

Das Rückstandsverhalten von Chloramphenicol nach intramuskulärer Applikation beim Schwein

Anna K. Boertz, D. Arnold und A. Somogyi

Institut für Veterinärmedizin, Abteilung Tierarzneimittel, Tierernährung und Rückstandsforschung, des Bundesgesundheitsamtes, Berlin

Zusammenfassung

Zur Untersuchung des Rückstandsverhaltens von Chloramphenicol (CAP) wurden 24 Mastschweine, 24–28 Wochen alt, intramuskulär mit 30 mg CAP/kg Körpergewicht behandelt und je 2 Tiere nach 3, 6, 12, 18, 24, 36 Stunden, 2, 3, 6, 10, 21 und 30 Tagen geschlachtet. Die CAP-Gehalte in Muskulatur, Blut, Urin, Leber, Niere, Galle und Fett wurden gaschromatographisch und radioimmunologisch bestimmt. Die Nachweisgrenze beider Methoden liegt in Abhängigkeit von der Matrix zwischen 1 und 5 ppb. Die erhaltenen Kinetiken weisen eine terminale Elimination auf, deren Halbwertszeiten für Muskulatur, Blut und Urin ca. 160–170 Stunden, für Niere 310 Stunden und für Galle 250 Stunden betragen. Die CAP-Konzentration in Muskulatur und Blut weisen eine signifikante, lineare Korrelation auf. Blutuntersuchungen könnten deshalb als Screening-Methode bei umfangreichen Rückstands kontrollen eingesetzt werden.

Summary

Residues of chloramphenicol (CAP) were examined in 24 pigs after intramuscular injection of 30 mg CAP/kg body weight. Two pigs were slaughtered after 3, 6, 12, 18, 24, 36 hours, 2, 3, 6, 10, 21 and 30 days, respectively. CAP-concentrations were determined in muscle, blood, urine, liver, kidney, bile, and fat. Methods used were gas-liquid chromatography and radioimmunoassay. Detection limits reached were 1–5 ppb. The concentration-time curves obtained reflected a long elimination phase and allowed only calculation of this half-life. Elimination half-life was estimated to be for muscle, blood and urine 160–170 hours, for kidney 310 and for bile 250 hours. Significant correlations were found to exist between CAP-concentrations in plasma and muscle. It appears that blood would be a good body fluid for monitoring CAP-residues in tissue.

Key words: chloramphenicol, pharmacokinetics, residue, pig

Einleitung

Chloramphenicol (CAP) ist ein Breitbandantibiotikum, das heute bevorzugt in der Veterinärmedizin eingesetzt wird, nachdem seine Bedeutung in der Humantherapie wegen möglicher erheblicher toxischer Wirkungen abgenommen hat. Es ist gesichert, daß CAP in höheren Dosen beim Menschen eine aplastische Anämie induzieren kann. Da jedoch keine Dosis-Wirkungs-Beziehung bekannt ist, läßt sich zur Zeit kein toxikolo-

gisch begründbarer Toleranzwert für CAP-Rückstände in eßbaren tierischen Produkten angeben. Die Forderung nach Rückstandsfreiheit ist daher verständlich, wenn auch nicht realisierbar, ohne gänzlich auf die Anwendung zu verzichten. Um eine Gefährdung der Verbraucher weitgehend auszuschließen, hat das Bundesgesundheitsamt 1977 im Sinne einer „praktischen Rückstandsfreiheit“ die Wartezeiten für CAP so bemessen, daß nach deren Ablauf analytisch erfaßbare Rückstände nicht mehr zu erwarten waren. So wurde für die intramuskuläre CAP-Anwendung beim Schwein eine Wartezeit von 10 Tagen festgesetzt, entsprechend der zum damaligen Zeitpunkt kleinsten, noch sicher nachweisbaren Menge von 10 ppb CAP. Neue empfindlichere Analysemethoden zwangen aber dazu, diese auf Rückstandsfreiheit basierende Risikoabwehr zu überdenken. So wurde aufgrund neuer Untersuchungsergebnisse in der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung für Eier, Eiproducte, Milch und Milcherzeugnisse eine Höchstmenge von 1 ppb festgesetzt.

