

Quantitativer Nachweis des Carbadox-Metaboliten Chinoxalin-2-carbonsäure (QCA) in Fleisch mit LC-MS/MS und deuteriertem internem Standard

Autor(en): **Guggisberg, Dominik / Mooser, André E. / Koch, Herbert**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **94 (2003)**

Heft 1

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-981982>

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.

Quantitativer Nachweis des Carbadox-Metaboliten Chinoxalin-2-carbonsäure (QCA) in Fleisch mit LC-MS/MS und deuteriertem internem Standard

Dominik Guggisberg, André E. Mooser und Herbert Koch,
Bundesamt für Veterinärwesen, Liebefeld, Bern

Eingegangen 2. September 2002, angenommen 21. November 2002

Einleitung

Carbadox (CBX) wurde lange Zeit als Futtermittelzusatz (Mischfutter für Ferkel) mit Wartezeitaufgabe eingesetzt. Es wird futtermittelrechtlich zu den Wachstumsförderern gezählt (1). Die Zulassung wurde in der Schweiz per 1. Januar 1999 gestoppt (2), da Carbadox und einige der Metaboliten schon sehr lange im Verdacht stehen, mutagen und karzinogen zu wirken (3). Die sehr rasche Metabolisierung ist ebenfalls seit langem bekannt, so dass es wenig Sinn macht, Carbadox in Lebensmitteln tierischer Herkunft zu suchen. Vielmehr ist es sinnvoll, die Metaboliten, im Speziellen den letzten bekannten Hauptmetaboliten Chinoxalin-2-carbonsäure (QCA), zu extrahieren und zu analysieren (4). CBX und QCA sowie weitere bekannte Metaboliten sind in der Abbildung 1 dargestellt.

G. de Graaf et al. (5) vermuten allerdings aus ihren Beobachtungen, dass noch weitere bislang unbekannte Metaboliten existieren könnten, die bei der alkalischen Extraktion in QCA umgewandelt werden.

Kennzeichnend für die Struktur von Carbadox ist das heterocyclische ringförmige Grundgerüst (Quinoxaline) mit einer Seitenkette. Es wurde berichtet (6), dass Carbadox zwar als Zusatz zu Muskelfleisch¹ stabil ist, als Zusatz zu Leber und Niere jedoch sehr rasch zu Desoxy-Carbadox zerfällt. Dagegen kann wegen des raschen und komplizierten Metabolismus² kein Carbadox in Muskelfleisch von

¹Wirkstoffzusatz-Experimente belegen diese Tatsache.

²Reduktion der N-Oxid-Gruppen, Umwandlung der Seitenkette in eine Carbonsäure.

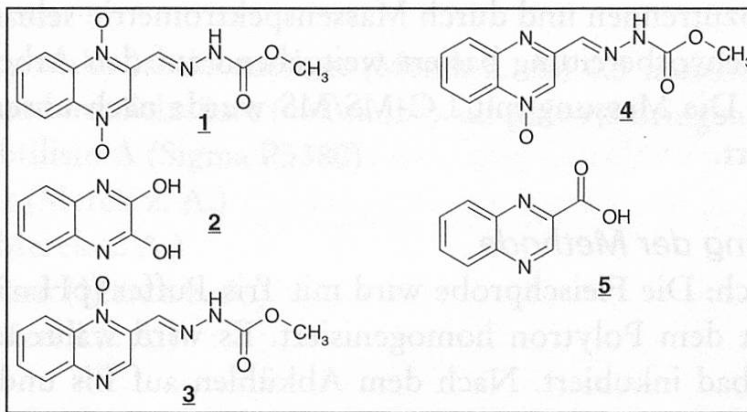


Abbildung 1 **Chemische Strukturen von Carbadox und den bekannten Metaboliten:**
 1 = Carbadox (Muttersubstanz; CBX)
 2 = Dihydroxyquinoxaline
 3 = N4-Deshydroxycarbadox (DCB)
 4 = N1-Deshydroxycarbadox (DCB)
 5 = Quinoxaline-carboxylic acid (Hauptmetabolit; QCA)

