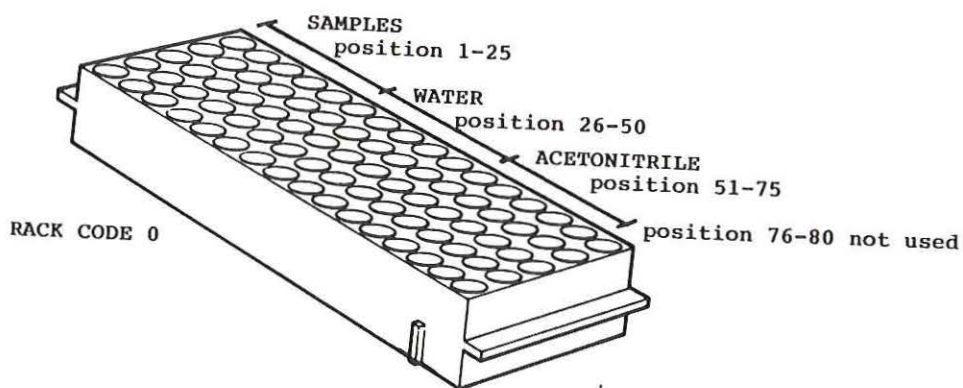
1. J. Bérdy (ed), Handbook of antibiotic compounds, Volume I Carbohydrates Antibiotics. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida (USA) p. 91-96.
2. M. Windholz (ed), The Merck Index, ninth edition. Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., (USA) 1976.
3. M.M.L. Aerts, Residues of veterinary drugs in edible products, an analytical approach, thesis, State Institute for Quality Control of Agricultural Products, Wageningen (The Netherlands) 1990.
4. D.M. Barends, High performance liquid chromatographic analysis of aminoglycosides in serum by a nitrophenylation technique, thesis, University of Utrecht, Utrecht (The Netherlands) 1985.
5. H. Kubo, Y. Kobayashi and T. Kinoshita, Anal. Chem., 58 (1986) 2653.

6. H. Kubo, H. Li, Y. Kobayashi and T. Kinoshita, *Anal. Biochem.*, 162 (1987) 219.
7. T.J. Whall, *J. Chromatogr.*, 219 (1981) 89.
8. N. Kurosawa, S. Kuribayashi, E. Owada, K. Ito, M. Nioka, M. Arakawa and R Fukuda, *J. Chromatogr.*, 343 (1985) 379.
9. J.F.M. Nouws, N.J.G. Broex and J.M.P. den Hartog, *Tijdschr. Diergeneesk.* 113 (1988) 243.
10. R. Smither and D.R. Vaughan, *J. Appl. Bact.*, 44 (1978) 421.
11. E. Merck AG, *Anfarbereagenzien für Dünnschicht und Papier-Chromatographie*, E. Merck AG Darmstadt (FRG) p. 41.
12. G. Ziv and F. Rasmussen, *J. Dairy Sci.* 58 (1975) 938.

PROGRAMMA VOOR DE 231/401 GILSON INJECTOR TEN BEHOEVE VAN INJECTIE VAN
EXTRACTEN VOOR DE BEPALING VAN DIHYDROSTREPTOMYCINE

Toelichting:

De concentreringskolom was rechtstreeks op de Rheodyne kraan model 7010 gemonteerd (figuur 2). De 401 dilutor werd gevuld met 0,01 M natriumacetaat/ 0,02 M natriumhexaansulfonaat. De code van het toegepaste monsterflesjesrek was 0 (totaal 80 posities). De indeling van het rek was als volgt: de plaatsen 1 t/m 25 werden gereserveerd voor de monsters, de plaatsen 26 t/m 50 voor flesjes gevuld met water en de plaatsen 51 t/m 75 waren bestemd voor flesjes gevuld met acetonitril. Posities 76 t/m 80 werden niet gebruikt (figuur A1). Een spuit met inhoud van 1 ml was gemonteerd op de dilutor.



Figuur A1: Schematische weergave van de indeling van het injectierek.

programma:

regelnummer	opdracht	toelichting
1	Input A0/23/1/1000	voer injectievolume in
2	Input B15/0/1/25	voer aantal monsters in
3	Input C11/73/1/500	voer backflushtijd in (x 0,01min)
4	C0 = 0	monsterteller op nul zetten
5	Rack code 0	monsterrek definiëren
6	For a = 1/5	openen van programmalus, bepaald
7	For b = 1/5	samen met regel 7 plaats in rek
8	C0 = C0 + 1	hoog monsterteller op met 1
9	If C0 > B15	als alle monsters geïnjecteerd
10	Home	zijn dan stoppen, anders doorgaan
11	Tube A+5/B	ga naar positie A+5/B in rek (water)
12	Aspir 0/750/3	dilutor (adres 0) zuigt 750 µl op met snelheid 3 (1,5 ml/min)
13	Wait 5	wacht 0,05 minuut
14	Tube 0/0	ga naar injectiepoort
15	Inject 0	kraan schakelt in load-positie
16	Disp 0/750/3	dilutor geeft 750 µl af
17	Wait 5	
18	Tube A+10/B	ga naar positie A+10/B (acetonitril)
19	Aspir 0/1000/3	
20	Wait 5	
21	Tube 0/0	
22	Disp 0/1000/3	
23	Wait 5	
24	Tube A+5/B	
25	Aspir 0/750/3	
26	Wait 5	
27	Tube 0/0	

28	Disp 0/3000/3/9	geef 750 µl water en 2250 µl uit vat (gebufferde 0,02 M HexSO ₃ ⁻) af.
29	Wait 5	
30	Tube A/B	ga naar monsterflesje op positie A/B
31	Aspir 0/A0/1	zuig A0 µl monster op (regel 1)
32	Tube 0/0	
33	Disp 0/A0+1000/3/9	geef injectievolume+1000 µl uit vat
34	Wait 5	
35	Inject 1	schakel kraan in inject-positie
36	Print C0/1	display geeft monsternummer aan
37	Wait C11	wacht C11x0,01 min. (regel 3)
38	Inject 0	schakel kraan terug, einde backflush
39	Wait 900	
40	Next B	sluit lus af
41	Next A	sluit lus af