Genaue Kenntnisse des Rückstandsverhaltens von CAP, die eine Voraussetzung für sinnvolle regulative Maßnahmen sind, fehlten bisher für die intramuskuläre Verabreichung von CAP beim Schwein. Ziel der hier vorgelegten Untersuchung war es, festzustellen, wie lange CAP-Rückstände nach Verabreichung noch zu erwarten sind und wie das Rückstandsverhalten pharmakokinetisch beschrieben werden kann.

Tierversuch

24 Mastschweine der Rasse „Deutsches veredeltes Landschwein“, 24–28 Wochen alt, 70–112 kg schwer, wurden mit 30 mg CAP/kg Körpergewicht behandelt. Die Applikation der 15%igen wäßrigen Suspension von CAP („Chloromycetin“ von Parke Davis) erfolgte intramuskulär in die Nackenmuskulatur. Jeweils 2 Tiere wurden nach 3, 6, 12, 18, 24, 36 Stunden und 2, 3, 6, 10, 21, 30 Tagen nach Behandlung geschlachtet. Die Tiere wurden vor der Schlachtung elektrisch betäubt und nach Durchschneiden der Hals-schlagader entblutet. Das Blut wurde direkt in heparinisierte Zentrifugen-gefäße aufgefangen, zentrifugiert und sofort bei –35 °C eingefroren. Leber und Niere wurden als Ganzes, Urin und Galle direkt aus den Blasen entnommen, gewogen und ebenfalls sofort eingefroren. Die Probenahme der Skelettmuskulatur („Kotelett“, „Vorder-“ und „Hinterschinken“) erfolgte nach Kühlung (5 h bei +4 °C) und Zerkleinerung mit dem Fleischwolf. Jeweils 1 kg der Nackenmuskulatur wurde so entnommen, daß die Injektionsstelle enthalten war. Nach maximal 2 Tagen erfolgte eine wei-tere Tiefgefrierung aller Proben auf –85 °C. Bei dieser Temperatur verblieben sie bis zur Analyse. Ein nicht mit CAP behandeltes Schwein wurde als Kontrolltier ebenso behandelt.

Methoden

Die Bestimmung der CAP-Gehalte in den verschiedenen Geweben und Körper-flüssigkeiten erfolgte gaschromatographisch und radioimmunologisch (1, 2). Die Probenvorbereitung beinhaltet mehrere Extraktions- und Reinigungsschritte. Die gaschromatographische Bestimmung erfordert zusätzlich eine säulenchromatogra-

Tab. 1. Mittelwerte der Chloramphenicol-Bestimmungen in Geweben und Körperflüssigkeiten des Schweins.

Zeit nach Behandlung h	Tag	CAP (ng/g)					
		Muskulatur ¹⁾	Blut ²⁾	Leber ³⁾	Niere ²⁾	Galle ²⁾	Fett ³⁾
3		2 420	2 100	75,0	5 220	6 230	169
		3 350	4 210	47,0	5 010	6 900	1 090
6		1 330	2 100	21,0	1 170	6 030	170
		2 100	1 700	10,8	2 910	5 120	2 430
12		1 380	1 430	20,4	1 320	5 220	229
		1 700	3 080	11,8	4 410	7 370	1 080
18		1 250	1 550	6,11	1 000	9 390	153
		1 710	1 390	31,30	1 650	8 220	133
1		1 270	1 120	3,63	1 150	9 270	143
		655	717	3,64	671	3 970	136
1,5		1 040	922	19,6	855	3 250	169
		525	700	0	920	1 920	54,3
2,0		72,6	71,4	1,56	22,5	695	10,2
		270	292	1,57	449	1 810	38,2
3,0		151	154	0	112	900	12,9
		23,1	25,4	0	4,02	113	2,3
6,0		2,87	2,30	0	0	4,73	0,4
		3,06	1,48	0	0	5,09	0
10,0		4,03	1,13	0	3,81	1,72	-
		5,59	1,42	0	2,58	9,55	8,48
21,0		2,67	-	0	0	1,03	24,40
		0,36	-	0	0	2,34	-
30,0		0,32	0,12	0	0	0,39	0
		0,19	0,04	0	0	0,20	2,52