behandelten Schweinen gefunden werden. Carbadox ist zudem instabil am Tageslicht (7). Die Kinetik des Metaboliten QCA wurde von *A.J. Baars et al.* intensiv untersucht (8). Demnach ist QCA in Plasma, in Lebern und Nieren gut nachweisbar. In Muskelfleisch ist der Stoff nur drei Tage nach dem Absetzen noch nachweisbar. In Lebern wurde die Kinetik von *L.A. van Ginkel et al.* untersucht (9). Bis zu 40 Tage nach dem Absetzen von Carbadox ist QCA in der Leber nachweisbar.

Rückstände von Carbadox und seinen Metaboliten im Fleisch von Schweinen stellen für den Konsumenten eine potentielle gesundheitliche Gefahr dar.

Damit eine möglichst grosse Anzahl von tierischen Gewebeproben (Fleisch und Innereien) auf den Carbadox-Metaboliten QCA überprüfbar ist, benötigten wir eine Analysenmethode mit genügender Empfindlichkeit und hohem Durchsatz.

Die Analyse von QCA in Lebensmitteln tierischer Herkunft ist durch zwei Umstände erschwert:

- die Wirkstoffe müssen für den Nachweis mittels GC-MS zu stabilen Derivaten umgesetzt und mit präparativer HPLC gereinigt werden.
- für den empfindlichen Nachweis nach der Auftrennung durch HPLC fehlen starke UV- oder Fluoreszenzabsorption. Vorsäulen- oder Nachsäulenderivatisierungen für QCA sind uns keine bekannt.

Deshalb wird QCA im Massenspektrometer des LC-MS/MS detektiert.

Wir berichten in der folgenden Arbeit von einer LC-MS/MS-Methode für den Nachweis von QCA in Fleisch vom Schwein oder Rind, unter Verwendung eines deuterierten internen Standards. Es geht in der Methode darum, QCA aus der Fleischmatrix zu extrahieren und durch Flüssig-Flüssig-Extraktion möglichst rein

und quantitativ anzureichern, danach mit HPLC möglichst vollständig von der Fleisch-Matrix abzutrennen und durch Massenspektrometrie sehr selektiv nachzuweisen. Die Probenvorbereitung basiert weitgehend auf den Arbeiten von *L. van Ginkel et al.* (9). Die Messung mit LC-MS/MS wurde nach unseren Kenntnissen noch nie publiziert.

Kurzbeschreibung der Methode

Schweinefleisch: Die Fleischprobe wird mit Tris-Puffer (pH=9,5) versetzt und anschliessend mit dem Polytron homogenisiert. Es wird während 2 Stunden bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis und Zentrifugieren, wird mit 0,35 ml Eisessig (Essigsäure konz.) verdünnt. Es wird mit Diethylether und Essigester entfettet. Nun wird der pH mit Salzsäure auf < 1 gestellt. Vorhandenes QCA wird dreimal mit je 3–5 ml Essigester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit Stickstoff bei 40 °C zur Trockene eingeengt und in Methanol aufgenommen. Der Nachweis erfolgt mit LC-MS/MS.

Material und Methode

Standardsubstanzen und Bezugsquellen

QCA: Aldrich (29,340-7)

QCA-d4: rivm³

Die Herstellung der Stammlösung und der Verdünnungslösungen ist in der Tabelle 1 beschrieben. (Die Reinheit des Wirkstoffs kann je nach Charge geringfügig schwanken, deshalb ist die Gehaltsangabe des Lieferanten auf dem Analysenzeugnis zu beachten!)

Tabelle 1
Herstellung der Stamm- und Verdünnungslösungen

<i>Stammlösung</i>	
– QCA	10,3 mg QCA einwiegen und in 10 ml H ₂ O lösen
– QCA-d4	–
Standard I QCA	100 µl der Stammlösung werden mit Milli-Q-Wasser auf 10 ml aufgefüllt (= 10 ng/µl)
Standard I QCA-d4	Ampulle mit QCA-d4 in 10 ml H ₂ O lösen (= 10 ng/µl)
Standard II	1000 µl des Standards I werden mit Milli-Q-Wasser auf 10 ml aufgefüllt (= je 1 ng/µl)
Standard III (LC-MS)	100 µl des Standards II mit Milli-Q-Wasser auf 1 ml aufgefüllt (= je 0,1 ng/µl)

³rivm, Antonie van Leeuwenhoeklaan 9, P.O. Box 1, 3720 BA BILTHOVEN, The Netherlands

Chemikalien und Material für das Clean up

- Milli-Q-Wasser
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck z. A.) 0,5 mol/l=60,6 g Tris auf 1 l verdünnen und mit Salzsäure (c=1 mol/l) auf pH=9,5 bringen.
- Protease Subtilisin A (Sigma P5380)
- Diethylether (Merck z. A.)
- Essigester (Merck z. A.)
- Salzsäure konz. (Merck z. A.)
- Methanol (Merck z. A.)

Reagenzien LC-MS

Mobile Phase

- Acetonitril (LiChrosolv, Merck)
 - Milli-Q-Wasser mit 1 % Ameisensäure
- Acetonitril/Ameisensäure (1 % in Milli-Q-Wasser (v/v))=25/75

Geräte und Hilfsmittel

- Analysenwaage (0,1 mg, Mettler)
- Probenzerkleinerungsgerät Moulinette (Moulinex)
- Glaszentrifugengläser (90 ml, mit Deckel)
- Glaszentrifugengläser (10 ml, mit Deckel)
- Laborschnellwaage (Mettler)
- Polytron-Homogenisiergerät mit 12 mm-Mixstab
- Laborzentrifuge (Heraeus, Hettich bis 4000 U/min)
- Vakuum-Einheit für spe-Trennsäulen
- Wasserschüttelbad (Salvis)
- Vortex
- Dispenser, 10–50 ml (Soccorex)
- Trichter
- 100- μ l-Spritze (Hamilton)
- 250- μ l-Spritze (Hamilton)
- 1000- μ l-Spritze (Hamilton)
- 10-ml-Reagenzglas
- 1,5-ml-Autosampler-Vials mit Insert
- HPLC-Apparatur: z. Bsp. Waters 2690
- Massenspektrometer z. Bsp. Micromass

Probenaufbereitung

Extraktion der Probe

Die Fleischprobe wird aufgetaut und wenn möglich ohne Fett mit der Moulinette homogenisiert. 5 g davon werden im Zentrifugenglas mit deuteriertem QCA und 20 ml $c(\text{Tris-Puffer})=0,5 \text{ mol/l}$ (und 20 mg Subtilisin A⁴) versetzt und mit dem Polytron homogenisiert. Die Probe wird während 2 Stunden bei 60°C im Wasserschüttelbad inkubiert. Es erfolgt nach der Eisbadkühlung die Zugabe von 0,35 ml konz. Essigsäure ($\text{pH} \approx 8$). Die Probe wird 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und mit 5 ml Diethylether versetzt.

Reinigung der Probe

Die Probe wird kräftig geschüttelt und 5 min zentrifugiert (4000 U/min). Die organische Phase wird verworfen. Die Zugabe von 5 ml Diethylether wird wiederholt. Nach kräftigem Schütteln wird erneut 5 min zentrifugiert (4000 U/min). Die organische Phase wird verworfen. Nach der Zugabe von 5 ml Essigester wird kräftig geschüttelt und 5 min zentrifugiert (4000 U/min). Die organische Phase wird verworfen.