¹⁾ Die Ergebnisse der CAP-Bestimmung in drei Muskeltellern. GC- und RIA-Ergebnisse wurden gemittelt.²⁾ GC- und RIA-Ergebnisse wurden gemittelt.³⁾ CAP wurde nur gaschromatographisch bestimmt.

phische Reinigung. Die CAP-Gehalte wurden unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten ermittelt. Die Nachweisgrenze beider Methoden beträgt in Abhängigkeit von der Probenmatrix 1–5 ppb. Da die Korrelationen der Ergebnisse beider Methoden hochsignifikant sind, werden die Ergebnisse für die pharmakokinetische Auswertung gemittelt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1 zeigt die Mittelwerte der CAP-Gehalte in Geweben und Körperflüssigkeiten nach intramuskulärer Gabe von CAP. Die applizierte Dosis von 30 mg/kg Körpermengewicht reichte nicht aus, um wirksame CAP-Konzentrationen (mind. 5 µg/ml) im Blut zu erreichen. Die durchschnittlichen Höchstwerte waren vermutlich in allen Geweben, Blut und Urin zum ersten Schlachtpunkt, 3 h nach der Injektion, erreicht oder überschritten. Die beobachteten durchschnittlichen Höchstwerte lagen in der Muskulatur bei ca. 2900 ppb, im Blut bei ca. 3200 ppb, im Urin bei ca. 60 000 ppb und in der Niere bei 5100 ppb. In der Galle lag das beobachtete Maximum im Mittel bei 8800 ppb und wurde erst nach 18 h erreicht. Ursache hierfür dürfte der enterohepatische Kreislauf sein, durch den eine Rückresorption von CAP stattfindet. Im Fettgewebe wurde ein Maxi-

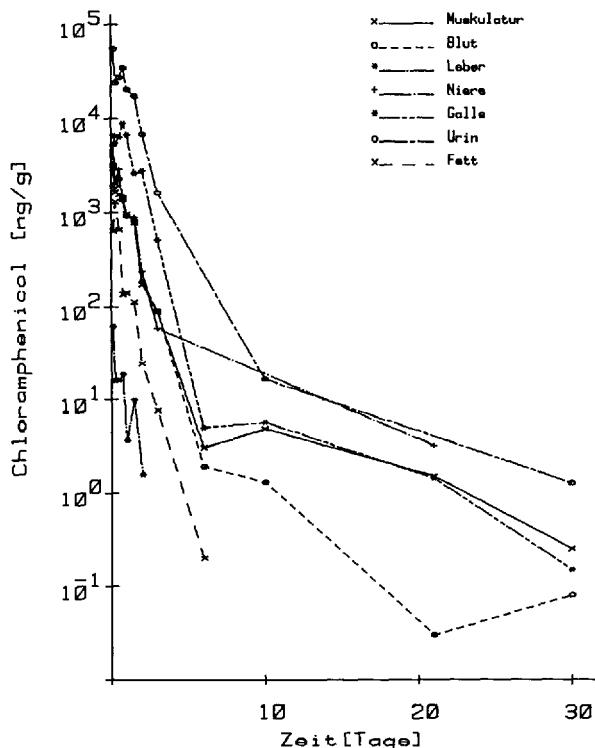


Abb. 1. Chloramphenicol-Kinetik nach intramuskulärer Gabe in Muskulatur, Blut, Leber, Niere, Galle, Urin und Fett.

malwert nach 6 h mit 2400 ppb bei einem Tier gemessen; allerdings waren die Unterschiede von Tier zu Tier hier besonders hoch. 10 Tage nach Behandlung lag der durchschnittliche CAP-Gehalt in der Muskulatur bei 4–5 ppb. Die CAP-Konzentrationen in den Injektionsstellen lassen auf ein Depot schließen, das innerhalb von 3 bis maximal 6 Tagen erschöpft war. Die niedrigen Werte in der Leber wurden für die kinetische Auswertung nicht herangezogen, da in weiteren Versuchen zu klären ist, ob diese Werte tatsächlich den CAP-Spiegel zum Zeitpunkt des Schlachtens darstellen oder z. B. auf enzymatischen Abbau von CAP zwischen Probenahme und Lagerung bei –85 °C zurückzuführen sind.