Nun wird der pH auf <1 mit 1 ml konz. Salzsäure gebracht. Die Probe wird 3 × mit 3–5 ml Essigester extrahiert, dazwischen wird jeweils ca. 10 min zentrifugiert. Die vereinten organischen Phasen werden bei 40°C mit Stickstoff zur Trockene eingengt. Die Probe wird mit 0,5 ml MeOH aufgenommen, gut geschüttelt und in ein Insert-Vial abgefüllt. Von dieser Lösung werden 10 µl in das LC-MS/MS injiziert.

Analyse mit HPLC: Bedingungen, Vorgehen und Auswertung

Bedingungen, Parameter LC-MS

Gerät:	Waters 2690
Vorsäule:	XTerra MS C18, 3 × 20 mm (Waters, Part. Nr. 186000656)
Säule:	Stahlkartusche, 150 mm × 3 mm (Waters, Part. Nr. 186000562)
Stationäre Phase:	XTerra, MS C18, 5 µm
Mobile Phase:	A: 25 % Acetonitril B: 75 % 1 % Ameisensäure
Flussrate:	0,25 ml/min
Maximaldruck:	300 bar
Ofentemperatur:	25°C

⁴Das Produkt von Sigma ist sehr teuer. Möglicherweise würde aber auch ein billigeres Produkt von Fluka (Proteinase 96887) ausreichen. Da keine «positiven» Proben vorhanden waren, konnte bisher nicht abgeklärt werden, ob das Produkt überhaupt einen wesentlichen Einfluss auf die Recovery von «gewachsenen» Proben hat.

Einspritzvolumen: 10 µl
 Elutionsdauer gesamt: 10 min (Peak bei ca. 6 min)
 Detektor: QuattroLC Massenspektrometer, MRM-Mode⁵
 Auswertesoftware: MassLynx
 Die Tune-Parameter sind in der Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2
Die Tune-Parameter des LC-MS/MS

<i>Parameter</i>	<i>Wert</i>	<i>Parameter</i>	<i>Wert</i>
Capillary:	2,5 kV	Extractor	3 V
RF-Lens	0,20 V	Source Block Temp.	135 °C
Desolv. Temp.	350 °C	LM Res1 –	12
HM Res1	12	I Energy1	0,5
Entrance	0	Exit	0
LM Res2	12	HM Res2	12
I Energy2	2	Multiplier	650

Die Gasflüsse (Stickstoff und Argon) sind jeweils auf den MRM-Mode optimiert. In der Tabelle 3 sind die Werte für Mutter- und Tochterionen aufgezeigt.

Tabelle 3
Parameter für Mutter- und Tochterionen

<i>QCA</i>	<i>Mutterion</i>	<i>Tochterion</i>	<i>Cone (V)</i>	<i>Collision</i>	<i>Bemerkung</i> <i>(Ladungszustand)</i>
QCA	175,10	129	30	15	(M+H) ⁺
QCA-d4	179,10	133	30	15	(M+H) ⁺

Die «Dwell-time» wurde auf 1,0 Sekunden gesetzt. Es wurde leider nur ein intensives Fragmention gefunden und für die Quantifizierung verwendet. Die Berechnung von QCA erfolgt über den internen deuterierten Standard QCA-d4.

Validierung der Methode

Die Methode wurde durch eine Validierung bei 2 µg/kg überprüft. Die Resultate sind in der Tabelle 4 aufgeführt. Die Quantifizierung erfolgt über den deuterierten internen Standard QCA-d4. Interessanterweise ist die Recovery des internen Standards etwas geringer als QCA, deshalb wird sie mit >100% angegeben. Die Methode wurde für Schweinefleisch und Rindfleisch überprüft. Die Validierung wurde mit Rindfleisch durchgeführt.

Aus der Abbildung 2 geht die Linearität der Standards hervor.

⁵MRM-Mode bedeutet «Multiple Reaction Monitoring» und entspricht dem MS-MS-Modus bei dem die beiden Quadrupole MS1 und MS2 statisch betrieben werden.

Bestimmungsgrenze/Auswertung

Die probenbezogene Bestimmungsgrenze für QCA beträgt ca. 4 µg/kg. Die Auswertung der Resultate erfolgt über den internen Standard QCA-d4. Dabei entsprechen 10 µl × 0,1 ng/µl (Standard III) genau 10 µg/kg QCA bei 100 % Wiederfindung.⁶

Tabelle 4

Wiederfindungen bei dotiertem Rindfleisch

Rindfleisch: Dotierter Gehalt (µg/kg) ⁷	Anzahl	Mittelwert (µg/kg)	Standard- abweichung (µg/kg)	Relative Standard- abweichung (%)	Mittlere Wiederfindung (%)
2 µg/kg QCA	5	2,2	0,13	5,8	110,2

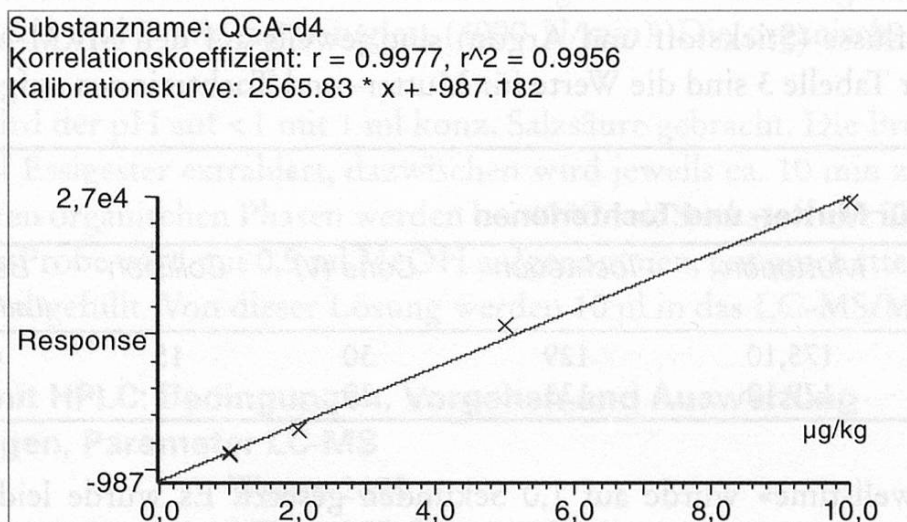


Abbildung 2 Kalibrierkurve von QCA-d4 zur Auswertung über internen Standard

Diskussion

Die verbotene Anwendung von Carbadox bei Nutztieren kann durch den Nachweis von Chinoxalin-2-carbonsäure (QCA) überprüft werden. Zur Überprüfung der Methode konnten bisher keine Proben von nachweislich behandelten Schweinen analysiert werden. In der Abbildung 3 ist eine mit Wirkstoffzusatz

⁶Umrechnungsbeispiel:

10 µg/kg entsprechen 10 ng QCA pro Gramm Fleisch oder 50 ng QCA pro 5 Gramm Fleisch. Dies entspricht nach der Aufarbeitung von 5 Gramm Fleisch einer gesamten Flüssigkeitsmenge von 500 µl. Davon werden 10 µl direkt ins HPLC-System eingespritzt.

⁷Die Validierung wurde auch bei 5 und 1 µg/kg wiederholt (n=5). Der Regressionskoeffizient beträgt 0,98.