Um den zeitabhängigen Verlauf der CAP-Konzentration nach einmaliger intramuskulärer Gabe zu beschreiben, muß eine Absorptions-, Verteilungs- und Eliminationsphase berücksichtigt werden. Unmittelbar nach der Injektion ist die Absorption entscheidend für den Kurvenverlauf, so daß die Konzentration von Null auf ein Maximum ansteigt und dann wieder abfällt. Da dieses Maximum im geschilderten Experiment schon nach 3 Stunden erreicht oder überschritten war und keine Probenahme vor diesem Zeitpunkt stattfand, konnte die Absorptionsphase nicht experimentell belegt werden. Aus diesem Grunde war mit den vorhandenen Daten nur die terminale Elimination kinetisch auszuwerten. Die mathematisch-statistische Kurvenanpassung erfolgte mit Hilfe eines Dialogprogrammes zur Analyse pharmakokinetischer Verlaufskurven (3). Eine gute Anpassung der CAP-Kinetiken (Abb. 1) ergab sich mit Hilfe zweier Exponentialterme:

$$y = \mu_1 e^{-\lambda_1 t} + \mu_2 e^{-\lambda_2 t}$$

mit μ = Anfangskonzentration der jeweiligen Phase, λ = Eliminationskonstanten.

Beide Terme beschreiben die Elimination (allg. Erläuterungen s. Baggot (4)). Für die in Tabelle 2 angegebenen Konstanten des zweiten Terms existieren keine Vergleichsdaten in der Literatur, da die zugrunde liegenden CAP-Konzentrationen, die offensichtlich aus einem „tiefen Kompartiment“ stammen, bisher in der Regel aus meßtechnischen Gründen nicht erfaßbar waren. Die Eliminationskonstanten für Muskulatur, Blut und Urin sind vergleichbar, die für Niere und Galle niedriger.

Das Rückstandsverhalten von Chloramphenicol wird in der vorliegenden Arbeit an Hand von Analysen der unveränderten Muttersubstanz

Tab. 2. Pharmakokinetische Parameter der terminalen Elimination.

Probe	μ_2	λ_2	$t_{1/2}$	(Tag)
	(ppb)	(h^{-1})	(h)	
Muskulatur	4,03	–0,0041	169,0	7,0
Blut	2,36	–0,0044	157,5	6,6
Urin	36,69	–0,0042	165,0	6,9
Niere	10,00	–0,00226	306,7	12,8
Galle	4,56	–0,00284	245,4	10,2

beschrieben. Obwohl nicht geklärt ist, ob die unveränderte Muttersubstanz selbst für die Toxizität verantwortlich ist, scheint dieses Vorgehen gerechtfertigt, da die Muttersubstanz beim Mastschwein als der quantitativ wichtigste Rückstand in den meisten Geweben angesehen werden kann und somit die Funktion eines „Leitmetaboliten“ übernehmen kann, aus dessen Konzentration die Rückstandssituation insgesamt hinreichend beurteilt werden kann.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die 1977 festgelegten Wartezeiten für CAP, gemessen an der damals zugrunde liegenden 10-ppb-Grenze, realistisch sind. Es bleibt aber festzustellen, daß nach Ablauf der Wartezeit noch mit signifikant von Null zu unterscheidenden Rückstandskonzentrationen gerechnet werden muß. Zöge man in Analogie zu der seit 1984 geltenden Höchstmenge für Eier, Eiproducte, Milch und Milcherzeugnisse die Grenze bei 1 ppb, würde die gegenwärtige Wartezeit nicht ausreichen.