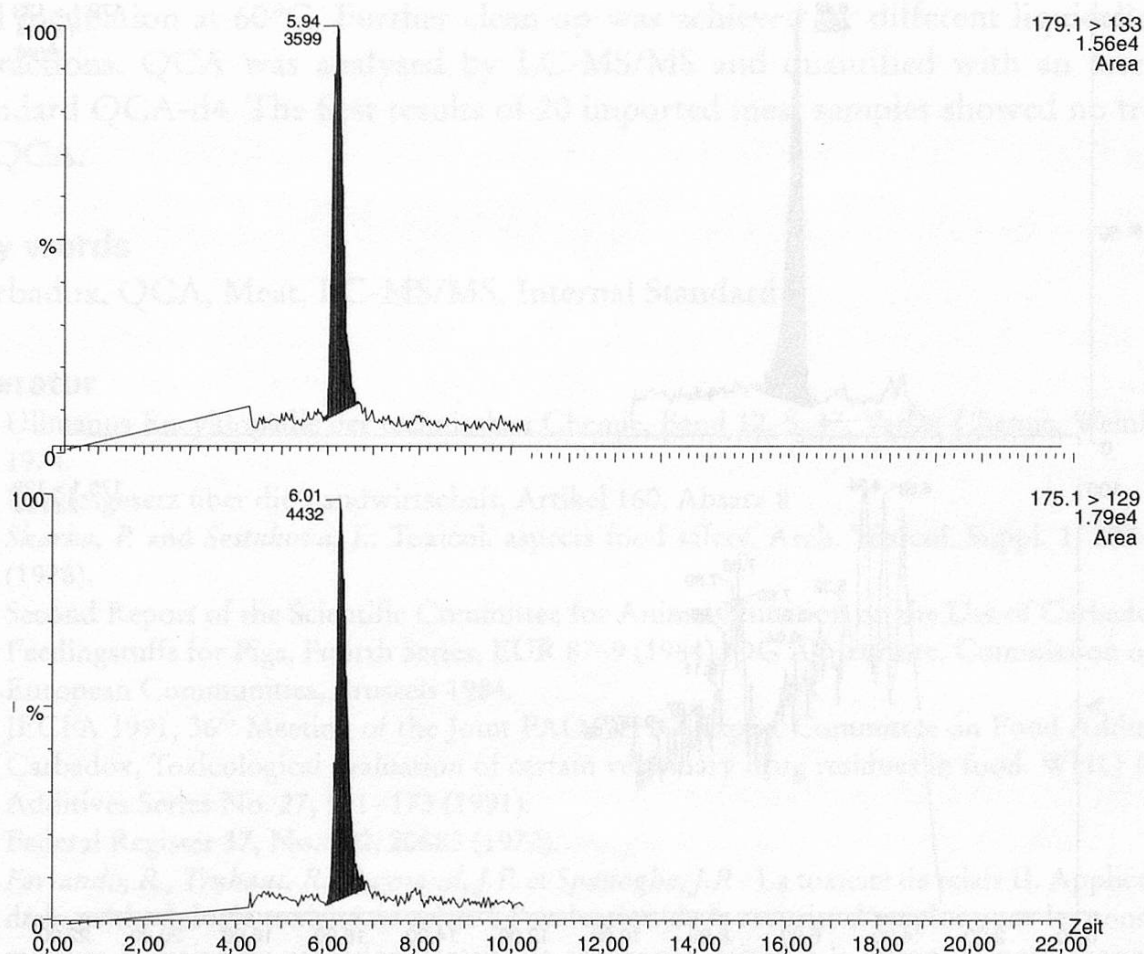


Abbildung 3 Mit Wirkstoffzusatz verstärkte Rindfleischprobe (5 µg/kg QCA). Chromatographische Bedingungen siehe Text

verstärkte Probe mit 5 µg/kg von QCA und internem Standard QCA-d4 abgebildet. Die Abbildung 4 zeigt eine negative Probe mit internem Standard QCA-d4.

Vorläufige Resultate 2001

Im Zeitraum vom August 2001 bis Oktober 2001 wurden diverse Importsendungen von Schweinefleisch auf QCA untersucht. In 20 Schweinefleischproben wurden bisher keine Spuren von QCA festgestellt.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung von QCA in Fleischproben von Schweinen beschrieben. Vorhandene Rückstände von Carbadox werden als Carbadoxmetabolit Chinoxalin-2-carbonsäure (QCA) durch Extraktion und Inkubation bei 60°C aus der Matrix gelöst und durch verschiedene Flüssig-Flüssig-Extraktionsschritte weiter aufgereinigt. Die Analyse und die Quantifizierung von QCA erfolgt anschliessend mit LC-MS/MS und dem deuterierten internen Standard