Aus den erhaltenen experimentellen Daten geht – auch ohne daß ein vollständiges pharmakokinetisches Modell hergeleitet wurde – hervor, daß sich an die bekannte rasche Eliminationsphase eine weitere „terminale“ Elimination anschließt. Mit einer Halbwertszeit von etwa 7 Tagen für Muskulatur und Blut ist sie für den stark verzögerten Abfall der Rückstandskonzentrationen unter 1 ppb verantwortlich. Zwischen der

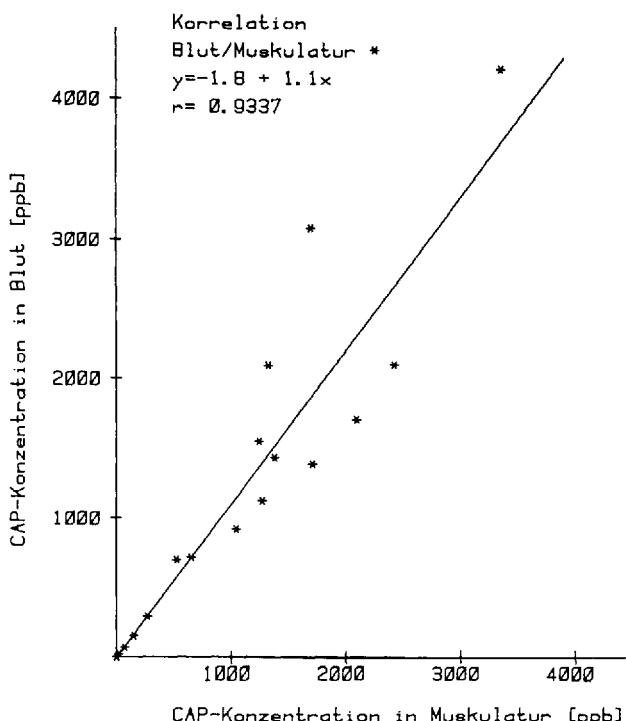


Abb. 2. Korrelation zwischen den Chloramphenicol-Gehalten in Muskulatur und Blut.

CAP-Konzentration in Muskulatur und Blut besteht darüber hinaus eine lineare Korrelation (Abb. 2). Das fand auch Mercer (5) nach intravenöser Verabreichung von CAP. Die hohe Korrelation zwischen Blut- und Muskulaturwerten darf aber wegen der gleichzeitig beträchtlichen Streuung nicht dahingehend interpretiert werden, daß einzelne Ergebnisse einer CAP-Bestimmung, z. B. im Blut, leicht auf CAP-Konzentrationen in Muskulatur desselben Tieres „umgerechnet“ werden könnten. Mit einer hohen Wahrscheinlichkeit, die gegen Ende der Elimination sogar zunimmt, trifft dagegen zu, daß positive Befunde im Blut auch positive Befunde in Muskulatur erwarten lassen. Letzteres trifft offensichtlich auch für das Verhältnis Urin/Muskulatur zu, wobei allerdings bei vergleichbaren Eliminationskonstanten die CAP-Konzentrationen im Urin immer größer sind als in der Muskulatur.

Da die CAP-Bestimmung in Blutplasma analytisch mit relativ geringem Aufwand durchzuführen ist, könnten aufgrund dieser Korrelation Blutanalysen bei umfangreichen Rückstandsuntersuchungen als Screening-Methode dienen.

Literatur

1. Boertz AK (1984) Radioimmunologische und gaschromatographische Untersuchungen zum Rückstandsverhalten von Chloramphenicol beim Schwein. Dissertation TU Berlin
2. Arnold D, vom Berg D, Boertz AK, Mallik U, Somogyi A (1984) Radioimmunologische Bestimmung von Chloramphenicol-Rückständen in Muskulatur, Milch und Eiern. Archiv für Lebensmittelhygiene 35:131–136
3. Antes G, Eichhorn E, Meister R (1983) Ein Dialogprogramm zur Analyse pharmakokinetischer Verlaufskurven. Statistical Software Newsletter 3:116
4. Baggot DH (1977) Principles of drug disposition in domestic animals: the basis of veterinary clinical pharmacology. W. B. Saunders Company, Philadelphia London Toronto
5. Mercer HD, Heath GE, Long PE (1978) Drug residues in food animals. I. Plasma and tissue kinetics of Chloramphenicol in young cross-bred swine. J vet Pharmacol Therap 1:19–36

Eingegangen 21. Januar 1985

Anschrift der Verfasser:

Anna K. Boertz, Markelstr. 28, D-1000 Berlin 41; A. Somogyi/D. Arnold, Institut für Veterinärmedizin des Bundesgesundheitsamtes, Nordufer 20, D-1000 Berlin 65