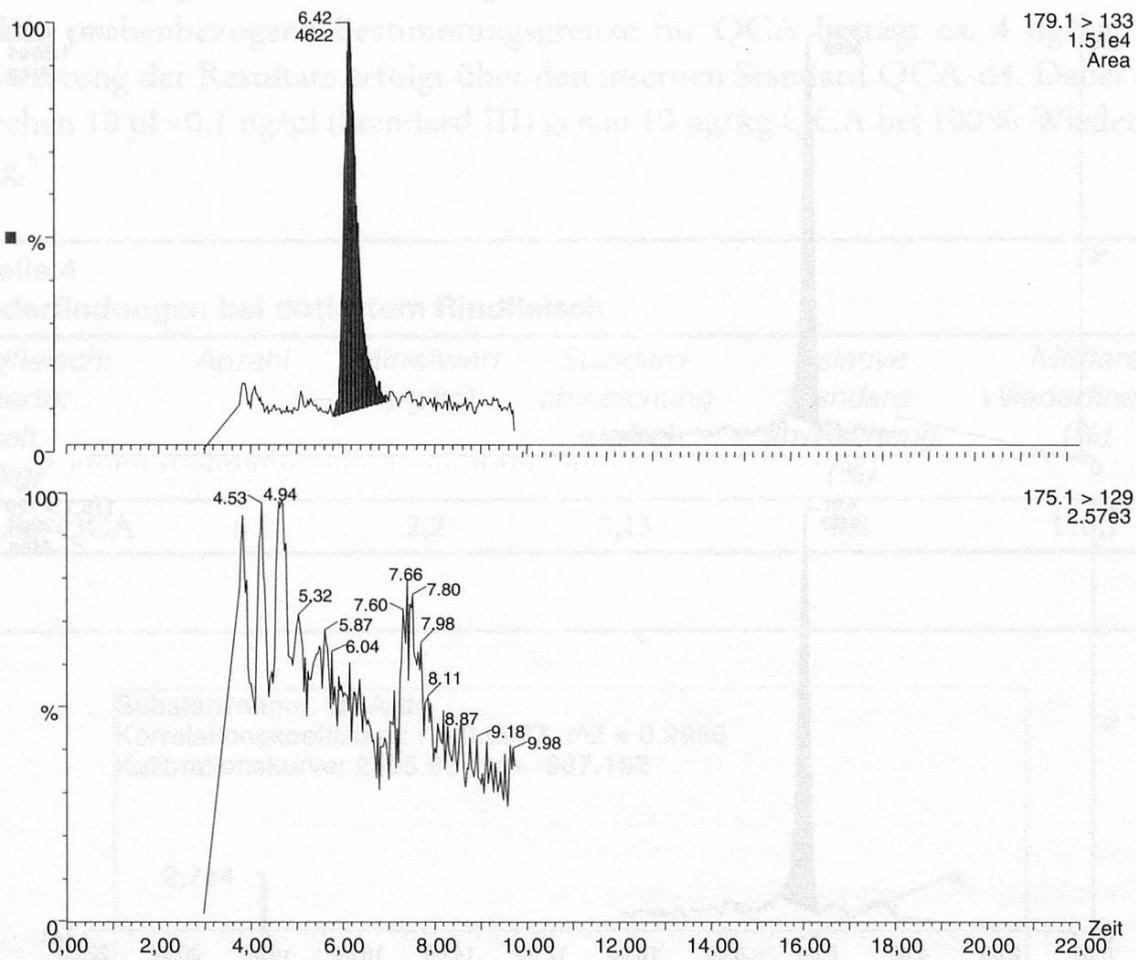


Abbildung 4 **Negative Schweinefleischprobe mit 5 µg/kg QCA-d4 als interner Standard. Chromatographische Bedingungen siehe Text**

QCA-d4. In 20 Importschweineproben vom Herbst 2001 konnten keine Spuren von QCA nachgewiesen werden.

Résumé

Une méthode par LC-MS/MS est présentée pour la détermination quantitative des résidus d'un métabolite de Carbadox de quinoxaline-2-acide carboxylique (QCA) dans le muscle, le foie et dans le rein de porcs. Les résidus sont extraits par dilution en milieu basique et par incubation à 60°C. L'extrait est purifié par différentes extractions liquide-liquide, analysé par LC-MS/MS et quantifié à l'aide d'un standard interne deutéré (QCA-d4). En automne 2001 on a trouvé aucune trace de QCA dans 20 échantillons de viande de porc importé.

Summary "Determination of the Major Carbadox Metabolite QCA in Swine by LC-MS/MS with a Deuterated Internal Standard"

A LC-MS/MS method is presented for the quantitative determination of residues of the major metabolite of carbadox (quinoxaline-2-carboxylic acid, QCA)

in meat from swine. Residues are extracted from the matrix with a diluted buffer and incubation at 60°C. Further clean up was achieved by different liquid-liquid extractions. QCA was analysed by LC-MS/MS and quantified with an internal standard QCA-d4. The first results of 20 imported meat samples showed no traces of QCA.

Key words

Carbadox, QCA, Meat, LC-MS/MS, Internal Standard

Literatur

- 1 Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, Band 12, S. 47. Verlag Chemie, Weinheim 1974.
- 2 Bundesgesetz über die Landwirtschaft, Artikel 160, Absatz 8
- 3 *Skarka, P. and Sestakova, I.*: Toxicol. aspects food safety. Arch. Toxicol. Suppl. 1, 207–210 (1978).
Second Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the Use of Carbadox in Feedingstuffs for Pigs, Fourth Series, EUR 8769 (1984), DG Agriculture. Commission of the European Communities, Brussels 1984.
JECFA 1991, 36th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Carbadox, Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series No. 27, 141–173 (1991).
- 4 Federal Register 37, No. 192, 20683 (1972).
Ferrando, R., Truhaut, R., Raynaud, J.P. et Spanoghe, J.P.: La toxicité de relais II. Application de la méthodologie toxicité de relais à l'évaluation de la sécurité d'emploi pour les consommateurs humains du carbadox, facteur de croissance, ajouté à la ration du porc charcutier. Toxicology 3, 369–398 (1975).
- 5 *De Graaf, G.J., Spierenburg, Th. and Baars, A.J.*: GC-MS Determination of quinoxaline-2-carboxylic acid, the terminal metabolite of carbadox, in porcine meat, liver and kidney. Euro Residue I, 202–205 (1990).
- 6 *Keukens, H.J., Binnendijk, G.M. and Aerts, M.M.L.*: Determination of residues of carbadox and metabolites in edible tissues – in-vitro stability studies. EuroResidue I, 235–239 (1990).
- 7 *Aerts, M.M.L., Beek, W.M.J., Keukens, H.J. and Brinkman, U.A.Th.*: Determination of residues of carbadox and some of its metabolites in swine tissues by HPLC using on-line pre-column enrichment and post-column derivatization with UV-VIS detection. J. Chromatogr. 456, 105–119 (1988).
- 8 *Baars, A.J., Van Ginkel, L.A., Aerts, M.M.L., De Graaf, G.J., Seinhorst, J.W., Keukens, H.J., Schwillens, P.L.W.J., Spierenburg, Th.J. and Jager, L.P.*: Kinetics of carbadox residues in pigs. EuroResidue I, 110–113 (1990).
- 9 *Van Ginkel, L.A., Schwillens, P.L.W.J., Jacquemijns, M. and Zomer, G.*: The detection and identification of quinoxaline-2-carboxylic acid, a major metabolite of carbadox in swine tissue. EuroResidue I, 189–195 (1990).

Korrespondenzadresse ab September 2002: Dr. Dominik Guggisberg, Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Bereich Chemie & Physik, Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern