

**LC-MS/MS-Methoden zur Rückstandsanalyse von
Penicillinen, Cephalosporinen und Aminoglycosid-
Antibiotika**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Mathematik und Naturwissenschaften
der Bergischen Universität
in Wuppertal

von
Matthias Becker
aus Remchingen

Wuppertal 2005

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20050106

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20050106>]

Abstract

In today's livestock farming and milk production, therapeutic, metaphylactic and prophylactic use of β -lactams (penicillins, cephalosporins) and aminoglycosides is inevitable. However, improper use of these antibiotics may lead to residues in milk and edible tissues and can cause human health hazards as well as technological problems in dairy industry. In general, antibiotics are unwanted components in food, and it has to be ensured that the consumer is not exposed to antibiotic residues at potentially harmful concentrations, i.e., above maximum residue limits (MRLs) according to Council Regulation (EEC) 2377/90. Therefore, efficient analytical methods are required to identify and to reliably quantify residues of these antibiotics.

In this study, sensitive and selective liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) methods were developed for fifteen β -lactams (penicillins, cephalosporins) in bovine milk, muscle and kidney, for four aminoglycosides in bovine kidney and for the cephalosporin ceftiofur in bovine milk. Electrospray ionisation (ESI) proved to be suitable for the generation of positively ($[M+H]^+$) and negatively charged ($[M-H]^-$) gas phase ions for all compounds studied. The negative electrospray ionisation mode (ESI (-)) allowed a more sensitive analysis of the monobasic penicillins and the cephalosporin cefoperazone than the positive mode. All other compounds were measured with higher sensitivity using the positive electrospray ionisation mode (ESI (+)).

It was demonstrated that the ESI-mode leading to higher sensitivity was predictable by the Henderson-Hasselbalch equation considering the substance specific pKs and the pH of the eluent used for the chromatography. Collision induced dissociation (CID) with argon was used for fragmentation of the pseudomolecular ions to achieve the required selectivity for substance specific identification.

By using the LC-MS/MS technique, it was possible to reduce the complexity of the required clean-up procedures to a minimum of what is necessary with less selective methods.

The fifteen β -lactams were extracted from the food samples with acetonitrile/water and cleaned-up by a single reversed-phase solid phase extraction (SPE) step. Ceftiofur-related residues, bound to milk proteins, were liberated using dithioerythritol, then derivatized with iodacetamide and cleaned-up by a single reversed-phase SPE step. With the aminoglycosides it was sufficient to apply a simple ultrafiltration step for clean-up prior to the LC-MS/MS analysis.

A polar deactivated phenylether HPLC column was applicable for the chromatographic separation of all β -lactams in the reversed-phase mode as well as for the chromatographic separation of the highly polar aminoglycosides in the hydrophilic interaction liquid chromatographic mode (HILIC).

Adverse effects on the ESI caused by co-eluting endogenous matrix components were investigated. Considerable signal suppression or enhancement effects could be observed for most of the compounds studied. The results demonstrated that these matrix effects depend highly on the type of matrix.

The methods for the β -lactam antibiotics were validated closely to the EU requirements laid down in Commission Decision 2002/657/EC. Incurred β -lactam and aminoglycoside residues in 24 samples from official food control, tested positive with a class-specific receptor test (Charm II-test), were identified and quantitatively analyzed using the developed LC-MS/MS methods. Benzylpenicillin and dihydrostreptomycin were the most prevalent residues. Furthermore, a cow suffering from postpartum metritis was treated with Excenel[®] RTU, containing ceftiofur hydrochloride as active component for 3 days. All milk samples obtained during medication were analyzed quantitatively.

CID-fragmentation studies were carried out on ceftiofur and desfuroylceftiofur using a triple quadrupole and an ion-trap mass spectrometer to allow the postulation of fragmentation pathways for these compounds.

Dank

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2000 bis Dezember 2003 im Bereich Pharmakologisch Wirksame Stoffe (PWS) am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Karlsruhe.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Petz für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die stete Ansprechbarkeit bei allen Fragen und Problemen.

Dem Teamleiter des Fachbereiches PWS, Herrn Dr. E. Zittlau, möchte ich ebenfalls für die wissenschaftliche Betreuung vor Ort und die Hilfe bei allen organisatorischen sowie veterinärmedizinischen Fragen danken.

Ein besonderes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Fachbereiches PWS, die durch ihre Hilfsbereitschaft und das stets gute Arbeitsklima für das Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Insbesondere danke ich: Frau E. Stickel, Frau S. Eichhorn, Frau T. Ulrich und Frau R. Oberüber für die Unterstützung im Labor und Einweisung in die Gerätebedienung sowie Herrn Dr. P. Steliopoulos für die zahlreichen fachlichen Diskussionen.

Für die Finanzierung dieser Arbeit über das Forschungsprojekt „Entwicklung von Multimethoden für Aminoglycosid-, Makrolid-, und β -Lactamantibiotika-Rückständen in Lebensmitteln unter Einsatz der LC-MS“ (AZ.: 5403.01/8402.43) möchte ich mich beim Land Baden-Württemberg bedanken.

Schließlich möchte ich Herrn G. Cacciatore und Frau C. Hiepler für die große Hilfsbereitschaft bei kleineren und größeren Problemen aller Art sowie dem gesamten Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. M. Petz für die gute Zusammenarbeit danken.

Inhaltsverzeichnis

1 THEORETISCHER TEIL	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Untersuchte Antibiotika	3
1.2.1 β -Lactame (Penicilline und Cephalosporine)	3
1.2.1.1 Struktur und Wirkungsmechanismus	4
1.2.1.2 Klassifizierung der Penicilline und Cephalosporine (Indikation)	7
1.2.2 Aminoglycoside	13
1.2.2.1 Struktur, Klassifizierung und Wirkungsmechanismus	13
1.2.2.2 Aminoglycoside (Indikation).....	14
1.3 Festgesetzte Höchstmengen für pharmakologisch wirksame Stoffe (PWS) in der Europäischen Union	16
1.4 Theoretische Aspekte der LC-MS-Technik.....	18
1.4.1 Ionisationsverfahren unter Atmosphärendruck	18
1.4.2 Wahl der Ionisationstechnik (ESI vs. APCI).....	20
1.4.3 Mechanistische Aspekte der Elektrosprayionisation (ESI).....	21
1.4.3.1 Erzeugung von geladenen Tröpfchen.....	21
1.4.3.2 Verkleinerung der geladenen Tröpfchen	23
1.4.3.3 Bildung von freien Gasphasenionen.....	24
1.4.3.4 Linearität, Signalsuppression	26
1.4.3.5 Protonen-Transferreaktionen.....	29
1.5 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).....	30
1.6 Anforderungen der EU an die Analytik von pharmakologisch wirksamen Substanzen mittels LC-MS/MS	31
1.7 LC-MS-Analytik der β-Lactame und Aminoglycoside.....	33
1.7.1 β -Lactame	33
1.7.2 Aminoglycoside	36
1.8 Zielsetzung.....	37
2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	39
2.1 Apparativer Aufbau des verwendeten LC-MS/MS-Systems	39
2.2 LC-MS/MS-Multimethodenentwicklung für die quantitative Bestimmung von 15 β-Lactamen (Penicilline und Cephalosporine) in Milch, Muskel und Niere von Rindern	40
2.2.1 Optimierung der chromatographischen Trennung (HPLC)	40
2.2.1.1 Entwicklung der Reversed-Phase Chromatographie	42
2.2.2 Optimierung des ESI-Triple-Quadrupol-Gerätes.....	46
2.2.2.1 Einfluss der Oberflächenaktivität von Cephapirin und Desacetyl-Cephapirin auf ihre Signalintensität und ihre Kapillartemperaturoptima	50
2.2.2.2 Wahl des Elektrospraymodus (+/-)	52
2.2.2.2.1 Doppelladung von Cefquinome	56
2.2.2.2.2 Chemisches Rauschen in Abhängigkeit des gewählten Elektrospraymodus.....	57
2.2.2.2.3 Vergleich mit bereits publizierten LC-MS-Verfahren.....	58

2.2.3 Optimierung der Tandem-MS-Bedingungen (MS/MS).....	61
2.2.4 Überprüfung der Messstabilität des LC-MS/MS-Systems.....	63
2.2.5 Einfluss des Ameisensäuregehaltes auf die Effizienz der ESI.....	65
2.2.6 Optimierung der Extraktion/Aufreinigung für die Matrices Rindermuskel, Rinderniere und Milch.....	68
2.2.6.1 Wahl der Extraktions- und Deproteinierungsbedingungen	68
2.2.6.2 Aufreinigung (Clean-up) der Acetonitril-Extrakte	70
2.2.6.2.1 Wahl des Aufreinigungsverfahrens.....	71
2.2.6.2.2 Test einer Anionenaustauscher SPE-Kartusche	72
2.2.6.2.3 Acetonitril- und Fettentfernung für die weitere Aufreinigung mittels Reversed-Phase SPE.....	73
2.2.6.2.4 Vergleich unterschiedlicher Reversed-Phase Sorbentien für die SPE	74
2.2.7 Auswirkungen der Matrixkoextraktive auf die Elektrosprayionisation	77
2.2.7.1 Kompensation der Matrixeffekte am Beispiel von Cefquinome und Cephalonium in Rindernierenextrakt mittels des Standardadditionsverfahrens	81
2.2.8 Umwandlung von Cephapirin zu Desacetyl-Cephapirin in Gewebehomogenaten.....	84
2.2.9 Typische Wiederfindungen und Untersuchung der Verluststellen	87
2.2.10 Effizienz der wässrigen Aufarbeitung bei der Analyse von Amoxicillin in Rindermuskel.....	91
2.2.11 Lösen möglicher Wirkstoff-Matrix-Bindungen durch Einsatz einer Endopeptidase (Subtilisin carlsberg).....	92
2.3 LC-MS/MS-Methodenentwicklung für die quantitative Bestimmung von Ceftiofurrückständen in Rohmilch mittels LC-MS/MS.....	96
2.3.1 Chromatographische Trennung (HPLC).....	98
2.3.2 Optimierung des ESI-Triple-Quadrupol-Systems und des Elektrospray-Modus (+/-)	99
2.3.3 Optimierung der Tandem-MS-Bedingungen (MS/MS).....	100
2.3.3.1 Postulierung des Fragmentierungsmechanismus von Ceftiofur und Desfuoylceftiofur Acetamid	102
2.3.4 Optimierung der Extraktion/Aufreinigung.....	107
2.3.5 Auswirkungen der Matrixkoextraktive auf die Elektrosprayionisation	109
2.3.6 Vergleich von LC-MS/MS- und Screening-Ergebnissen für die Bestimmung von Ceftiofurrückständen in Milch von einer mit Ceftiofur behandelten Kuh	110
2.3.6.1 LC-MS/MS-Ergebnisse.....	111
2.3.6.2 Charm II-Test Ergebnisse.....	112
2.4 LC-MS/MS-Methodenentwicklung für die Bestimmung von vier Aminoglycosiden in Rinderniere.....	114
2.4.1 Optimierung der chromatographischen Trennung (HPLC) mittels Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC).....	115
2.4.1.1 Effekt des Acetonitrilgehaltes in der mobilen Phase auf die Retention.....	116
2.4.2 Optimierung des ESI-Triple-Quadrupol-Systems und des Elektrospray-Modus (+/-)	119
2.4.3 Linearität der Messung	120
2.4.4 Optimierung der Extraktion/Aufreinigung für die Matrix Rinderniere.....	122
2.4.4.1 Wahl der Extraktions- und Deproteinierungsbedingungen	122
2.4.4.1.1 Extraktion und Deproteinierung mittels Ultrafiltration (UF).....	122
2.4.5 Auswirkungen der Matrixkoextraktive auf die Elektrosprayionisation	123
2.4.6 Wiederfindungen und Untersuchung der Verluststellen.....	125
2.5 Methodvalidierung.....	127
2.5.1 Wiederholbarkeit SD_R	127
2.5.2 Laborinterne Reproduzierbarkeit SD_{wIR}	128
2.5.3 CC_α , CC_β	128
2.5.4 Richtigkeit.....	130
2.5.5 Quantifizierung und massenspektrometrische Bestätigung.....	130
2.5.6 Stabilität des LC-MS/MS-Systems (Linearität).....	137
2.5.7 Stabilität der β -Lactame in Lösung	139
2.5.7.1 Dimerisierung von Ampicillin in wässriger Lösung.....	141

2.6 Untersuchung von Charm II-Test positiven Proben mit den entwickelten LC-MS/MS-Bestätigungsverfahren.....	143
3. EXPERIMENTELLER TEIL.....	146
3.1 Experimenteller Teil zu Kapitel 2.2.....	146
3.1.1 Chemikalien.....	146
3.1.2 Lösungen.....	147
3.1.3 Geräte /Hilfsmittel.....	148
3.1.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit MS/MS-Detektion	149
3.1.4.1 LC-MS/MS-System.....	149
3.1.4.2 MS/MS-Parameter.....	150
3.1.5 Probenaufarbeitung für die Matrices Milch, Muskel und Niere von Rindern	151
3.1.5.1 Extraktion und Deproteinierung mit Acetonitril.....	151
3.1.5.2 Acetonitril- und Fettentfernung, pH-Einstellung	152
3.1.5.3 SPE-Aufreinigung	152
3.1.6 Durchführung der Endopeptidasebehandlung für die Matrix Rinderniere.....	153
3.1.7 Quantitative Auswertung	153
3.1.7.1 Quantitative Auswertung über das Standardadditions-Verfahren.....	154
3.2 Experimenteller Teil zu Kapitel 2.3.....	155
3.2.1 Chemikalien.....	155
3.2.2 Lösungen.....	155
3.2.3 Geräte /Hilfsmittel.....	157
3.2.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit MS/MS-Detektion	157
3.2.4.1 LC-MS/MS-Systeme.....	157
3.2.4.2 MS/MS Parameter.....	158
3.2.5 Probenaufarbeitung.....	159
3.2.5.1 Durchführung der Extraktion.....	159
3.2.5.2 Derivatisierung und Deproteinierung	159
3.2.5.3 SPE Aufreinigung	159
3.2.6 Quantitative Auswertung	160
3.3 Experimenteller Teil zu Kapitel 2.4.....	160
3.3.1 Chemikalien.....	160
3.3.2 Lösungen.....	161
3.3.3 Geräte /Hilfsmittel.....	162
3.3.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit MS/MS-Detektion	162
3.3.4.1 LC-MS/MS-System.....	162
3.3.4.2 MS/MS-Parameter.....	163
3.3.5 Probenaufarbeitung.....	163
3.3.5.1 Extraktion und Deproteinierung mittels Ultrafiltration (UF).....	164
3.3.6 Quantitative Auswertung	164
4. ZUSAMMENFASSUNG	166
5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	170
6. LITERATURVERZEICHNIS	173
LEBENS LAUF.....	183

1 Theoretischer Teil

1.1 Einleitung

In der modernen Massentierhaltung ist die therapeutische, metaphylaktische oder prophylaktische Anwendung von Antiinfektiva für die Gesunderhaltung der Nutztierbestände und für das Erzielen einer guten Rentabilität des landwirtschaftlichen Betriebes unverzichtbar.

In der Europäischen Union wurden 1997 in der Tiermedizin insgesamt 3494 t Antiinfektiva (Antibiotika u. Chemotherapeutika) therapeutisch eingesetzt [1]. Anteilig entfielen dabei 2294 t auf die Tetracycline (65,7%), 424 t auf die Makrolide (12,1%), 322 t auf die Penicilline (9,2%), 154 t auf die Aminoglycoside (4,4%), 75 t auf die Sulfonamide (2,2%), 43 t auf die Fluorchinolone (1,2%) und 182 t mit einem Anteil von 5,2% auf andere Therapeutika (z.B. Cephalosporine).

Zum Schutz des Verbrauchers und zur Vermeidung von technologischen Problemen bei der Herstellung von Lebensmitteln tierischer Herkunft ist die Anwendung von pharmakologisch wirksamen Stoffen in der EU streng geregelt. Ihre Anwendung ist bei lebensmittelliefernden Tieren nur dann zulässig, wenn eine arzneimittelrechtliche Zulassung vorliegt. Im Rahmen der Zulassungen sind unter anderem Dosierungsempfehlungen, Wartezeiten und Höchstmengen (MRL, maximum residue limit) gemäß der VO (EWG) 2377/90 festzulegen.

Trotz dieser konkreten Vorgaben kommt es, infolge falscher Dosierung, falscher Verabreichung oder der Nichtbeachtung von Wartezeiten, zu Höchstmengenüberschreitungen. Die gesamtwirtschaftlichen Verluste durch hemmstoffhaltige Milch liegen alleine in Deutschland bei schätzungsweise über 100 Mio. Euro jährlich [2].

Insbesondere hohe Rückstandsgehalte von Penicillinen in Lebensmitteln können für einen Teil der Verbraucher (7-10%), die bereits aufgrund früherer Medikation penicillinsensibel sind, zu allergischen Reaktionen führen. In der Literatur sind einzelne Fälle von Personen beschrieben, die nach dem Konsum von Milch oder einem fleischhaltigen Fertiggericht, welche nachweislich Penicillinrückstände enthielten, massive allergische Reaktionen zeigten [3]. Ein ähnlicher Fall ist für das Aminoglycosidantibiotikum Streptomycin dokumentiert [4].

Um den Verbraucher vor Risiken zu schützen, werden auf europäischer und nationaler Ebene in relativ großem Umfang Rückstandskontrollen bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs durchgeführt. Am Schlachthof müssen nach der Fleischhygiene-Verordnung (FLHV) 0,5% aller gewerblich geschlachteten Tiere und 2% aller Kälber auf Rückstände untersucht werden. In konkreten Verdachtsfällen werden zusätzlich Verdachtsproben entnommen und untersucht.

Auf Basis der Europäischen Gesetzgebung muss jedes EU-Land im Rahmen eines jährlich zu erfüllenden Nationalen Rückstandskontrollplanes (NRKP) eine bestimmte Probenzahl von Tieren und tierischen Erzeugnissen auf Rückstände bestimmter Stoffe in Erzeuger- und Schlachtbetrieben untersuchen. Um eine lückenlose Kontrolle vom Stall bis zum Verbraucher zu gewährleisten, werden zusätzlich Proben im Futtermittel und in der Lebensmittelüberwachung im Handel genommen und auf pharmakologisch wirksame Rückstände untersucht.

Damit der Verbraucherschutz durch die amtliche Lebensmittelüberwachung sichergestellt werden kann, müssen die Laboratorien über routinefähige und validierte Methoden zur Untersuchung auf pharmakologisch wirksame Rückstände verfügen. Am effizientesten sind Multimethoden, die eine möglichst einfache Probenaufarbeitung benötigen und die Untersuchung auf mehrere Stoffe ermöglichen.

In der modernen instrumentellen Analytik setzte sich in den vergangenen Jahren die Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie an einen Massenspektrometer (LC-MS), insbesondere für die Analytik von hochpolaren pharmakologisch wirksamen Stoffen, immer stärker durch. In dieser Dissertation wurden analytische LC-MS/MS-Multimethoden für die in der VO (EWG) 2377/90 aufgeführten hoch- bis mittelpolaren Antinfektiva (Penicilline, Cephalosporine, Aminoglycoside) unter Einsatz der Elektrosprayionisation (ESI) entwickelt. Von Interesse waren dabei unter anderem die Auswirkungen von koelutierenden Matrixkoextraktiven sowie von unterschiedlichen Additivkonzentrationen im Eluenten auf die ESI der zu analysierenden Substanzen. Ferner wurde in dieser Arbeit für die Bestimmung von Ceftiofurrückständen in Milch eine LC-MS/MS-Methode entwickelt, bei welcher aufgrund ihrer hohen Selektivität im Gegensatz zu einer bereits publizierten HPLC-UV-Methode auf einen Großteil der Probenaufarbeitungsschritte verzichtet werden konnte. Die Postulierung eines plausiblen Fragmentierungsmechanismus für zwei Cephalosporine war ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit.

1.2 Untersuchte Antibiotika

1.2.1 β -Lactame (Penicilline und Cephalosporine)

Die Ära des Penicillins begann 1928 mit der Beobachtung von Alexander Fleming, dass eine Schimmelpilzkolonie von *Penicillium notatum* gegenüber Staphylokokken antimikrobielle Wirkung zeigte. Die von diesem Pilz gebildete chemische Verbindung wurde von Fleming Penicillin genannt [5]. 10 Jahre später begann die systematische Forschung durch die Oxford-Gruppe um Florey, Chain und Abraham [6] und die Isolation von Penicillin G (Benzyl-Penicillin). Die allgemeine Markteinführung fand 1946 nach dem Ende des Zweiten Weltkrieges statt.

Eine vergleichbare Entdeckung wie Fleming machte 1945 Giuseppe Brotzu mit einem aus einer Seewasserprobe isolierten Pilz (*Cephalosporium acremonium*). Aus diesem Pilz hergestellte Extrakte zeigten antimikrobielle Wirkung gegen gram-positive und gram-negative Bakterien. Die klinische Wirksamkeit der Extrakte überprüfte Brotzu an Patienten mit unterschiedlichsten Infektionen durch direkte Injektion der Pilzextrakte. Spätere Arbeiten an der Oxford Universität zeigten, dass der Pilz drei Antibiotika produzierte: Cephalosporin N, Cephalosporin P und Cephalosporin C. Der Wunsch nach einem Antibiotikum mit erweitertem Wirksamkeitsspektrum auf gram-negative Keime, gegenüber dem des Penicillins, das sich nur auf die gram-positiven beschränkte, führte zur Entwicklung der Cephalosporin-Klasse [7].

Alle heute verwendeten Penicilline und Cephalosporine sind aufgrund der besseren pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften semisynthetische Verbindungen. Lediglich das natürliche Penicillin G findet noch breite Anwendung.

1.2.1.1 Struktur und Wirkungsmechanismus

Penicilline und Cephalosporine besitzen strukturell sowie funktionell sehr große Ähnlichkeit. Abb. 1 zeigt den Penicillin- und den Cephalosporingrundkörper.

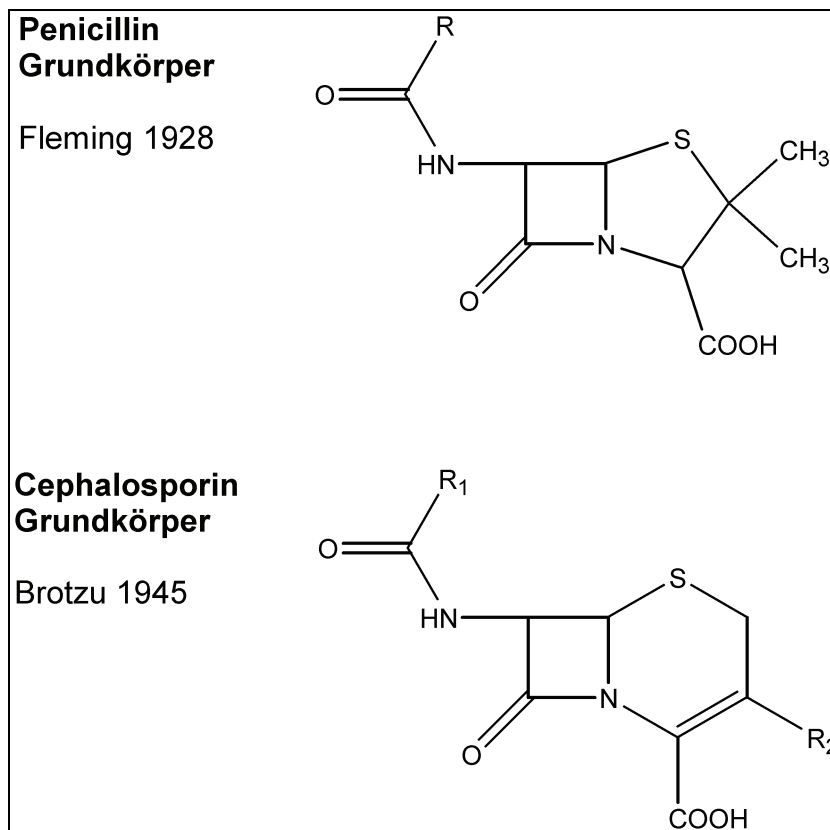


Abb. 1: Penicillin- und Cephalosporingrundkörper

Alle Vertreter der β -Lactame besitzen als Gemeinsamkeit einen β -Lactamring, der bei den Penicillinen mit einem fünfgliedrigen Thiazolidinring unter Bildung von 6-APS (6-Aminopenicillansäure) und bei den Cephalosporinen mit einem sechsgliedrigen Dihydrothiazinring unter Bildung von 7-ACS (7-Aminocephalosporansäure) kondensiert ist.

Der bakterizide Effekt bei beiden Substanzklassen beruht auf einer Hemmung der Biosynthese von Murein, welches als Grundstruktur der bakteriellen Zellwand eine entscheidende Rolle spielt. Für die Wirkung der β -Lactame ist es notwendig, dass sich die Bakterien im Wachstum (Proliferation) befinden. Bakterien, die sich nicht im Wachstum befinden, sind in diesem Zustand penicillin-unempfindlich [8]. Angriffsziele (Targets) der β -Lactame sind die chromosomal kodierten Penicillin-bindenden Proteine (PBPs) [9].

Bei den PBPs handelt es sich um verschiedene Enzyme (Transpeptidase, Transglycolase, Carboxypeptidase), die in die Zytoplasmamembran der Bakterienzelle integriert sind und als Enzyme terminale oder modifizierende Schritte der Mureinsynthese katalysieren [10]. Die PBPs gehören zur Superfamilie der Penicilloyl-serin-transferasen [11].

Alle Bakterien enthalten verschiedene PBPs mit unterschiedlichen Molekulargewichten und Funktionen. Im gram-positiven *Staphylococcus aureus* kommen 4 PBPs und im gram-negativen *Escherichia coli* dagegen 7 PBPs vor [10]. Eine schematische Darstellung der von den PBPs katalysierten Reaktionen bei der Mureinsynthese ist in Abb. 2 dargestellt.

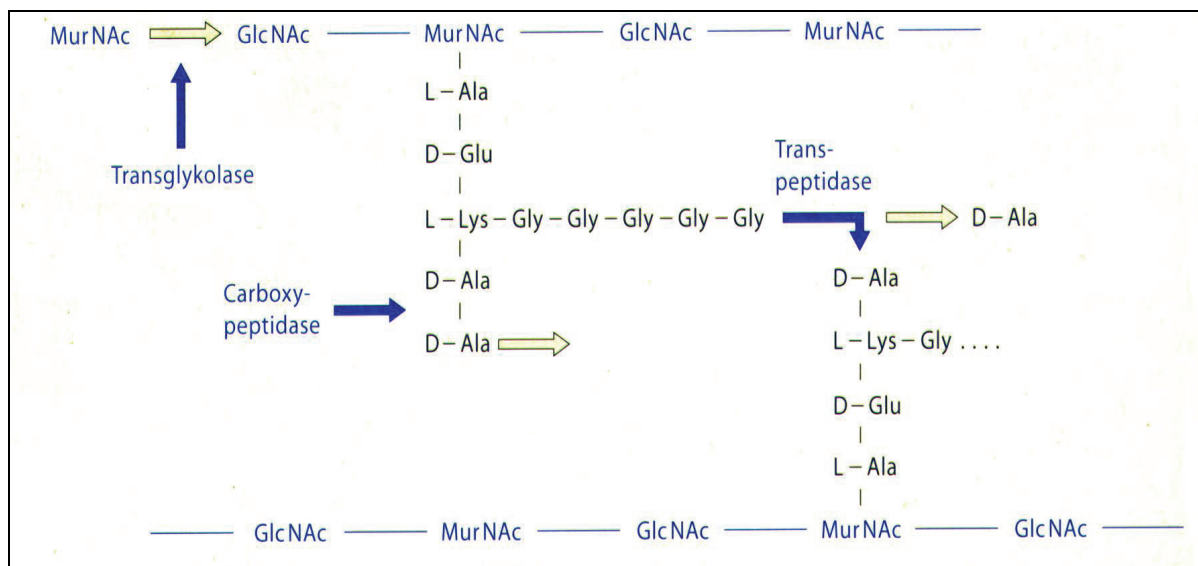
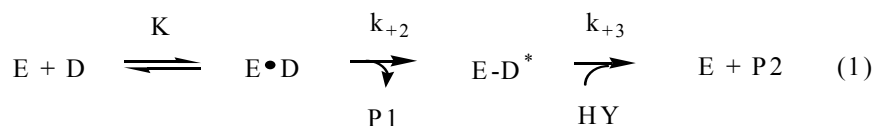


Abb. 2: Transpeptidase: Quervernetzung der linearen Polysaccharidketten über ein terminales Glycin mit dem vorletzten D-Alanin benachbarter Zuckerketten. Carboxypeptidase: Abspaltung eines D-Alanin. Transglykolase: 1-4 Verknüpfung von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure [10].

Die Quervernetzung der noch wasserlöslichen linearen Polysaccharidketten stellt den letzten Schritt der Mureinsynthese dar und wird durch die Einwirkung der Transpeptidase katalysiert (s. Abb. 2). Es findet dabei eine Verknüpfung zwischen einem terminalen Glycin der Interpeptidkette und dem vorletzten D-Alaninrest der Pentapeptideinheit statt. Die notwendige Energie liefert hierzu die Abspaltung des terminalen D-Alanins [10]. Allgemein katalysiert die Transpeptidase den Doppeltransfer eines R-L-aminoacyl(aa)-D-alanyl-Restes von R-L-aa-D-alanyl-D-alanin, dem Carbonyldonor (D), zum aktiven Serinrest des Enzyms (E) unter Bildung

eines Serinesters (R-L-aa-D-alanyl) Acylenzyms ($E\text{-D}^*$) und von diesem zum exogenen Akzeptor (HY). Der Carbonyldonor wird dabei transpeptidiert [11]. P1 (D-Alanin) ist die Abgangsgruppe des Enzym-acylierungsschrittes; K ist die Dissoziationskonstante, $E\bullet D$ ist der Michaelis-Komplex, P2 ist der transpeptidierte Carbonyldonor und k_{+2} und k_{+3} sind die Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung. Die Reaktion ist in Gleichung 1 dargestellt.



β -Lactamantibiotika verhindern diese Transpeptidierung (Quervernetzung) und somit die Mureinsynthese. Der Grund liegt in der strukturellen Ähnlichkeit zwischen den β -Lactamen und der D-Alanyl-D-alanin Endgruppe (Carbonyldonor), wie sich aus Abb. 3 erkennen lässt.

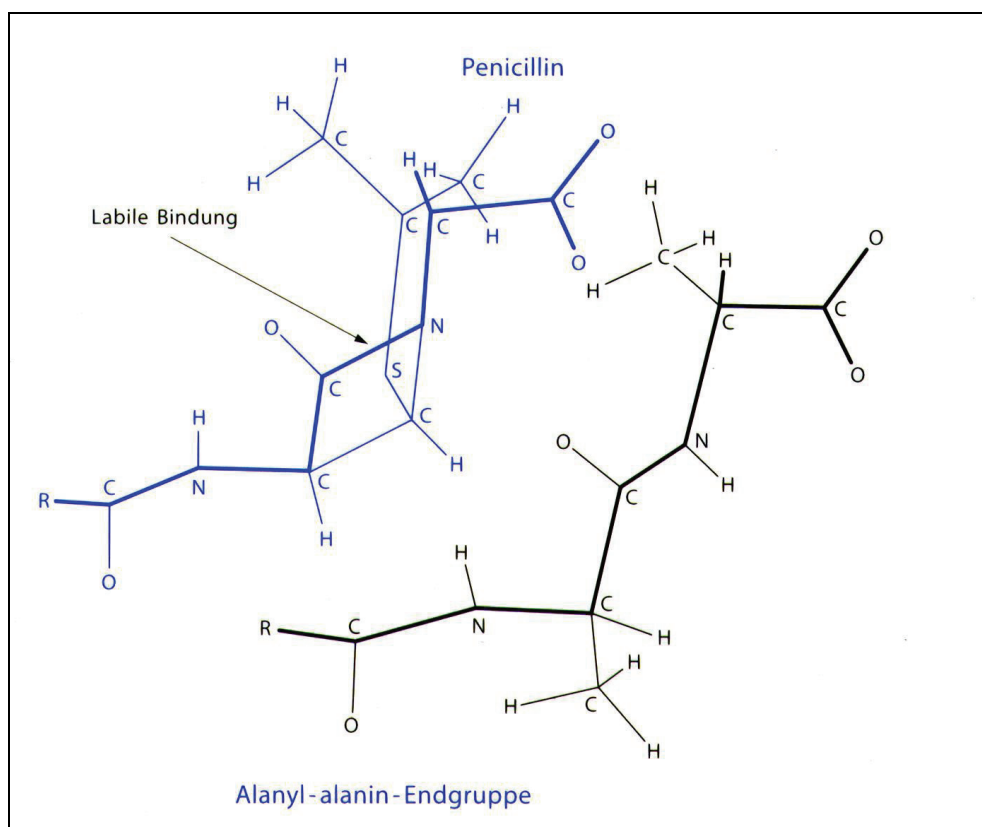
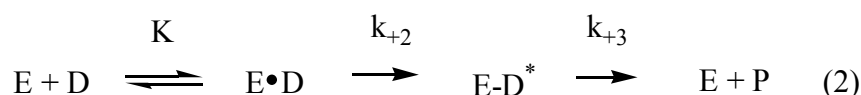


Abb. 3: Strukturvergleich der Penicilline mit der Struktur der D-Alanyl-D-alanin-Endgruppe des Mureinvorläufers [12]

β -Lactamantibiotika stellen sogenannte Analoge des natürlich vorkommenden Peptidoglycansubstrats dar, welche in die Transpeptidierungsreaktion eintreten, jedoch aufgrund ihrer hochaktiven CO-N-Bindung im Betalactamring (labile Bindung)

kovalent an das aktive Zentrum (Serin-rest) der Transpeptidase, unter Bildung eines langlebigen Acyl(penicilloyl)-Enzyms ($E-D^*$), binden. Diese Bindung ist nicht absolut inert, jedoch beträgt die Regenerationszeit ca. 5.000 bis 10.000 Minuten (sehr kleiner k_{+3} Wert), was letztlich einer irreversiblen Hemmung gleichkommt. Als Konsequenz findet lediglich der erste Schritt des Transferzyklus unter Bildung eines Acyl(penicilloyl)-Enzyms statt. P repräsentiert das β -Lactam. Diese Reaktion wird durch Gleichung 2 dargestellt.



1.2.1.2 Klassifizierung der Penicilline und Cephalosporine (Indikation)

Bei den heute für die Veterinärmedizin zugelassenen Penicillinen handelt es sich, bis auf das Benzylpenicillin (Pen G), dessen Gewinnung aus wirtschaftlichen Gründen auch heute noch rein biologisch erfolgt, um semisynthetische Verbindungen. Ihre Synthese geht von der 6-Aminopenicillansäure (6-APS) aus, indem der Rest R entsprechend chemisch modifiziert wird (s. Abb. 1).

Die semisynthetischen Penicilline werden in Abhängigkeit ihrer Penicillinaseresistenz und ihres Wirkungsspektrums in penicillinasefeste Antistaphylokokkenpenicilline, Aminopenicilline mit erweitertem Wirkungsspektrum und Breitspektrumpenicilline weiter unterteilt [8, 13, 14].

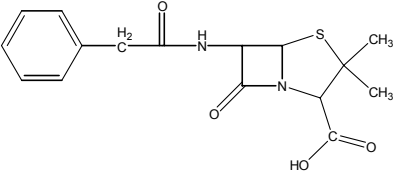
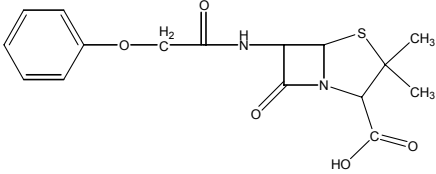
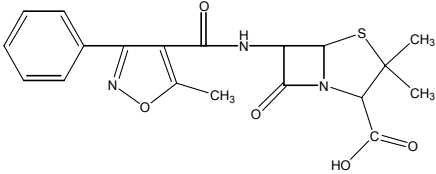
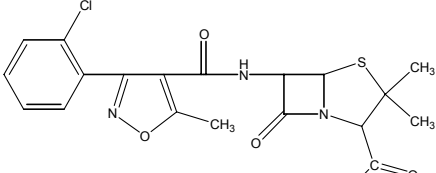
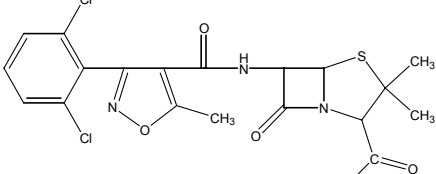
Das Wirkungsspektrum des natürlichen Pen G ist von allen Penicillinen das schmalste und erstreckt sich überwiegend auf gram-positive Bakterien und einige wenige gram-negative Kokken. Durch die Einführung einer NH_2 -Gruppe in die dem Benzolring benachbarte CH_2 -Gruppe des Pen G stand zu Beginn der sechziger Jahre das erste Aminopenicillin (Ampicillin) zur Verfügung. Aminopenicilline sind besonders gegen gram-negative Keime wirksam.

Das frühe Auftreten von β -Lactamase bildenden Staphylokokken führte in der Mitte der sechziger Jahre zur Entwicklung penicillinasefester Penicilline, den sogenannten Isoxazolympenicillinen. Die chemische Modifizierung des Restes R durch sperrige Seitenketten ermöglichte es, nach dem Prinzip der sterischen Hinderung den β -Lactamring vor einer enzymatischen Spaltung zu schützen.

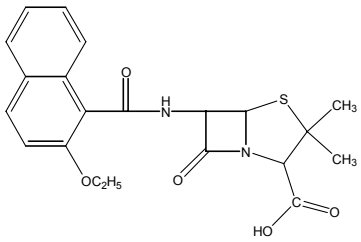
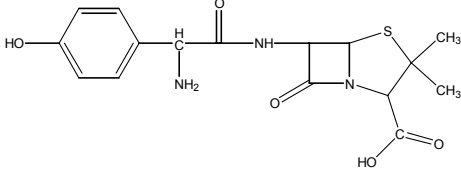
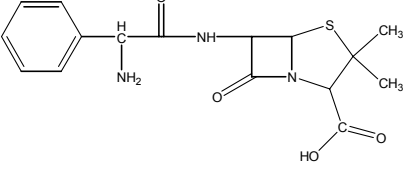
Zur Klasse der Breitbandpenicilline gehören die seit längerer Zeit entwickelten Acylaminopenicilline und die Carboxypenicilline. Die Vertreter dieser Klasse zeichnen

sich durch ein weiteres Wirkungsspektrum gegen gram-negative Keime, insbesondere gegen sogenannte Problemkeime wie *Pseudomonas aeruginosa*, aus [10]. Momentan sind jedoch keine Penicilline dieser Klasse für die Veterinärmedizin zugelassen. In Tab. 1 ist eine Zusammenfassung aller in dieser Arbeit untersuchten und in der EU für die Veterinärmedizin zugelassenen Penicilline mit ihrer Klassifizierung und den Indikationen dargestellt.

Tab. 1: Strukturen der in dieser Arbeit untersuchten Penicilline und ihre Indikation

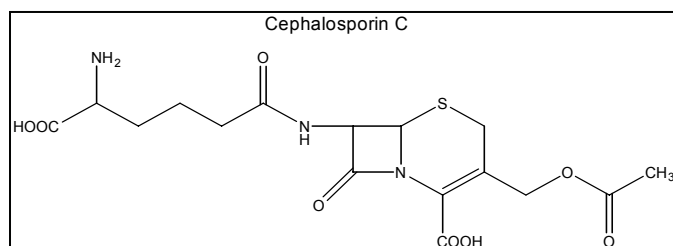
Substanz	Struktur	Klasse*	Indikation (Verabreichung)
Penicillin G (Pen G)		1	Akute Infektionen (parenterale Verabreichung), Mastitis (intramammäre Injektion)
Penicillin V (Pen V)		1	Akute Infektionen (parenterale Verabreichung). Nicht für die Behandlung von Rindern zugelassen.
Oxacillin (Oxa)		2	Mastitis (intramammäre Injektion)
Cloxacillin (Clox)		2	Mastitis (intramammäre Injektion)
Dicloxacillin (Diclox)		2	Mastitis (intramammäre Injektion)

Fortsetzung Tab. 1

Nafcillin (Naf)		2	Mastitis (intramammäre Injektion)
Amoxicillin (Amox)		3	Akute Infektionen (parenterale Verabreichung), Mastitis (intramammäre Injektion)
Ampicillin (Amp)		3	Akute Infektionen (parenterale Verabreichung), Mastitis (intramammäre Injektion)

* 1 (natürliche Penicilline), 2 (penicillinasefeste Penicilline), 3 (Aminopenicilline)

Im Gegensatz zu den Penicillinen sind alle heute in der Veterinärmedizin eingesetzten Cephalosporine semisynthetische Verbindungen, die sich vom natürlich



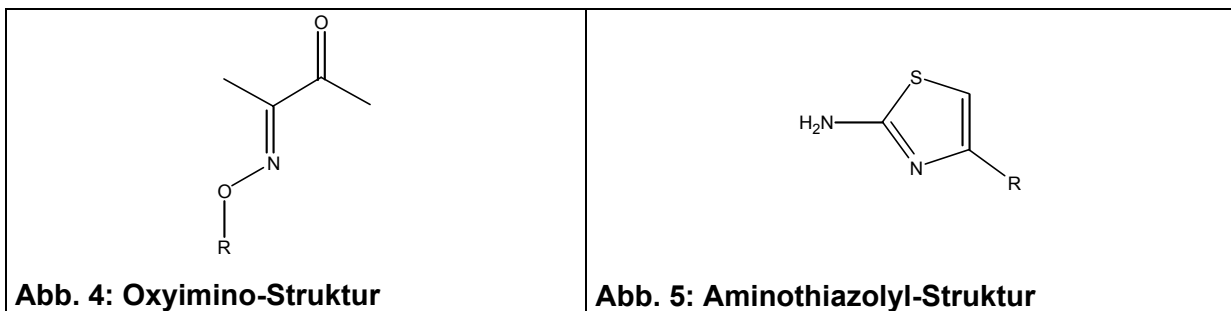
vorkommenden Cephalosporin C ableiten. Durch eine entsprechende chemische Modifizierung der Reste R_1 und R_2 des Cephalosporingrundkörpers (s. Abb. 1) ist die Herstellung einer Vielzahl von Verbindungen mit unterschiedlichen Eigenschaften möglich.

Eine erhöhte Affinität zu den PBPs wird z.B. durch Modifizierung des Restes R_1 erzielt, wohingegen die Modifizierung des Restes R_2 überwiegend die pharmakokinetischen Eigenschaften der Cephalosporine beeinflusst.

Klinisch werden die Cephalosporine auf Basis ihres relativen in vitro Aktivitätsspektrums, ihrer strukturellen Ähnlichkeiten und ihrer Markteinführung in vier verschiedene Klassen eingeteilt: Cephalosporine der ersten (Narrow-Spectrum), zweiten (Expanded-Spectrum), dritten (Broad-Spectrum) und vierten (Extended-Spectrum) Generation.

Die Cephalosporine der ersten Generation, die in den 60-iger und 70-iger Jahren eingeführt wurden, sind im allgemeinen gegen gram-positive Bakterien wirksam. Ihr Wirkungsspektrum gegen gram-negative Bakterien war jedoch sehr begrenzt. Ende der 70-iger Jahre standen die Cephalosporine der zweiten Generation zur

Verfügung, die eine bessere β -Lactamaseresistenz und ein breiteres Wirkungsspektrum gegenüber den gram-negativen Bakterien besitzen als die Cephalosporine der ersten Generation. Zu Beginn der 80-iger Jahre wurden die Cephalosporine der dritten Generation in den Markt eingeführt, die sich durch eine gute Wirksamkeit gegen gram-negative Bakterien auszeichnen. Allerdings ist ihre Wirksamkeit gegen gram-positive Bakterien im Vergleich zu den Cephalosporinen der ersten und zweiten Generation verringert. Charakteristische Strukturmerkmale dieser Cephalosporinklasse sind die Oxyimino-Gruppe (s. Abb. 4), welche für die gute β -Lactamaseresistenz verantwortlich ist und der Aminothiazolyl-Ring (s. Abb. 5). Zusammen bilden sie die Aminothiazolyl-methoxy-imino-Gruppe als Rest R_1 .



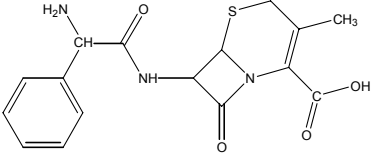
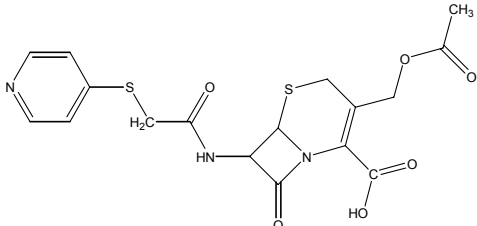
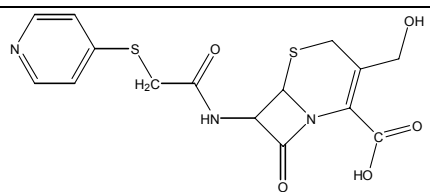
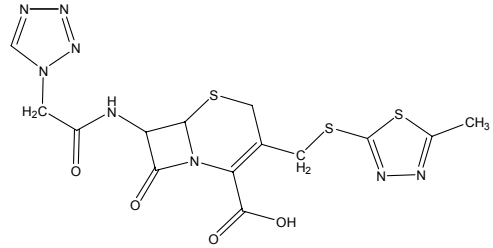
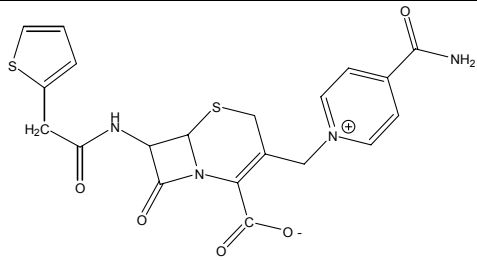
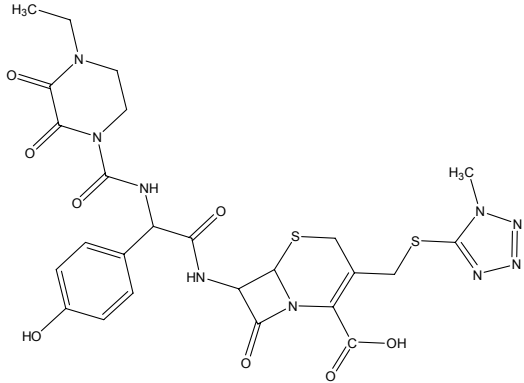
Cephalosporine der vierten Generation stellen die neuesten Vertreter dieser Klasse dar. Sie besitzen eine Aminothiazolyl-methoxy-imino-Gruppe als Rest R_1 sowie eine quaternäre Aminogruppe mit permanent positiver Ladung als Rest R_2 . Letztere ist für das erweiterte Wirkungsspektrum, speziell gegen gram-negative Bakterien, im Vergleich zu den Cephalosporinen der dritten Generation, verantwortlich [15, 16].

Abschließend lässt sich in Bezug auf die verschiedenen Cephalosporin-Generationen zusammenfassend feststellen, dass zwar mit jeder neuen Generation die Eigenschaften hinsichtlich der Wirksamkeit gegenüber gram-negativen Keimen und der Resistenz gegenüber β -Lactamasen verbessert wurden, dies jedoch zu Lasten der Wirksamkeit gegenüber gram-positiven Bakterien ging.

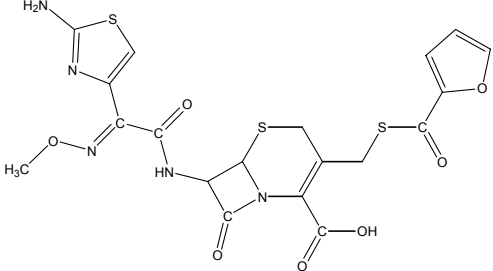
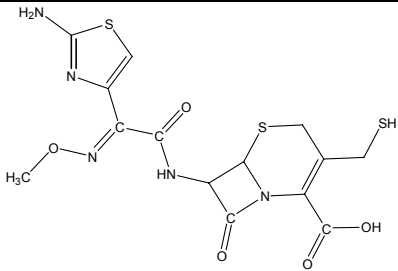
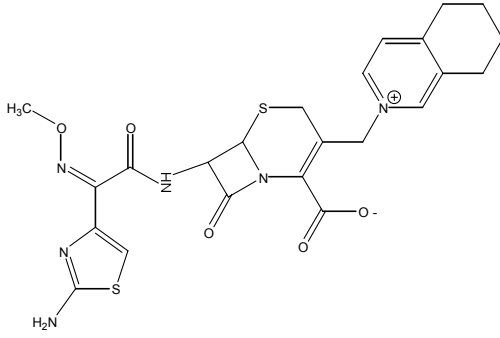
In Tab. 2 ist eine Zusammenfassung aller in dieser Arbeit untersuchten und in der EU für die Veterinärmedizin zugelassenen Cephalosporine mit ihrer Generationszugehörigkeit und den Indikationen dargestellt.

Die beiden Cephalosporine Cefquinome und Ceftiofur wurden speziell für die Anwendung in der Veterinärmedizin entwickelt, wohingegen alle anderen Cephalosporine ihren Ursprung in der Humanmedizin haben.

Tab. 2: Strukturen der in dieser Arbeit untersuchten Cephalosporine (inkl. Metabolit) und ihre Indikation

Substanz	Struktur	Genera- tion	Indikation (Verabreichung)
Cephalexin (Cphalex)		1	Akute Infektionen (parenterale Verab- reichung), Mastitis (intramammäre Injektion)
Cephapirin (Ceph)		1	Mastitis (intramammäre Injektion), Endometritis (intrauterine Injektion)
Desacetyl- Cephapirin (Dceph)		1	Metabolit von Cephapirin
Cefazolin (Cfzn)		1	Mastitis (intramammäre Injektion)
Cephalonium (Cephal)		1	Mastitis (intramammäre Injektion), Infektion der Augen, z.B. Conjunctivitis (Augensalbe)
Cefoperazon (Cefo)		3	Mastitis (intramammäre Injektion)

Fortsetzung Tab. 2

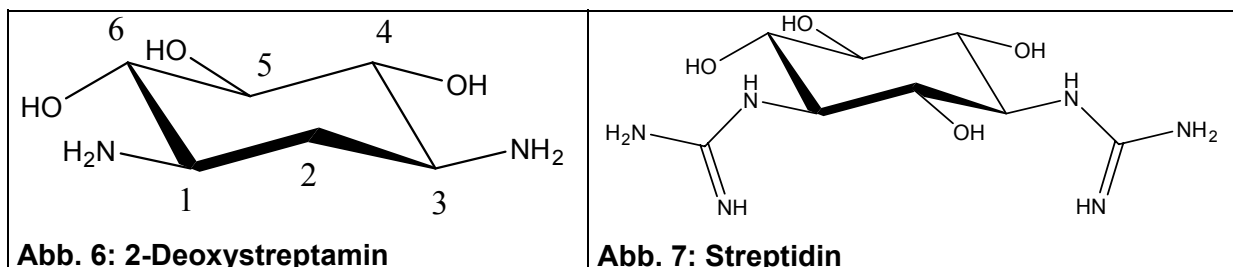
Ceftiofur (Ceft)		3	Akute Infektionen (parenterale Verab- reichung)
Desfuroyl- Ceftiofur (DFC)		3	Metabolit von Ceftiofur
Cefquinome (Cefqu)		4	Akute Infektionen (parenterale Verab- reichung), Mastitis (intramammäre Injektion)

1.2.2 Aminoglycoside

Das erste Aminoglycosid, welches nach dem Benzylpenicillin breite therapeutische Anwendung fand, war das Streptomycin. Es wurde aus *Streptomyces griseus* isoliert und 1944 erstmals von Schatz, Bugie und Waksman beschrieben [zitiert in: 8, 17]. Aminoglycoside werden biologisch von *Streptomyces*-Arten sowie von *Micromonospora*-Arten gebildet. Entsprechend ihrer Herkunft werden sie mit dem Suffix *-mycin* (für *Streptomyces*-Arten) oder mit dem Suffix *-micin* für (*Micromonospora*-Arten) bezeichnet.

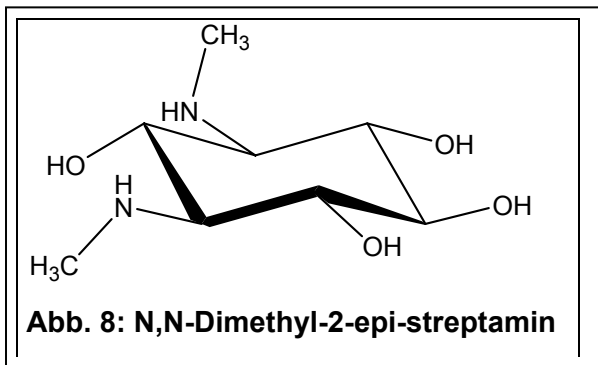
1.2.2.1 Struktur, Klassifizierung und Wirkungsmechanismus

Die Aminoglycoside sind eine große Klasse von bakterizid wirkenden Verbindungen, die dadurch charakterisiert sind, dass zwei oder mehrere Aminozucker glykosidisch an eine Aminocyclitolkomponente (aminosubstituiertes Hydroxycyclohexan), dem sogenannten Aglycon, gebunden sind. Aufgrund der unterschiedlichen Aglycone können die Aminoglycoside chemisch in zwei Hauptgruppen klassifiziert werden: Diejenigen, die ein 2-Deoxystreptamin als Aglycon enthalten und diejenigen, die ein Streptidin enthalten. Die Aglycone sind in Abb. 6 u. 7 dargestellt.



Zu den Streptidin-Verbindungen gehören Streptomycin und das semi-synthetische Dihydrostreptomycin, das aus Streptomycin durch katalytische Hydrierung hergestellt wird. Die 2-Deoxystreptamine können abhängig von der Substitution des Cyclitols weiter unterteilt werden. Die wichtigsten Unterklassen sind die 4,5-disubstituierten 2-Deoxystreptamine (Neomycin, Paromomycin) und die 4,6-disubstituierten 2-Deoxystreptamine (Gentamicin, Kanamycin, Tobramycin). Eine weitere Unterklasse, zu welcher Apramycin gehört, besitzt nur einen Substituenten, der an 2-Deoxystreptamin glykosidisch an Position 4 gebunden ist.

Die Substanz Spectinomycin wird ebenfalls zu den Aminoglycosiden gezählt, obwohl sie streng genommen wegen des Fehlens von Aminozuckern und glykosidischen



Bindungen kein Aminoglycosid ist. Das Aglykon von Spectinomycin ist das N,N-Dimethyl-2-epi-streptamin (s. Abb. 8). Die zur Herstellung der Aminoglycoside verwendeten Organismen produzieren häufig eine Vielzahl von strukturell ähnlichen Verbindungen, weshalb die

therapeutischen Produkte wie zum Beispiel Gentamicin Mischungen sein können. Gentamicin ist ein Komplex von 5 Substanzen (Gentamicin C₁, C_{1a}, C₂, C_{2a}, C_{2b}) [18, 19, 17].

Die Aminoglycoside sind aufgrund ihrer Amino- und Hydroxylfunktionen hochpolare, sehr gut wasserlösliche Verbindungen, die unter physiologischen Bedingungen bei pK_s-Werten zwischen 7 und 8,8 überwiegend positiv geladen vorliegen [20]. Sie besitzen Breitbandwirkung gegen einige gram-positive und viele gram-negative Bakterien. Aminoglycoside sind nicht gegen anaerobe Keime wirksam [17].

Die bakterizide Wirkung basiert auf der Bindung an die bakterielle RNA mit der Folge, dass die genetische Information falsch gelesen wird („misreading“). Es wird dabei angenommen, dass die Falschübersetzung des genetischen Codes während der Translation von integralen Membranproteinen zur Bildung von abnormalen Proteinen führt, welche die Barriereigenschaften der Bakterienmembran beeinträchtigen.

Die positive Ladung der Verbindungen ist primär für das Bindungsvermögen an die RNA und deren Wirksamkeit verantwortlich. Angriffsziele der Aminoglycoside sind die ribosomale RNA (rRNA) der 30 S-Untereinheit, welche für die Bindung der Transfer-RNA (tRNA) verantwortlich ist [21].

1.2.2.2 Aminoglycoside (Indikation)

Streptomycin, Dihydrostreptomycin, Gentamicin und Neomycin sind die am meisten bei nahrungsmittelliefernden Tieren eingesetzten Aminoglycoside [18]. Aminoglycoside werden aus dem Magen-Darmtrakt schlecht resorbiert, darüber hinaus ist ihre Gewebegängigkeit bis auf die Niere sehr gering. Üblicherweise werden die Aminoglycoside deshalb parenteral, häufig in Kombination mit einem β -Lactam verabreicht. Durch eine solche Kombination ist es möglich, Infektionen, die durch gram-positive Keime oder gram-negativen Keime verursacht wurden, zu

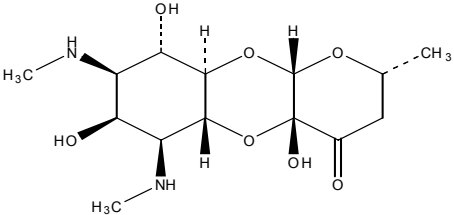
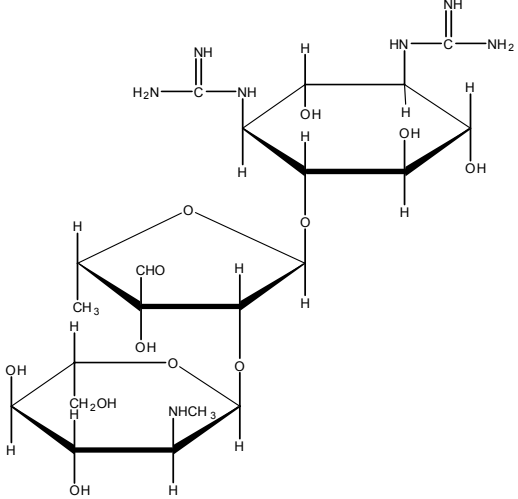
bekämpfen. Die Anwendungsgebiete der Aminoglycoside sind vor allem die Behandlung der bakteriellen Enteritis und der Mastitis [17].

Aminoglycoside besitzen die Eigenschaft, sich sehr stark in der Niere, speziell im Cortex, anzureichern [22]. Z.B. zeigte die Analyse des Gentamicingehaltes beim Menschen, dass die Konzentration in der Niere um den Faktor 161 über der des Muskelgewebes lag [23]. Für Dihydrostreptomycin lag das gemessene Verhältnis in Rinderniere zur Rindermuskulatur bei 150:1 [19].

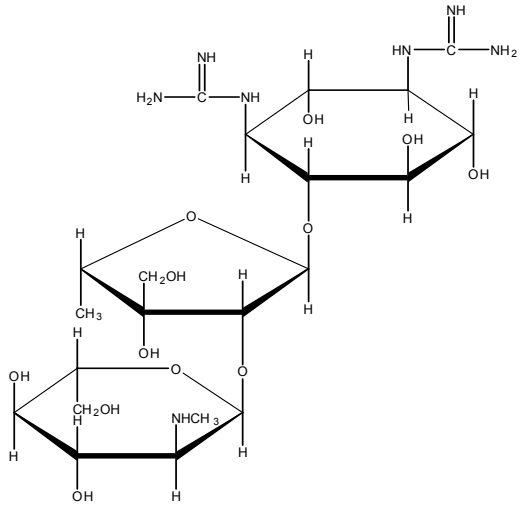
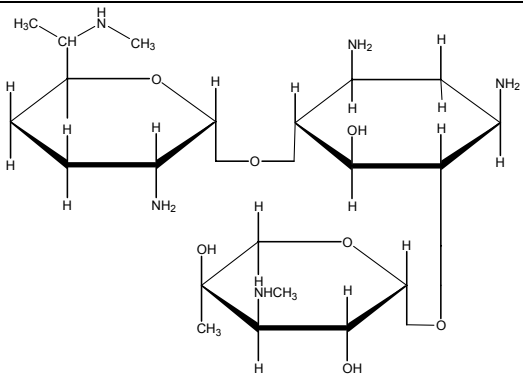
Aufgrund dieser starken Bindung sind in der Regel sehr lange Wartezeiten von bis zu 4 Wochen für Dihydrostreptomycin und 7 Wochen für Gentamicin vorgeschrieben.

In Tab. 3 ist eine Zusammenfassung aller in dieser Arbeit untersuchten und in der EU für die Veterinärmedizin zugelassenen Aminoglycoside dargestellt.

Tab. 3: Strukturen der in dieser Arbeit untersuchten Aminoglycoside und ihre Indikation

Substanz	Struktur	Indikation (Verabreichung)
Spectinomycin (Spec)		Akute Infektionen (parenterale Verabreichung)
Streptomycin (Str)		Akute Infektionen (parenterale Verabreichung), Mastitis (intramammäre Injektion)

Fortsetzung Tab. 3

<p>Dihydro- streptomycin (Dhs)</p>		<p>Akute Infektionen (parenterale Verabreichung), Mastitis (intramammäre Injektion)</p>
<p>Gentamicin C1 (Gent)</p>		<p>Akute Infektionen (parenterale Verabreichung), Mastitis (intramammäre Injektion)</p>

1.3 Festgesetzte Höchstmengen für pharmakologisch wirksame Stoffe (PWS) in der Europäischen Union

In der Verordnung EWG/2377/90 sind in den Anhängen I und III für die in der EU zugelassenen PWS, getrennt nach Tierarten und Matrices, konkrete Höchstmengen über MRL-Werte festgesetzt worden. Anhang II enthält ein Verzeichnis der PWS, für die keine Höchstmengen erforderlich sind.

In Anhang IV sind die PWS zusammengestellt, für die keine unbedenklichen Höchstmengen festgelegt werden konnten. Die Anwendung dieser Stoffe ist in der EU daher bei allen lebensmittelliefernden Tieren verboten.

Tierische Lebensmittel, die PWS in Konzentrationen enthalten, welche oberhalb des MRL liegen, sind entsprechend § 15 LMBG (Lebensmittel- und Bedarfsgegenstandesgesetz) als nicht verkehrsfähig zu beurteilen. Verstöße haben strafrechtliche Konsequenzen für den Inverkehrbringer.

In der Tab. 4 sind die aktuell gültigen MRL-Werte für die in dieser Arbeit untersuchten Antiinfektiva (Penicilline, Cephalosporine, Aminoglycoside) für die verschiedenen Matrices beim Rind aufgeführt.

Tab. 4: Festgesetzte Höchstmengen für Penicillin-, Cephalosporin- und Aminoglycosidrückstände für die verschiedenen Matrices beim Rind (MRL-Werte in µg/kg)

Substanz	Marker-Rückstand	Milch	Muskel	Niere
Amoxicillin	Muttersubstanz	4	50	50
Ampicillin	Muttersubstanz	4	50	50
Pen G	Muttersubstanz	4	50	50
Cloxacillin	Muttersubstanz	30	300	300
Dicloxacillin	Muttersubstanz	30	300	300
Nafcillin	Muttersubstanz	30	300	300
Oxacillin	Muttersubstanz	30	300	300
Pen V	Muttersubstanz	(**)	(**)	(**)
Cephalexin	Muttersubstanz	100	200	1000
Cephalonium	Muttersubstanz	20	(*)	(*)
Cephapirin	Summe von Cephapirin und Desacetyl-Cephapirin	60	50	100
Cefazolin	Muttersubstanz	50	(*)	(*)
Cefoperazon	Muttersubstanz	50	(*)	(*)
Cefquinome	Muttersubstanz	20	50	200
Milch				
Ceftiofur	Summe aller den β -Lactamring enthaltenden und als Desfuroylceftiofur gemessenen Rückstände	100		
Niere				
Streptomycin	Muttersubstanz	1000		
Dihydrostreptomycin	Muttersubstanz	1000		
Spectinomycin	Muttersubstanz	5000		
Gentamicin	Summe aus Gentamicin C1, C1a, C2, C2a	750		

(*) Für diese Substanzen sind keine MRL-Werte in den Geweben festgesetzt (Anhang II, VO (EWG) 2377/90) , (**) Pen V ist nur für die Anwendung bei Schweinen zugelassen

1.4 Theoretische Aspekte der LC-MS-Technik

Die Kopplung der Flüssigchromatographie an ein Massenspektrometer (LC-MS) ermöglicht die Analytik eines sehr großen Spektrums von Verbindungen, die hinsichtlich ihres Molekulargewichtes, ihrer Ionisierbarkeit und Polarität sehr unterschiedlich sein können. Prinzipiell sind alle Verbindungen, welche mittels HPLC getrennt werden können, für die LC-MS-Technik geeignet. Hierzu zählen insbesondere Verbindungen mit hohem Molekulargewicht (> 250 Da), ionische Verbindungen, ionisierbare Verbindungen sowie polare, nicht ionische (thermolabile) Verbindungen. Ein großer Vorteil der LC-MS gegenüber anderen massenspektrometrischen Verfahren wie z.B. der GC-MS besteht darin, dass die zu analysierenden Verbindungen ohne vorherige Derivatisierung analysierbar sind.

Es wird geschätzt, dass lediglich 20 % der bis heute bekannten organischen Verbindungen ohne vorherige Derivatisierung mittels GC-MS, jedoch 80 % dieser mittels LC-MS, detektierbar sind. Dieses Verhältnis macht die universelle Einsetzbarkeit der LC-MS-Technik sowie deren Vorteile deutlich [24].

Besonders in den Bereichen der Entwicklung und der Rückstandsanalytik von pharmazeutischen Wirkstoffen und der Umweltanalytik, welche als Schwerpunkt die Analytik von polaren, nicht für die GC geeigneten Verbindungen haben, findet die LC-MS heutzutage breite Anwendung [25].

1.4.1 Ionisationsverfahren unter Atmosphärendruck

Die Ionenquellen bei Massenspektrometern befinden sich normalerweise innerhalb des Gerätes und somit im Hochvakuumbereich. GC-MS-Geräte mit Elektronenstoßionisation (EI) oder Chemischer Ionisation (CI) stellen hier klassische Vertreter dar, die heutzutage in der Routineanalytik breite Anwendung finden [26]. Im Gegensatz zur Ionisation im Hochvakuum kommt für die Kopplung der Flüssigchromatographie an ein Massenspektrometer (LC-MS) jedoch ausschließlich die Ionisation bei Atmosphärendruck (API) zum Einsatz. Die heute kommerziell erwerblichen LC-MS-Geräte verfügen dabei entweder über die Elektrosprayionisation (ESI) oder über die Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI). Die Photoionisation bei Atmosphärendruck (APPI) stellt den neuesten Vertreter dieser Klasse dar, dessen Anwendung erstmals im Jahr 2000 beschrieben wurde [27]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist der Einsatz der APPI in der Routineanalytik unbedeutend.

Bei der ESI handelt es sich um eine Ionisierungstechnik, welche es ermöglicht, solvatisierte Ionen (organische, anorganische Verbindungen) in die Gasphase zu überführen und sie damit einer massenspektrometrischen Detektion zugänglich zu machen. Es ist für diesen Prozess essentiell, dass die Substanzen in Lösung als Ionen vorliegen. Beim Transport von Ionen in die Gasphase handelt es sich um einen endergonischen Desolvatisierungsprozess. Um z.B. 1 mol Na^+ -Ionen aus einer wässrigen Lösung in die Gasphase zu transportieren, wird ein hoher Energiebetrag von 98.2 kcal benötigt.

Die ESI ermöglicht diese stark endergonischen Ionisationsprozesse im Unterschied zu anderen Ionisationsmethoden, wie z.B. dem Fast Atom Bombardment (FAB), sehr schonend. Es kommt zur intensiven Bildung von Gasphasenionen ohne anschließende Fragmentierung [28]. Neben der massenspektrometrischen Detektion von niedermolekularen Verbindungen ermöglicht die ESI auch die Detektion von hochmolekularen Verbindungen, insbesondere von Proteinen, mit einem Molekulargewicht von bis zu 10^5 Da. Dies ist deshalb möglich, da die ESI in der Lage ist, mehrfach geladene Molekülionen zu bilden, die dadurch ein kleines Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) aufweisen und somit im Messbereich von modernen Quadrupol-Massenspektrometern (bis m/z 4000) liegen.

Im Gegensatz zur ESI findet die Ionisierung bei der APCI nicht zwingend in der flüssigen Phase, sondern in der Gasphase durch chemische Ionisation statt. Die solvatisierten Verbindungen werden dabei mittels eines Stickstoffstromes in eine beheizte Kammer (Vaporizer) bei ca. 400°C gesprüht, in der es zur Verdampfung des Lösungsmittels und der Analyten kommt. Es ist dabei von großer Wichtigkeit, dass die zu ionisierenden Verbindungen möglichst nichtionisch in Lösung vorliegen und relativ thermostabil sind [29]. Im Anschluss an den Verdampfungsprozess strömt die gebildete Dampfphase in Richtung einer Gasentladungsnadel (corona discharge needle), an der durch das Anlegen einer sehr hohen Spannung zwischen 2-5 kV ein Plasma von positiv geladenen Reagentionen erzeugt wird.

Bei den gebildeten Reagentionen handelt es sich abhängig vom gewählten Lösungsmittel um z.B. $\text{CH}_3\text{OH}_2^+(\text{H}_2\text{O})_n(\text{CH}_3\text{OH})_m$ (Methanol), $\text{CH}_3\text{CNH}^+(\text{H}_2\text{O})_n(\text{CH}_3\text{CN})_n$ (Acetonitril) oder $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ (Wasser). Die Reagentionen gehen mit den Analyten Gasphasenmolekülreaktionen ein, indem abhängig von der Gasphasenbasizität der zu ionisierenden Verbindungen Protonen auf diese übertragen werden [30]. Hierdurch kommt es letztlich zur Bildung von protonierten

Gasphasenionen. Diese Ionisationstechnik ist für Verbindungen mit einem Molekulargewicht von bis zu 1500 Da geeignet, da die APCI im Gegensatz zur ESI nicht in der Lage ist, mehrfach geladene Molekülonen zu erzeugen [24, 26].

1.4.2 Wahl der Ionisationstechnik (ESI vs. APCI)

Für die Analytik von niedermolekularen Verbindungen (< 1500 Da) mittels LC-MS stehen die oben beschriebenen Ionisierungstechniken (ESI, APCI) zur Wahl. Da der Ionisierungsmechanismus bei den beiden Techniken sehr unterschiedlich ist, muss abhängig von den chemisch-physikalischen Eigenschaften der zu ionisierenden Substanzen eine richtige Ionisierungstechnik gewählt werden. Nur so kann eine optimale Ionisierung erreicht werden. Untersuchungen an einer großen Anzahl von Modellsubstanzen zeigten, dass die Anwendungsbereiche der ESI und der APCI eindeutig abgrenzbar sind [29].

Die ESI ist besonders gut für ionische und polare Verbindungen geeignet, die saure sowie basische Eigenschaften in Lösung besitzen. Die APCI ist dagegen für mittelpolare und unpolare Verbindungen geeignet, jedoch nicht für ionische. Unter anderem zeigte die Modellsubstanz Natriumdodecylsulfat, welche aufgrund ihrer Sulfatgruppe permanent negativ geladen ist, im negativen ESI-Modus eine hohe Empfindlichkeit, jedoch kein Signal im negativen APCI-Modus.

Für polare und mittelpolare Verbindungen gibt es zwischen der ESI und APCI einen signifikanten Überschneidungsbereich, in welchem die Anwendung beider Ionisierungstechniken möglich ist.

β -Lactame (Penicilline, Cephalosporine) sowie die Aminoglycoside sind hoch- bis mittelpolare, ionische, thermolabile Verbindungen, deren Ionisierung unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Punkte am besten mittels der ESI erzielt werden kann.

Bereits in der Literatur beschriebene Vergleiche der ESI und APCI für die Ionisation von β -Lactamen [31, 32, 33] und Aminoglycosiden [34] bestätigten, dass die ESI gegenüber der APCI geeigneter ist.

Aufgrund der hier vorgestellten Abwägungen zwischen der ESI und der APCI werden alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an β -Lactamen und Aminoglycosiden mittels LC-MS unter Verwendung der Elektrosprayionisation (ESI) durchgeführt.

1.4.3 Mechanistische Aspekte der Elektrosprayionisation (ESI)

Die Elektrosprayionisation wurde zu Beginn bis Mitte der 80-iger Jahre von John Fenn und seiner Arbeitsgruppe als massenspektrometrische Ionisationstechnik entwickelt [35]. Durch Tom Covey wurde die ESI weiterentwickelt, indem der Ionisierungsprozeß durch die Verwendung eines Vernebelungs-Gases (N₂), dem so genannten Sheatgas, unterstützt wurde. Diese Technik wird als Ionspray (ISP) bezeichnet [36]. Die gegenwärtig verwendeten Elektrosprayinterfacetypen arbeiten grundsätzlich alle mit einer Stickstoffgasunterstützung. Dadurch werden hohe Flussraten von bis zu 1 ml/min toleriert, wohingegen bei der klassischen Elektrosprayionisation ohne Stickstoffunterstützung das Maximum bei ca. 10 µl/min liegt. Ein weiterer Vorteil des Ionsprays liegt in der weniger aufwendigen Positionierung der Elektrospraynadel und der damit erzielten höheren Robustheit [36]. Trotz dieser Unterschiede wird heute im allgemeinen der Begriff Elektrosprayionisierung (ESI) für beide Techniken verwendet, da die Bezeichnung Ionspray (ISP) rechtlich geschützt ist. In den Abschnitten 1.4.3.1 – 1.4.3.5 werden die mechanistischen Aspekte der ESI näher beschrieben [28, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45].

1.4.3.1 Erzeugung von geladenen Tröpfchen

Durch das Anlegen einer sehr hohen Spannung an die Kapillar-Spitze (Nadelspannung) von 2-5 kV wird ein sehr hohes elektrisches Feld (E_c) von ca. 10^6 V/m erzeugt. Dieses Feld ist von der angelegten Spannung (V_c), dem Kapillarradius (r_c), dem Abstand (d) der Kapillare zur gegenüberliegenden Elektrode abhängig und kann mit Gleichung (3) berechnet werden. Das Potential der Kapillare ist im positiven Elektrospraymodus (ESI (+)) positiv und im negativen Elektrospraymodus (ESI (-)) negativ. Die weitere Beschreibung des Mechanismus bezieht sich ausschließlich auf den positiven Modus. Der schematische Ablauf der Elektrosprayionisation ist in Abb. 9 dargestellt.

$$E_c = 2 V_c / r_c \ln (4d / r_c) \quad (3)$$

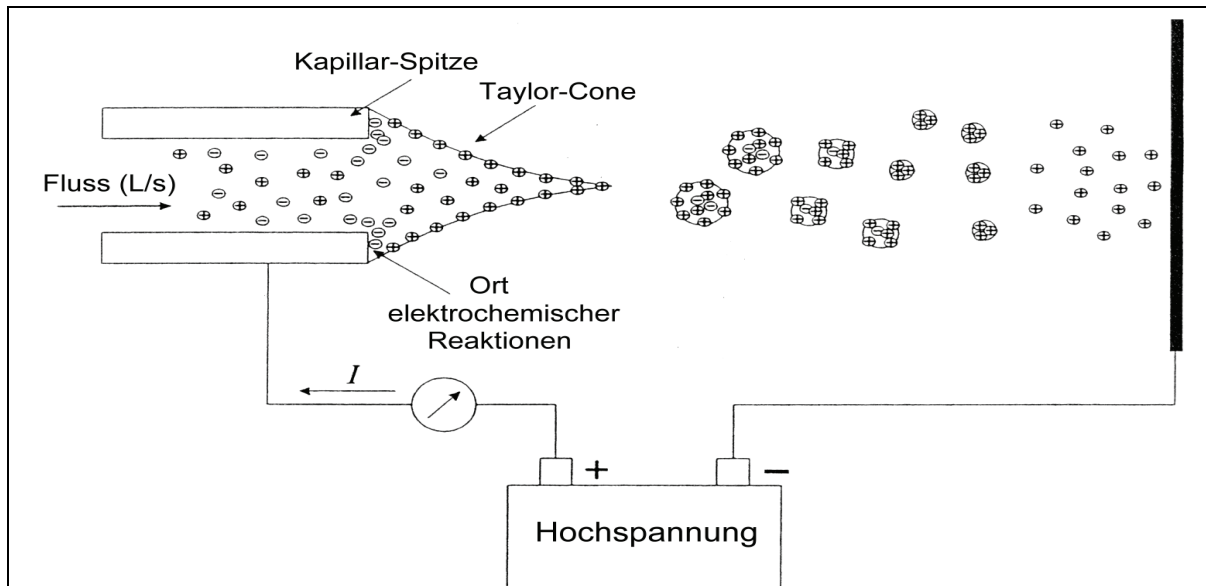


Abb 9: Schematische Darstellung des klassischen Elektrosprayprozesses im positiven ESI-Modus (ohne Sheatgasunterstützung)

An der Spitze der Kapillare kommt es in Lösung durch eine elektrophoretische Ladungstrennung zur Anreicherung von positiven Ionen an der Flüssigkeitsoberfläche und somit zur Bildung einer Überschussladung (electrophoretic charging). Unter günstigen Bedingungen können ca. 50 % der negativen Ionen entfernt werden. Die Effizienz dieser Ladungstrennung (Entfernung der negativen Ionen) bestimmt die Größe des Elektrospray-Stromflusses I (ESI current).

Erzeugt wird dieser durch Redox-Reaktionen (Oxidation) an der Kapillar-Spitze, um den Verlust der positiven Überschussladung zu kompensieren und um damit den Ladungsfluss über die Gasphase aufrechtzuerhalten. Aus diesem Grund wird die Elektrosprayquelle als eine Art spezielle Elektrolysezelle beschrieben (electrolysis cell of a special kind).

Im weiteren Verlauf bildet sich durch die Abstoßung der positiv geladenen Ionen und dem Zug durch das hohe elektrische Feld ein Flüssigkeitskegel (Taylor Cone) aus, der sich entlang des elektrischen Feldes bewegt. Ab einem ausreichend hohen elektrischen Feld wird dieser Flüssigkeitskegel instabil und es bildet sich ein Flüssigkeitsstreifen mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern aus, dessen Oberfläche mit positiv geladenen Ionen angereichert ist. Dieser Flüssigkeitsstreifen wird im weiteren Verlauf instabil und bricht anschließend in kleine Tröpfchen auf. Die für diesen Prozess notwendige Kapillarspannung (V_{ON}) ist stark von der Oberflächenspannung des Lösungsmittels (γ) abhängig und kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$V_{\text{ON}} = 2 \times 10^5 (\gamma r_c)^{1/2} \ln(4d/r_c) \quad (4)$$

Je kleiner die gebildeten Tröpfchen sind, desto größer wird das Verhältnis von Tröpfchenoberfläche zum Tröpfchenvolumen. Ein großes Verhältnis begünstigt die Überführung der in Lösung vorliegenden Ionen in die Gasphase [46].

Am effektivsten werden kleine Tröpfchen bei kleinen Flussraten sowie unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln mit niedriger Dichte und Oberflächenspannung erzeugt.

Der Radius der gebildeten Tröpfchen steht mit der Dichte (ρ), der Flussrate (V_f) und der Oberflächenspannung (γ) des Lösungsmittels in folgender Beziehung (5):

$$R \propto (\rho V_f^2 \gamma)^{1/3} \quad (5)$$

1.4.3.2 Verkleinerung der geladenen Tröpfchen

Die primär bei der Elektrosprayionisation gebildeten Tröpfchen besitzen einen Radius von 1,5 μm und eine Ladung (Q) von 10^{-14} Coulomb. Dies entspricht einer Anzahl von ca. 50000 Einzelladungen (N). Durch die stattfindende Lösungsmittelverdampfung, welche durch die Zufuhr von Wärme beschleunigt werden kann, verringert sich der Radius dieser Tröpfchen so lange, bis die elektrostatischen Coulomb-Abstoßungskräfte zwischen den gleichgeladenen Ionen größer sind als die kohäsiven Kräfte des Lösungsmittels.

Es kommt schließlich zur Spaltung der Ausgangströpfchen (Parent droplets) durch eine sogenannte Coulombexplosion in kleinere Tröpfchen (Offspring droplets). Die notwendige Ladung (Q_R) für einen solchen Prozess ist von der Oberflächenspannung des Lösungsmittels (γ) und dem Tröpfchenradius (R_R) abhängig und kann nach der Rayleigh-Gleichung (6) berechnet werden. ϵ_0 ist die Dielektrizitätskonstante bei Vakuum.

$$Q_R^2 = 64 \pi^2 \epsilon_0 \gamma R_R^3 \quad (6)$$

Von jedem Ausgangströpfchen werden durch ungleichmäßige Spaltung (uneven fission) ca. 20 gleich große kleinere Tröpfchen (Offspring droplets) gebildet, deren

Radius ungefähr 1/10 des Ausgangströpfchens ist. Diese besitzen ca. 2 % der Masse aber 15 % der Ladung des Ausgangströpfchens.

1.4.3.3 Bildung von freien Gasphasenionen

Für die Beschreibung der Bildung von Gasphasenionen existieren zwei verschiedene Modelle, das Charged-residue-model (CRM) und das Ion-evaporation-model (IEM). Das erste Modell basiert auf der Bildung von extrem kleinen Tröpfchen mit einem Radius von ca. 1 nm, die nur noch 1 Ion enthalten. Die vollständige Verdampfung eines solchen Tropfens führt letztlich zur Bildung eines nackten Gasphasenions.

Das zweite Modell geht dagegen davon aus, dass bei einem Tröpfchenradius von ca. 10-20 nm Ionen direkt von der Tröpfchenoberfläche in die Gasphase emittiert werden. Aufgrund weiterführender Untersuchungen von Gamero-Castano et al. [47, 48] konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Gasphasenionen für kleine Moleküle auf Basis des IEM Mechanismus und die Bildung von Gasphasenionen für große Moleküle (z.B. Proteine) auf Basis des CRM Mechanismus am wahrscheinlichsten ist [49].

Im folgenden wird ausschließlich das IEM-Modell näher beschrieben, da es sich in dieser Arbeit um die Bestimmung von pharmakologisch wirksamen Substanzen mit niedrigen Molekulargewichten handelt, für die nach jetzigem Kenntnisstand das IEM-Modell am wahrscheinlichsten ist.

Iribarne und Thomson entwickelten eine Gleichung auf Basis des aktivierten Komplexes. Die Geschwindigkeitskonstante (k_i) für die Emittierung der Ionen von den Tröpfchen in die Gasphase kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$k_i = (k \times t) / h \exp(-\Delta G^\# / R \times T) \quad (7)$$

Dabei ist k die Boltzmann-Konstante, t die Zeit, T die absolute Temperatur des Tropfens, R die Gaskonstante, h die Plancksche Konstante und $\Delta G^\#$ die freie Aktivierungs-Enthalpie.

$\Delta G^\#$ stellt die Energiebarriere für die Überführung der Ionen in die Gasphase dar. Diese Energiebarriere setzt sich dabei aus den Anziehungskräften zwischen dem Ion und der polarisierbaren Oberfläche, die mit der Distanz schnell abnehmen und aus den über eine größere Distanz wirkenden Coulomb-Abstoßungskräften zwischen

dem Ion und den gleichnamigen Ladungen auf der Tröpfchenoberfläche, zusammen. ΔG^\ddagger wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\Delta G^\ddagger = -\Delta G_{\text{sol}}^0 + \Delta G^\ddagger(E) \quad (8)$$

ΔG_{sol}^0 ist die freie Solvationsenthalpie der Ionen, $\Delta G^\ddagger(E)$ repräsentiert die Abstoßungskräfte gleichgeladener Ionen auf der Tröpfchenoberfläche. $\Delta G^\ddagger(E)$ ist eine Funktion des elektrischen Feldes (E), das senkrecht zur Oberfläche der geladenen Tröpfchen steht. Da die elektrischen Ladungen symmetrisch über den gesamten Tropfen verteilt sind, kann (E) über das Coulombsche Gesetz durch folgende Gleichung hergeleitet werden. R ist der Radius des Tröpfchens.

$$E = Q / 4 \pi \epsilon_0 R^2 \quad (9)$$

Unter Betrachtung der beiden Gleichungen (8, 9) kann man erkennen, dass die Geschwindigkeitskonstante (k_i) aus Gleichung (7) durch eine Vergrößerung der Ladung (Q) zunimmt, eine Erhöhung des Tröpfchenradius (R) jedoch eine Abnahme verursacht.

Ausserdem hängt ΔG^\ddagger direkt von den individuellen Eigenschaften der Ionen ab. Es werden nicht die nackten Ionen in die Gasphase emittiert, sondern Lösungsmittel-Ionen-Cluster $M^+(\text{SL})_m$, da diese Cluster aufgrund eines niedrigeren ΔG_{sol}^0 eine viel niedrigere freie Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger benötigen. Z.B. sind für den Transfer von nackten Na^+ -Ionen in die Gasphase 98 kcal/mol notwendig (wässrige Lösung), während sich dieser Energiebetrag für $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_7$ Lösungsmittel-Cluster auf 56 kcal/mol verringert. Unter Berücksichtigung des Radius (r) der Lösungsmittel-Ionen-Cluster und der Oberflächenspannung des Lösungsmittels kann durch Gleichung (10) die freie Lösungsenthalpie von Lösungsmittel-Ionen-Cluster $M^+(\text{SL})_m$ berechnet werden. e ist die Elementarladung.

$$-\Delta G_{\text{sol}}^0 = 4 \pi \gamma r^2 + e^2 / 4 \pi \epsilon_0 2 r \quad (10)$$

Anhand dieser Gleichung kann man erkennen, dass kleine Lösungsmittel-Ionen-Cluster $M^+(SL)_m$ in Verbindung mit einem Lösungsmittel niedriger Oberflächenspannung, niedrige freie Solvationsenthalpien besitzen. Daraus resultiert unter Betrachtung von Gleichung (8) eine niedrigere freie Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger , was zu einer höheren Überföhrungseffizienz der Ionen in die Gasphase föhrt.

1.4.3.4 Linearität, Signalsuppression

Bei der ESI werden Tröpfchen mit einer Überschussladung [Q] an der Oberfläche gebildet. Die erzeugte Überschussladung ist eine Konstante mit einem Wert von ca. 10^{-5} mol/l. [Q] setzt sich aus der Summe aller geladenen Ionen auf der Tröpfchenoberfläche zusammen. Für den Fall eines einzelnen Analyten A^+ und eines Elektrolyten E^+ (Puffer) lässt sich [Q] nach folgender Gleichung beschreiben:

$$[Q] = [A^+]_s + [E^+]_s \quad (11)$$

$[A^+]_s$ = Konzentration des Analyten A^+ auf der Tröpfchenoberfläche
 $[E^+]_s$ = Konzentration des Elektrolyten E^+ auf der Tröpfchenoberfläche

Die Gleichung lässt erkennen, dass es unter den Ionen zur Konkurrenz um die begrenzte Überschussladung an der Tröpfchenoberfläche kommt, wenn die Gesamtionenkonzentration im Tröpfchen [Q] überschritten wird. Unter der Annahme, dass der gemessene Response des Analyten A^+ proportional zu seiner Konzentration auf der Tröpfchenoberfläche $[A^+]_s$ ist, wurde folgende Gleichung entwickelt:

$$\text{Signal}_{A^+} = P \cdot f \frac{K_A C_A}{K_A C_A + K_E C_E} \cdot [Q] \quad (12)$$

Dabei sind K_A und K_E die Gleichgewichtskonstanten für die Verteilung der Ionen zwischen der äußeren Oberfläche und dem Inneren des Tröpfchens. Der Faktor P stellt die Effizienz des Massenspektrometers dar, die gebildeten Gasphasenionen aufzunehmen, f gibt die Überföhrungseffizienz der Ionen in die Gasphase an. C_A und C_E sind die Konzentrationen des Analyten sowie des Elektrolyten. Diese Gleichung besitzt jedoch ihre Gültigkeit nur für Analytkonzentrationen $\geq 10^{-5}$ mol/l.

Eine Funktion, mit der es möglich ist, einen größeren Konzentrationsbereich zu beschreiben, besitzt folgende Form:

$$[A^+]_s^2 \left(\frac{K_A}{K_E} - 1 \right) - [A^+]_s \left([Q] \left(\frac{K_A}{K_E} - 1 \right) + C_A \frac{K_A}{K_E} + C_E \right) + C_A [Q] \frac{K_A}{K_E} = 0 \quad (13)$$

Mittels dieser Gleichung kann die Response-Funktion eines einfach geladenen Ions bei unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen C_A in Kombination mit unterschiedlichen Elektrolytgehalten C_E sowie unterschiedlichen K_A/K_E – Verhältnissen (K) bei konstantem $[Q]$ berechnet werden. Die Ergebnisse sind in den beiden Abb. 10 u. 11 dargestellt.

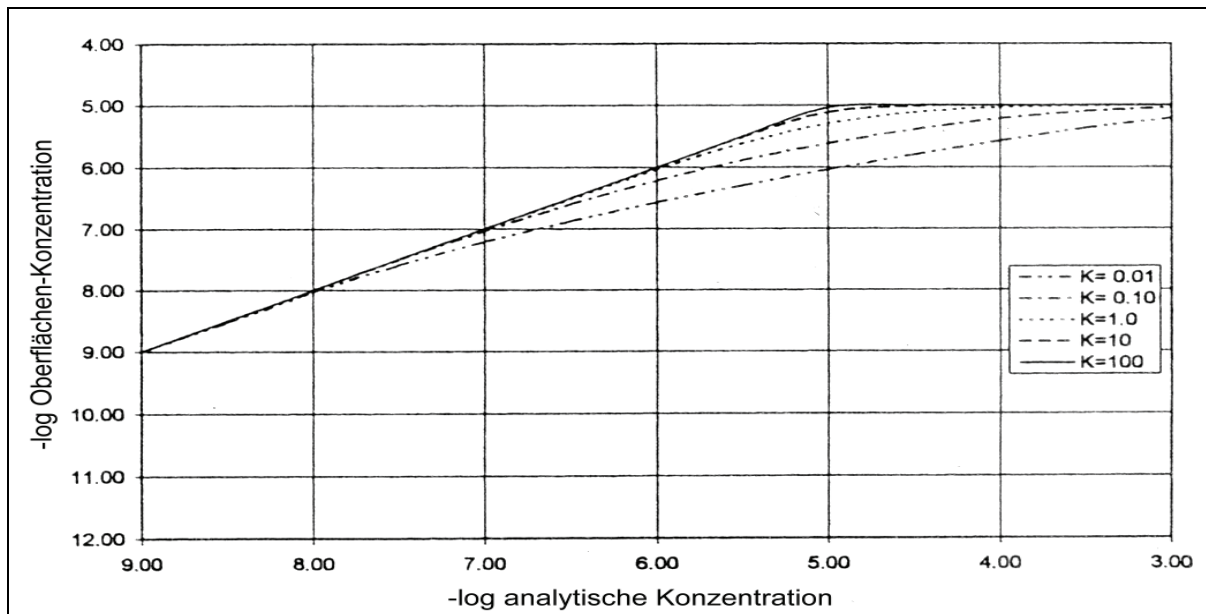


Abb. 10: Response Funktion für einen einfach geladenen Analyten und einen einfach geladenen Elektrolyten (Puffer). $[Q] = 10^{-5}$ mol/l, $C_E = 10^{-5}$ mol/l und $K_A/K_E = 0,01 - 100$ (entnommen aus [42]).

Abb.10 zeigt, dass bei sehr kleinen Analytkonzentrationen (10^{-9} M – 10^{-8} M) alle Ionen Teil der Überschussladung an der Tröpfchenoberfläche sind, unabhängig von dem Verhältnis K_A/K_E . In diesem Fall werden alle Analytionen in die Gasphase überführt.

Dieser Bereich entspricht der höchsten Messempfindlichkeit. Die Auswirkungen unterschiedlicher Verhältnisse von K_A zu K_E kann man an der Krümmung der Kurve

zwischen dem niedrigsten Konzentrationsbereich und dem höchsten Konzentrationsbereich „Sättigungsregion“ erkennen.

Für niedrige K_A/K_E -Werte ist der Effekt am stärksten ausgeprägt, während für K_A/K_E -Werte größer als 1 die Oberflächenkonzentration solange gleich der analytischen Konzentration ist, bis der Wert von $[Q]$ erreicht wird.

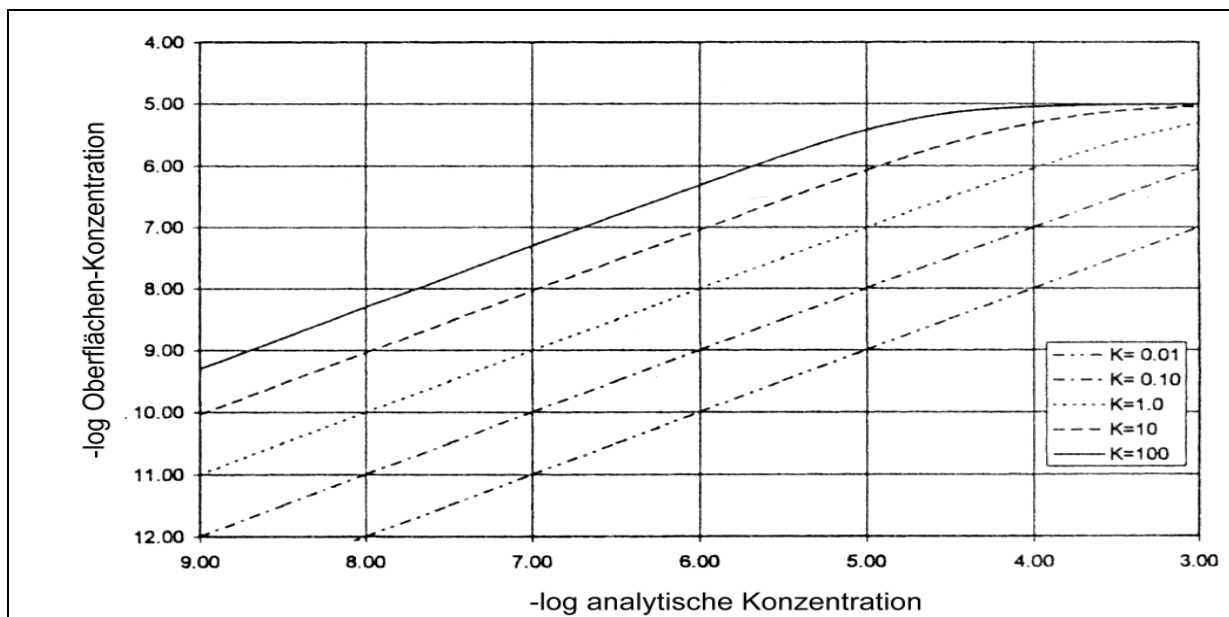


Abb. 11: Response Funktion für einen einfach geladenen Analyten und einen einfach geladenen Elektrolyten (Puffer). $[Q] = 10^{-5}$ mol/l, $C_E = 10^{-3}$ mol/l und $K_A/K_E = 0,01 - 100$ (entnommen aus [42]).

Der Effekt, welcher durch eine Erhöhung der Elektrolytkonzentration verursacht wird, ist in Abb. 11 dargestellt. Wenn die Konzentration des Elektrolyten über den minimalen Wert von $[Q]$ (10^{-5} mol/l) erhöht wird, führt dies zu einer starken Unterdrückung der Empfindlichkeit (Signalsuppression) bei allen gemessenen Konzentrationen und K_A/K_E -Werten. Bedeutend ist dabei, dass diese Signalsuppression bei niedrigen K_A/K_E -Werten infolge der niedrigen Oberflächenaktivität des Analyten am stärksten und bei den hohen K_A/K_E -Werten wegen der hohen Oberflächenaktivität des Analyten am niedrigsten ausgeprägt ist.

Diese Signalsuppression hat für die praktische Anwendung der LC-MS-Technik große Bedeutung. Prinzipiell sollten HPLC-Eluenten mit niedrigen Puffergehalten verwendet werden, um eine maximale Messempfindlichkeit zu erzielen.

Darüber hinaus können niedermolekulare, koeluiierende Matrixkoextraktive mit hohen K-Werten (hohe Oberflächenaktivität) ebenfalls zu den oben beschriebenen Signalsuppression führen^a. Diese sogenannten Matrixeffekte auf Seiten der ESI führen zwangsläufig zu Quantifizierungsfehlern, wenn die zu messenden Substanzen in biologischen Matrices mittels extern erstellter Kalibriergeraden quantifiziert werden. Deshalb ist es bei der Methodenentwicklung von größter Wichtigkeit, mögliche Matrixeffekte zu identifizieren und Lösungswege für deren Kompensation zu finden.

1.4.3.5 Protonen-Transferreaktionen

Im Anschluss an die Gasphasenionisation des Analyten kann es zwischen diesem und anderen Verbindungen (Lösungsmittel, koeluiierende Matrixkoextraktive) in Abhängigkeit von den jeweiligen Gasphasenbasizitäten zu Protonentransferreaktionen kommen. Diese führen zu einer Veränderung des ursprünglichen Ladungszustandes des Analyten.

Hierzu wurden von Ikonomou et al. [37] Untersuchungen an zwei basischen Modellsubstanzen durchgeführt. 4-Methoxyanilin wurde mittels ESI zum [4-Methoxyanilin+H]⁺ ionisiert, während gleichzeitig Tripropylamin in die Gasphase des ESI-Interface zugegeben wurde. Es zeigte sich, dass Tripropylamin, das eine höhere Gasphasenbasizität (226 kcal/mol) als 4-Methoxyanilin (206 kcal/mol) besitzt, in der Lage war, Protonen von [4-Methoxyanilin+H]⁺ zu abstrahieren. Als Konsequenz wurde das Signal von [4-Methoxyanilin+H]⁺ unterdrückt, während die Bildung von [Tripropylamin+H]⁺ stark zunahm. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Amad et al. [50] erhalten, die den Einfluss verschiedener Lösungsmittel (Wasser, Methanol) auf den Analytresponse von 2,2,2-Trifluorethanol untersuchten.

In der analytischen Praxis können niedermolekulare koeluiierende Matrixkoextraktive, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Signalsuppressionen, in Abhängigkeit ihrer relativen Gasphasenbasizitäten aufgrund von Protonentransferreaktionen Signalerhöhungen oder Signalsuppressionen verursachen.

Analog zu den unter 1.4.3.4 beschriebenen Signalsuppressionseffekten ist es deshalb notwendig, diese Effekte bei der Methodenentwicklung zu identifizieren und Lösungswege für deren Kompensation zu finden.

^a Beispiel: (n-pentyl)₄N⁺ (Pen₄N⁺) ist in der Lage, die Ionisierung von (ethyl)₄N⁺ (Et₄N⁺) zu unterdrücken. Der Grund liegt in der deutlich höheren Oberflächenaktivität von (Pen₄N⁺) im Vergleich zu (Et₄N⁺) [40].

1.5 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Die Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht im Vergleich zur einfachen Massenspektrometrie (Single MS) eine hochselektive und sensitive Detektion von Verbindungen in komplexen Matrices.

Als Geräte kommen hierzu entweder Triple-Quadrupol Massenspektrometer (Triple-Quad, QQQ) oder Ion-Trap (IT) Massenspektrometer zum Einsatz, die in der Regel an ein chromatographisches Trennsystem (HPLC, GC) gekoppelt sind [51, 52]. Das MS/MS Prinzip ist in Abb. 12 für einen Triple-Quadrupol Massenspektrometer, der an eine HPLC gekoppelt ist, schematisch dargestellt. Die Ionisation erfolgt mittels ESI.

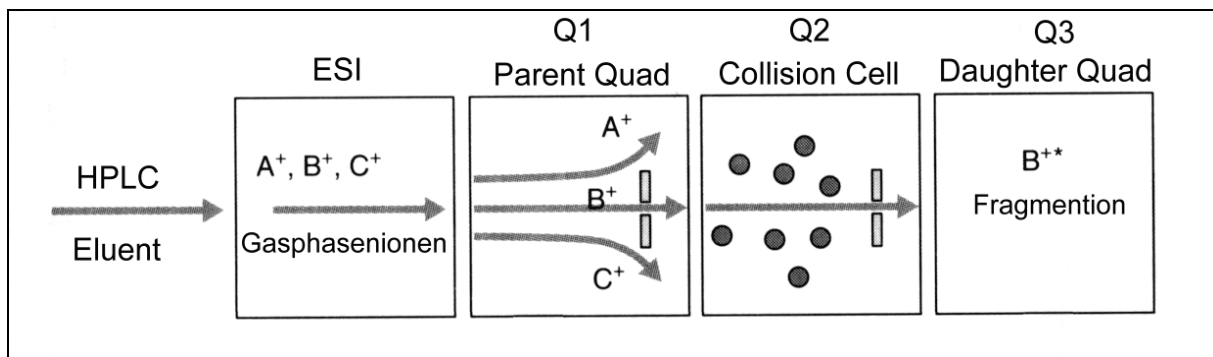


Abb. 12: Schematische Darstellung des MS/MS Prinzips für einen Triple-Quadrupol Massenspektrometer

Nach der chromatographischen Trennung und der ESI werden aus dem Vielkomponentengemisch von Gasphasenionen die Ionen der zu messenden Verbindungen mithilfe des ersten Quadrupols Q1 (Parent Quad) selektiert und über eine mit Kollisionsgas (z.B. Argon) gefüllte Zwischenzone, die sogenannte Kollisionzelle Q2 (Collision Cell), in den zweiten Quadrupol Q3 (Daughter Quad) geleitet und analysiert. Die Kollisionzelle ermöglicht die gezielte Fragmentierung der im Quadrupol Q1 ausgewählten Ionen durch Stoßaktivierung (Collision Induced Dissociation, CID) zu Tochterionen (Daughter ions). Die für den Zusammenstoß notwendige kinetische Energie kann durch die an die Kollisionzelle angelegte Offset-Spannung gesteuert werden. Niedrige Spannungen führen zu einer weniger starken Fragmentierung und umgekehrt.

Die beiden Quadrupole Q1 und Q3 können dabei auf drei verschiedene Weisen Spektren aufnehmen:

1. Product ion scan: Das Q1 wird auf eine bestimmte Parent Masse m_p fixiert und das Q3 misst den Massenbereich von 1 bis m_p . Das auf diese Weise registrierte Fragmentierungsmuster von m_p ermöglicht die Identifizierung von m_p .
2. Precursor ion scan: Mit dem Q1 wird der gesamte Massenbereich registriert, während das Q3 auf eine konstante Masse eingestellt ist. Dies ermöglicht die Identifizierung identischer Strukturen aus allen m_p Massen (diese Technik ist nicht auf Ion-Trap Systemen möglich).
3. Neutral loss: Das Q1 registriert die Analytmassen um Δm versetzt zu Q3. Hierdurch wird die Abspaltung von Neutralteilchen der Masse Δm ermittelt.

Die höchste Sensitivität und Selektivität wird bei Triple Quadrupol sowie Ion-Trap Systemen im nicht scannenden multiple reaction monitoring (MRM) Modus erzielt. Dieser Modus kann als ein zweidimensionales Gegenstück zum *selected ion monitoring* (SIM) bei Mono Quadrupol Massenspektrometern aufgefasst werden. Beim MRM wird das Q1 auf eine bestimmte Parent Masse m_p fixiert und das Q3 registriert nur einzelne diagnostische Fragmentationen. Der MRM Modus ist das geeignete Verfahren, um Zielanalyten aus komplexen Matrices zu identifizieren und zu quantifizieren [53].

1.6 Anforderungen der EU an die Analytik von pharmakologisch wirksamen Substanzen mittels LC-MS/MS

Für die Analytik von pharmakologisch wirksamen Rückständen in Proben, die gemäß der Richtlinie 96/23EG von lebensmittelliefernden Tieren genommen werden, wurden EU-weit geltende Anforderungen in der Kommissionsentscheidung 2002/657/EC gesetzlich festgelegt. Der Geltungsbereich erstreckt sich auf akkreditierte, amtliche Kontrolllaboratorien. Es gilt dabei ein Kriterienansatz, der Leistungsmerkmale und Kriterien vorgibt, die von der verwendeten Methode erfüllt werden müssen. Die vier wichtigsten Anforderungen an die Validierung von LC-MS/MS-Methoden sind folgende:

1. Für die massenspektrometrische Bestätigung von Stoffen in Gruppe B von Anhang I der Richtlinie 96/23/EG (zugelassene Substanzen) müssen mindestens 3 Identifizierungspunkte (IP's) erzielt werden. Unter Verwendung

des MRM Modus können für die Parentmasse, die in Q1 fixiert wird, ein Punkt und für jedes weitere in Q3 gemessene diagnostische Fragmention jeweils 1,5 Punkte gerechnet werden. Dabei muss mindestens ein Fragmentionenintensitätsverhältnis gemessen werden, welches eine zulässige Höchsttoleranz, die von der relativen Intensität abhängt, nicht überschreitet.

2. Die Mindestretentionszeit eines Analyten muss mindestens das Zweifache der Retentionszeit des Totvolumens sein. Ferner muss die Retentionszeit des Analyten in Matrix mit einer Toleranz von $\pm 2,5 \%$ der des Kalibrierstandards entsprechen.
3. Eine Validierung ist nach unterschiedlichen Verfahrensweisen möglich. Sie kann mittels konventioneller oder mittels alternativer Validierungsverfahren durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die konventionelle Vorgehensweise gewählt. Nach den Vorgaben der Kommissionsentscheidung 2002/657/EG (MRL Substanzen) müssen hiernach für quantitative Methoden die Wiederholbarkeit SD_R , die laborinterne Reproduzierbarkeit SD_{WIR} und die Wiederfindung WDF für folgende Konzentrationen bestimmt werden: 0.5, 1.0 und 1.5 x MRL (n=6 je Konzentrationsniveau). In Abhängigkeit der Analyt-Konzentration sind die zu erreichenden prozentualen Richtigkeiten (trueness) und Präzisionen (Variationskoeffizienten %) vorgeschrieben.
4. In der Kommissionsentscheidung 2002/657/EG sind die Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen für die Beurteilung der Leistungsfähigkeit einer Methode nicht mehr maßgeblich. Die Beurteilung der Proben findet über die Entscheidungsgrenze ($CC\alpha$) und das Nachweisvermögen ($CC\beta$) statt. Der $CC\alpha$ -Wert stellt bei erlaubten Substanzen den Grenzwert dar, bei dem mit 95%iger Wahrscheinlichkeit falsch positive Befunde ausgeschlossen werden können. Der $CC\beta$ -Wert dient dem Ausschluss falsch negativer Befunde mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%. Bei verbotenen Substanzen beträgt der α -Fehler 1 %, der β -Fehler 5%.

Analysenergebnissen, die gleich oder über dem $CC\alpha$ -Wert liegen, ist die Probe zu beanstanden. Der $CC\alpha$ - und $CC\beta$ -Wert werden durch das Kalibrierkurvenverfahren in Analogie zur ISO 11843 bestimmt.

1.7 LC-MS-Analytik der β -Lactame und Aminoglycoside

Neben mikrobiellen Verfahren (Hemmstofftest), mikrobiellen Rezeptortests (Charm II-Test), Enzym Immunoassays (ELISA), dünnenschichtchromatographischen Methoden (DC), kapillarelektrophoretischen Methoden (CE), flüssig-chromatographischen Methoden (HPLC) sowie gaschromatographischen Methoden (GC) für die β -Lactame und die Aminoglycoside, auf welche hier nicht näher eingegangen werden soll, sind in den letzten Jahren eine ganze Reihe von LC-MS-Methoden für diese Substanzen publiziert worden. Diese Arbeiten werden im folgenden näher beschrieben.

1.7.1 β -Lactame

Seit 1989 wurden insgesamt 25 Arbeiten zur Analytik von β -Lactamen publiziert. Siebzehn von diesen Verfahren wurden für Milch, sieben für tierische Gewebe und eine für Milch und Gewebe entwickelt. Als Ionisationsverfahren hat sich allgemein die ESI durchgesetzt. Lediglich in älteren Publikationen wurde noch die Thermosprayionisation beschrieben.

Bei den neueren Publikationen ist ein deutlicher Trend in Richtung der Geräte mit MS/MS Möglichkeiten (Triple-Quad, IT) zu erkennen. Darüber hinaus wurde das erfasste Substanzspektrum im Laufe der Zeit auf bis zu 11 β -Lactame in Milch und 12 β -Lactame in Gewebe erweitert. Für das Cephalosporin Ceftiofur wurden bis jetzt ausschließlich LC-MS/MS-Methoden für die Muttersubstanz publiziert. Die für die Überwachung der Höchstmengen relevanten Metabolite wurden jedoch nicht berücksichtigt.

Für die chromatographische Trennung der β -Lactame kamen ausschließlich Reversed-Phase HPLC-Säulen zum Einsatz. Die Arbeiten zur LC-MS-Bestimmung von β -Lactamen sind in den Tabellen 5, 6, 7 als Übersicht zusammengefasst.

Tab. 5: Ausgewählte LC-MS-Verfahren zur Rückstandsanalytik von β -Lactamen in Milch

Literatur (Jahr)	Technik	β -Lactam	Extraktion/Aufreinigung	Leistungsfähigkeit (*)
[54] (1989)	Single-MS/TSP	Pen G	Ultrafiltration (10000 Da)	100 ppb
[55] (1991)	Single-MS/TSP	Ceph, Dceph	Ultrafiltration (10000 Da)	100 ppb (Ceph), 500 ppb (Dceph)
[56] (1991)	Single-MS/TSP	Amp, Amox, Clox	Ultrafiltration (10000 Da)	100 ppb (Clox), 200 ppb (Amox, Amp)

Fortsetzung Tab. 5

[57] (1993)	Single-MS/ TSP	Ceft, DFC	Ultrafiltration (10000 Da)	50 ppb (Ceft)
[58] (1993)	Single-MS/ ESI	Pen G, Amox, Amp, Clox, Ceph	Ultrafiltration (10000 Da)	100 ppb
[59] (1994)	Single-MS/ TSP	Pen G	Extraktion mit Natrium-Wolframat, SPE (C18)	5 ppb
[60] (1994)	Single-MS/ US-ESI	Pen G, Amox, Amp, Ceph, Clox, Ceft	Ultrafiltration (10000 Da)	20-30 ppb (Amox, Amp), 10 ppb (Pen G, Ceph, Clox, Ceft)
[61] (1994)	Single-MS/ ESI	Pen G, Amox, Amp, Clox, Ceph, Ceft	Ultrafiltration (10000 Da)	Keine Angabe
[62] (1998)	Ion-Trap-MS/ ESI	Ceft	Ultrafiltration (10000 Da)	10 ppb (Ceft)
[63] (1998)	Ion-Trap-MS/ ESI	Pen G, Amox, Amp, Clox, Ceph, Cfzn, Ceft	ACN-Extraktion, SPE (C18 und Polymerphase)	5 ppb (Pen G), 10 ppb (Amox, Amp, Clox, Ceph, Cfzn, Ceft)
[64] (1999)	Ion-Trap-MS/ ESI	Ceft	ACN-Extraktion	2 ppb (Ceft)
[31] (2000)	Ion-Trap-MS/ ESI	Ceph, Dceph	ACN-Extraktion, SPE (C18)	1 ppb (Ceph) <i>(Bestimmungsgrenze)</i>
[65] (2000)	Triple-Quad-MS/ ESI	Pen G, Amox, Amp, Cephalex, Ceph, Cfzn, Ceft, Oxa, Clox, Diclox, Naf	ACN-Extraktion	1,5 ppb (Oxa), 2,5 ppb (Naf), 3 ppb (Pen G, Clox, Diclox, Ceft), 4 ppb (Amp), 10 ppb (Cephalex), 12 ppb (Cfzn), 15 ppb (Ceph), 25 ppb (Amox)
[66, 67] (2001)	Triple-Quad-MS/ ESI	Pen G, Amox, Amp, Oxa, Clox, Cephal	Phosphatpuffer- Extraktion SPE (C18)	0,4 ppb (Amox, Oxa), 0,5 ppb (Amp, Pen G), 1 ppb (Clox)
[68] (2001)	Single-MS/ ESI	Pen G, Amox, Amp, Cephalex, Ceph, Ceft, Oxa, Clox, Diclox, Naf	SPE (Graphit- phase)	0,4 ppb (Cephalex), 0,5 ppb (Ampi, Pen G), 0,6 ppb (Ceph, Clox), 0,7 ppb (Amox, Oxa), 1 ppb (Ceft), 2 ppb (Naf), 3 ppb (Diclox), <i>(Bestimmungsgrenze)</i>
[32] (2002)	Ion-Trap-MS/ ESI	Pen G, PenV, Amox, Amp, Ceft, Ceph, Clox	ACN-Extraktion, SPE (Polymerphase)	0,2 ppb (Amp), 0,4 ppb (Ceft), 0,8 ppb (Ceph), 1 ppb (Amox, Pen G), 2 ppb (Clox, PenV),

(*) die Leistungsfähigkeit entspricht der angegebenen Nachweisgrenze. Abweichungen hiervon sind in der Tabelle direkt gekennzeichnet

Tab. 6: Ausgewählte LC-MS-Verfahren zur Rückstandsanalytik von β -Lactamen in tierischen Geweben

Literatur (Jahr)	Technik	β -Lactam	Extraktion/Aufreinigung	Leistungsfähigkeit (*)
[69] (1994)	Single-MS/ Partikel-Beam	Oxa, Clox, Diclox	Extraktion mit THF und Ethylacetat	40 ppb (Oxa) 50 ppb (Clox, Diclox)
[70] (1996)	Single-MS/ ESI	Amp	Extraktion mit Ammoniumacetatpuffer, SPE (C18)	50 ppb (Bestimmungsgrenze)
[71] (1998)	Single-MS/ ESI	Pen G, Pen V, Clox, Diclox	Extraktion mit Trichloressigsäure, SPE (Polymerphase)	25 ppb (Pen G) 20 ppb (Pen V) 40ppb (Clox) 60 ppb (Diclox) (Bestimmungsgrenze)
[72] (2000)	Triple-Quad-MS/ ESI	Amox	Extraktion mit Trichloressigsäure, Derivatisierung mit Formaldehyd	1,2 ppb (Bestimmungsgrenze)
[73] (2001)	Triple-Quad-MS/ ESI	Pen G, Pen V, Oxa, Clox, Diclox, Naf	Extraktion mit Natrium-Wolframat, SPE (C18), SPE (Anionenaustauscher)	50 ppb (alle β -Lactame)
[74] (2002)	Triple-Quad-MS/ ESI	Amox, Amox-Metabolite	Extraktion mit Trichloressigsäure SPE (Polymerphase)	2,3 – 12,0 ppb (Amox)
[33] (2003)	Ion-Trap-MS/ ESI	Amox, Amp, Pen G, Pen V, Oxa, Clox, Diclox, Naf, Ceph, Dceph, Cfn, DFC-cysteindisulfid (DCCD)	ACN-Extraktion, SPE (C 18)	10 ppb (Ceph, Amp, Cefzn, Pen G, Oxa, Clox, Naf) 10-50 ppb (Dceph) 50-100 ppb (Amox) 100-500 ppb (Diclox) 500 ppb (DCCD)

(*) die Leistungsfähigkeit entspricht der angegebenen Nachweisgrenze. Abweichungen hiervon sind in der Tabelle direkt gekennzeichnet

Tab. 7: Ausgewählte LC-MS-Verfahren zur Rückstandsanalytik von β -Lactamen in tierischen Geweben und Milch

Autor (Jahr)	Technik	β -Lactam	Extraktion/Aufreinigung	Leistungsfähigkeit (*)
[75] (1994)	Single-MS/ ESI	Pen G, Pen V, Oxa, Clox, Diclox, Naf	Fällung der Proteine mit ACN. Extraktion mit Dichlormethan.	Milch: 2 ppb (Pen G, Oxa) 5 ppb (Pen V, Clox) 10 ppb (Diclox) Gewebe: 25 ppb (Pen G, Oxa) 50 ppb (Pen V, Clox) 100 ppb (Diclox)

(*) die Leistungsfähigkeit entspricht der angegebenen Nachweisgrenze.

1.7.2 Aminoglycoside

Für die Analytik von Aminoglycosiden wurden deutlich weniger LC-MS-Verfahren beschrieben als für die β -Lactame. Insgesamt wurden seit 1992 vier Verfahren für tierische Gewebe und zwei für Milch beschrieben. Alle Verfahren verwenden als Ionisierungstechnik, analog zu den β -Lactam-Verfahren, die ESI. In Bezug auf die Chromatographie ist für alle Verfahren die Ionenpaarchromatographie charakteristisch, die jedoch für die Effizienz der ESI als unvorteilhaft zu bewerten ist. Die Arbeiten zur LC-MS-Bestimmung von Aminoglycosiden sind in den Tabellen 8 u. 9 als Übersicht zusammengefasst.

Tab. 8: Ausgewählte LC-MS-Verfahren zur Rückstandsanalytik von Aminoglycosiden in Milch

Autor (Jahr)	Technik	Aminoglycosid	Extraktion/Aufreinigung	Leistungsfähigkeit (*)
[76] (1998)	Ion-Trap-MS/ESI	Spec	SPE (C 18, Ionenpaar)	50-100 ppb
[77] (2000)	Ion-Trap-MS/ESI	Gent, Neomycin	Extraktion mit Salzsäure, SPE (Kationenaustauscher, CBA)	30 ppb (Bestimmungsgrenze)

(*) die Leistungsfähigkeit entspricht der angegebenen Nachweisgrenze. Abweichungen hiervon sind in der Tabelle direkt gekennzeichnet

Tab. 9: Ausgewählte LC-MS-Verfahren zur Rückstandsanalytik von Aminoglycosiden in tierischen Geweben

Autor (Jahr)	Technik	Aminoglycosid	Extraktion/Aufreinigung	Leistungsfähigkeit (*)
[78] (1992)	Triple-Quad-MS/ESI	Spec, Str, Dhs, Hygromycin	MSPD (Cyanopropyl)	20 ppm
[34] (1994)	Triple-Quad-MS/ESI	Spec, Neomycin, Str, Dhs, Gent, Tobramycin	MSPD (Cyanopropyl)	30 ppb (Gent) 60 ppb (Neomycin) 100 ppb (Dhs) 130 ppb (Str) 340 ppb Hygromycin) 520 ppb (Spec)
[79] (1998)	Triple-Quad-MS/APCI	Spec	Extraktion mit Trichloressigsäure, SPE (Kationenaustauscher, CBA)	50 ppb
[80] (2000)	Ion-Trap-MS/ESI	Gent	Extraktion mit Trichloressigsäure, SPE (Kationenaustauscher, CBA)	0,5-2,5 ppb

(*) die Leistungsfähigkeit entspricht der angegebenen Nachweisgrenze.

1.8 Zielsetzung

In der VO (EWG) 2377/90 sind für insgesamt 17 β -Lactame (acht Penicilline und neun Cephalosporine) sowie sieben Aminoglycoside Höchstmengen (MRL's) festgesetzt. Damit durch die amtliche Lebensmittelüberwachung oder Handelslaboratorien eine sichere Überwachung für diese hohe Anzahl von Wirkstoffen gewährleistet werden kann, müssen diese über validierte, leistungsfähige analytische Methoden verfügen.

Es war deshalb das Ziel dieser Arbeit für die genannten Antiinfektiva effiziente LC-MS/MS-Multimethoden zu entwickeln, die in der Lage sind, ein möglichst großes Spektrum dieser Wirkstoffe simultan erfassen zu können. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit sollten für diese Methoden ausschließlich einfache und schnell durchführbare Probenaufarbeitungen zum Einsatz kommen.

Die Gruppe der β -Lactame (Penicilline, Cephalosporine) sollten zusammen in einer einzigen LC-MS/MS-Multimethode gemessen werden. Lediglich das Cephalosporin Ceftiofur kann aufgrund seiner besonderen pharmakologischen Eigenschaften, wie der vollständigen Metabolisierung sowie der kovalenten Bindung der aus dieser Verbindung gebildeten Metabolite an Proteine und den daraus resultierenden besonderen Anforderungen an die Probenvorbereitung, nicht in eine Multimethode für β -Lactame integriert werden. Für diese Verbindung ist es deshalb notwendig, eine spezielle LC-MS/MS-Monomethode zu entwickeln ist.

Für die Analytik der Aminoglycoside war es neben der Entwicklung einer einfachen Probenaufarbeitung von hoher Relevanz, ein neuartiges chromatographisches Verfahren für die hochpolaren polykationischen Aminoglycoside unter Einsatz der „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographie“ HILIC zu entwickeln, das im Gegensatz zu allen bisher publizierten LC-MS-Verfahren auf den Einsatz der für die Elektrosprayionisation problematischen flüchtigen fluorierten Carbonsäuren verzichtet.

Obwohl es mit der LC-MS/MS-Technik aufgrund der hochselektiven MS/MS-Detektion möglich ist, Verbindungen selbst bei Anwesenheit großer Mengen an Matrixkoextraktiven ohne störende Interferenzen zu messen, können jedoch diese für den Analytiker „ungesehenen“ Matrixkoextraktive die Ionisation der Verbindungen stark beeinflussen. Diese als Matrixeffekte bezeichneten Auswirkungen auf die ESI (Signalschwächungen, Signalerhöhungen), die zu großen Quantifizierungsfehlern führen können, sollten bei der Methodenentwicklung genau untersucht werden.

Die Validität der entwickelten Methoden sollte den gesetzlich festgelegten Vorgaben der Kommissionsentscheidung 2002/657/EC entsprechen, die konkrete Leistungsmerkmale und Leistungskriterien vorgibt.

Die Praxistauglichkeit der entwickelten LC-MS/MS-Methoden sollte an authentischen, im Charm II-Test für β -Lactame und Aminoglycoside positiven Proben mit gewachsenen Rückständen angewendet werden. Dabei war zu prüfen, ob die positiven Screening-Befunde bestätigt werden können.

Ein weiteres Ziel sollte es sein, die zu entwickelnde LC-MS/MS-Monomethode für Ceftiofurrückstände an Milchproben zu überprüfen, die von einer mit Ceftiofurhydrochlorid (Excenel[®] RTU) behandelten Kuh stammen. Diese LC-MS/MS-Ergebnisse sollten mit bereits publizierten Ergebnissen aus einer Studie zum Ausscheidungsverhalten von Ceftiofur in Milch auf ihre Plausibilität geprüft werden.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Apparativer Aufbau des verwendeten LC-MS/MS-Systems

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Messsystem handelt es sich um ein Triple-Quadrupol Massenspektrometer (TSQ 7000) der Firma Thermo Finnigan mit Tandem-MS-Möglichkeit (MS/MS), das direkt mit dem HPLC-System (Agilent 1100) der Firma Agilent Technologies verbunden ist. Mit diesem Messsystem ist es möglich, die in dieser Arbeit zu untersuchenden Antiinfektiva zu quantifizieren und zugleich massenspektrometrisch nach den Anforderungen der EU zu bestätigen. Alle in diesem Versuchsaufbau gezeigten Geräte werden einheitlich mittels eines Computers durch die Geräte-Software Xcalibur (Thermo Finnigan) zentral gesteuert. Der schematische Aufbau des verwendeten LC-MS/MS-Systems ist in Abb.13 dargestellt.

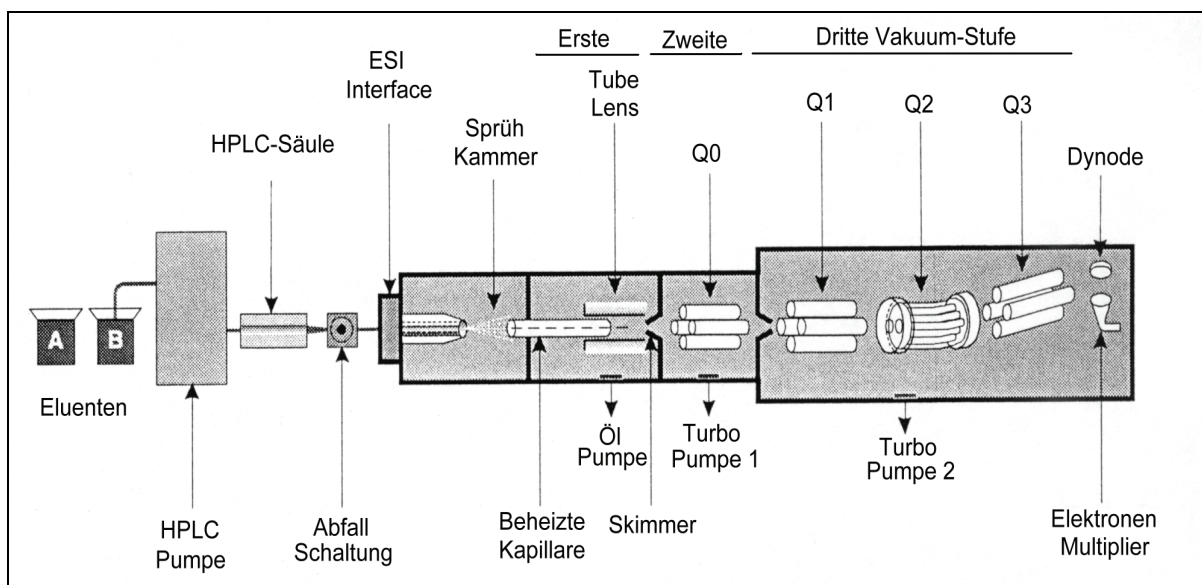


Abb. 13: Schematischer Aufbau des LC-MS/MS-Systems

Mittels des HPLC-Systems werden die zu analysierenden Verbindungen auf Narrow-Bore Säulen mit 2 mm Innendurchmesser chromatographiert und der Eluent direkt in das ESI-Interface des Massenspektrometers geleitet. Diese Einleitung ist zeitgesteuert durch die Abfall-Schaltung (Divert valve) möglich, um die Verschmutzung des Massenspektrometers zu minimieren.

Die Überführung der in der Sprühkammer erzeugten Gasphasenmolekülonen in die erste Vakuumstufe, mit einem Druck von ca. 1 Torr, findet durch eine beheizte Kapillare mit einem Innendurchmesser von 0,46 mm statt. Diese Kapillare ist bis zu

400°C beheizbar, um den starken Abkühlungseffekt des in das Vakuum expandierenden Gasgemisches aus Lösungsmitteln und Stickstoff zu kompensieren. Ohne eine Heizung würde es zur Bildung von Ionen-Lösungsmittelclustern kommen, die so groß sein können, dass sie außerhalb des Massenbereiches des Massenspektrometers fallen [26].

Im Anschluss daran wird der erzeugte Ionenstrahl (Ion beam) durch die Tube Lens fokussiert und durch den Skimmer in die zweite Vakuumstufe überführt. Die weitere Ionenstrahlführung und Fokussierung in den Bereich des Hochvakuums (Dritte Vakuumstufe, 10^{-6} Torr) wird durch das nicht scannende Quadrupol Q0 (Ion Guide) realisiert. In diesem Bereich kann entweder die einfache Massenanalyse (Single MS) oder die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) durchgeführt werden (s. 1.5). Die Intensitätsmessung (Ion Counting) findet durch den Elektronenmultiplier im Anschluss an die Massenspektrometrie statt.

2.2 LC-MS/MS-Multimethodenentwicklung für die quantitative Bestimmung von 15 β -Lactamen (Penicilline und Cephalosporine) in Milch, Muskel und Niere von Rindern

2.2.1 Optimierung der chromatographischen Trennung (HPLC)

Bei der HPLC-MS-Kopplung müssen hinsichtlich der verwendeten Eluenten besondere Anforderungen berücksichtigt werden. Die Verwendung nichtflüchtiger Puffer oder Ionenpaarreagentien, wie sie bei den klassischen HPLC-Verfahren üblicherweise für die Trennung der β -Lactame verwendet werden, ist nicht möglich [81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93].

Diese nichtflüchtigen Substanzen, wie z.B. Orthophosphat oder Natriumdodecylsulfat, würden an der Kapillare des Massenspektrometers auskristallisieren und diese verstopfen. Es müssen deshalb flüchtige Zusätze (z.B. Ameisensäure, Essigsäure) verwendet werden, die zum einen eine gute Chromatographie und zum anderen eine bestmögliche Ionisierung der zu messenden β -Lactame ermöglichen.

Grundsätzlich sollte bei der LC-MS-Methodenentwicklung unter Verwendung der ESI berücksichtigt werden, dass im allgemeinen die beste Ionisierungseffizienz bei sehr kleinen Additiv- oder Pufferkonzentrationen im HPLC-Eluenten erzielt wird (s. 1.4.3.4). Als Faustregel gilt, dass diese < 10 mM sein sollten [94].

Obwohl es sich bei Massenspektrometern prinzipiell um massenfluss-sensitive Detektoren handelt, ist die ESI dadurch gekennzeichnet, dass das erzeugte Signal konzentrationsabhängig ist und die höchste Ionisierungseffizienz bei kleinen Flussraten erreicht wird [46].

Diese Konzentrationsabhängigkeit hat letztlich für die Wahl der HPLC-Säule, mit der die β -Lactame chromatographiert werden, eine entscheidende Bedeutung. Um eine hohe Peakkonzentration und Messempfindlichkeit zu erreichen, ist die Verwendung von Narrow-bore Säulen mit kleinen Innendurchmessern (2 mm) im Gegensatz zu den klassischen Normal-bore Säulen mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm vorteilhaft. Durch die Verwendung einer Narrow-bore Säule anstatt einer Normal-bore Säule kann eine deutlich höhere Peakkonzentration um ca. den Faktor 5 erreicht werden.

Das Ziel der hier zu entwickelnden LC-MS/MS-Multimethode war es, insgesamt 15 β -Lactame (Penicilline und Cephalosporine) in einem chromatographischen Lauf massenspektrometrisch zu bestätigen und zu quantifizieren. Um dabei das Identifizierungspunkte-Konzept der EU erfüllen zu können, müssen insgesamt 30 Massenspuren (2 für jede Substanz) im MRM-Modus gemessen werden. Dies ist mit ausreichender Empfindlichkeit jedoch nur dann möglich, wenn dem Massenspektrometer für jede Massenspur eine ausreichend lange Messzeit (Dwell time) zur Verfügung steht.

Ausreichend lange Messzeiten können z.B. dadurch erreicht werden, indem einzelne β -Lactame oder Gruppen von β -Lactamen zeitlich versetzt in verschiedenen Zeitsegmenten gemessen werden.

Dies stellt jedoch erhöhte Anforderungen an die chromatographische Trennung. Für die Verwendung von Zeitsegmenten ist es notwendig, dass die β -Lactame durch eine geeignete Chromatographie mit hoher Trennleistung ausreichend getrennt und reproduzierbar voneinander eluieren.

Die universell einsetzbare Reversed-Phase Chromatographie (Umkehrphasen-Chromatographie) wird als geeignetstes chromatographisches Verfahren für die Trennung der 15 β -Lactame, die sich hinsichtlich ihrer Polarität und ihres Ladungszustandes stark unterscheiden, angesehen.

2.2.1.1 Entwicklung der Reversed-Phase Chromatographie

Zunächst sollte unter Berücksichtigung aller oben genannten Punkte eine optimale Trennung von zunächst 13 β -Lactamen (Amox, Amp, Cephalex, Ceph, Cephal, Cefqu, Cfnz, Pen G, Pen V, Oxa, Clox, Diclox, Naf) erreicht werden. Die β -Lactame (Dceph, Cefo) wurden im Laufe der weiteren Methodenetablierung integriert.

Insgesamt wurden zwei verschiedene HPLC-Säulen getestet, deren stationäre Phasen sich hinsichtlich der Polarität und Phasenchemie deutlich unterscheiden.

Bei der ersten Phase handelte es sich um eine hydrophil desaktivierte Phenyletherphase, deren Retentionsmechanismus auf hydrophoben Wechselwirkungen sowie auf π - π -Wechselwirkungen (elektronischen Wechselwirkungen) zwischen den Phenylgruppen und den Analyten basiert.

Die zweite Phase ist im Gegensatz zur ersten eine völlig unpolare alkylgebundene C-12-Phase, bei welcher außer einer hydrophoben Retention mit Methylgruppenselektivität keine speziellen Wechselwirkungen vorhanden sind. Beide verwendeten HPLC-Säulen waren Narrow-bore Säulen mit einem Innendurchmesser von 2 mm, die bei einem niedrigen Fluß von 0,2 ml/min gefahren werden.

Eine optimale Trennung der β -Lactame konnte für beide HPLC-Phasen bei einer Säulentemperatur von 37°C und dem in Tab. 10 dargestellten Gradientenprogramm erreicht werden.

Tab. 10: Entwickeltes Gradientenprogramm für die hydrophil desaktivierte Phenyletherphase und die C-12 Phase

Zeiten (min)	Flussrate (ml/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0 - 3	0,2	100	0
3 - 22	0,2	10	90
22 - 37	0,2	10	90
37 – 52 (Äquilibrieren)	0,2	100	0

Als Eluent A wurde HPLC-Wasser mit einer niedrigen Ameisensäurekonzentration von 0,005 % (v/v, 1,3 mM) und reines Methanol als Eluent B verwendet. Diese minimale Ameisensäurekonzentration war notwendig, um eine ausreichende Retention für die amphoteren Penicilline (Amox, Amp) mit gleichzeitig geringer Peakbreite zu erreichen. Der pH-Wert von Eluent A betrug 3,4. Das organische Lösungsmittel Acetonitril musste als Eluent vermieden werden, da sich in Vorversuchen zeigte, dass dieses Lösungsmittel sehr starke Addukte mit den

protonierten Molekülonen der amphoteren Penicilline Amoxicillin und Ampicillin bildete. Darüber hinaus besitzt Acetonitril sehr starke π -Eigenschaften, die zu einer unerwünschten Unterbrechung der elektronischen Wechselwirkungen zwischen den Analyten und den Phenylgruppen der Phenyletherphase führen würden.

Um die beiden getesteten HPLC-Phasen bezüglich ihrer Retentionseigenschaften für jedes der 13 β -Lactame vergleichen zu können, wurde aus den Chromatogrammen der Retentionsfaktor k nach folgender Formel berechnet:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (14)$$

k = Retentionsfaktor

t_r = Retentionszeit der Komponente (min)

t_0 = Durchflusszeit Streptomycin = Totzeit (min)

Der Retentionsfaktor ist ein Maß dafür, um wieviel länger sich die Probenmoleküle an oder in der stationären Phase aufhalten als eine nicht-retardierte Verbindung wie z.B. Streptomycin.

Die für die β -Lactame erhaltenen Retentionsfaktoren unter Verwendung der beiden HPLC-Phasen sind in Abb. 14 grafisch dargestellt.

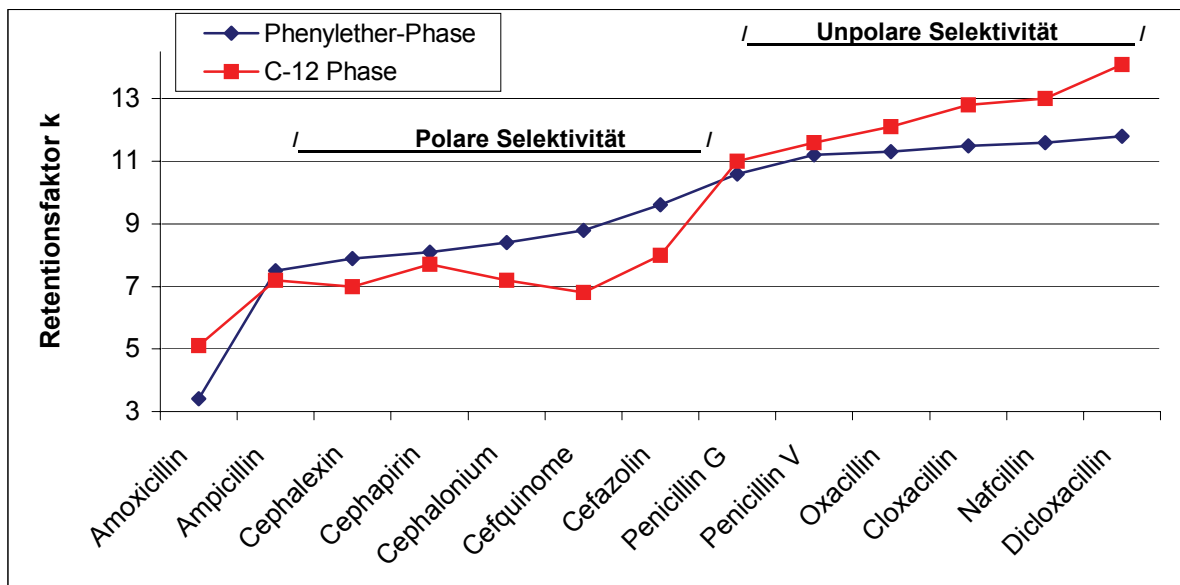


Abb. 14: Erzielte Retentionsfaktoren für die beiden getesteten HPLC-Phasen. Signifikante polare Selektivität der Phenyletherphase für die β -Lactame Ampicillin, Cephalexin, Cephapirin, Cephalonium, Cefquinome und Cefazolin. Signifikante unpolare Selektivität der C-12 Phase für die β -Lactame Pen G, Pen V, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin.

Die Ergebnisse zeigen, dass die hydrophil desaktivierte Phenyletherphase im Vergleich zur unpolaren alkylgebundenen C-12-Phase für die Trennung von Amp, Cephalex, Ceph, Cephal und Cefqu besser geeignet ist. Die Phenyletherphase besitzt für diese β -Lactame höhere und sich stärker unterscheidende Retentionsfaktoren und damit eine bessere Trennleistung.

Die höheren Retentionsfaktoren lassen auf die dominierenden π - π -Wechselwirkungen, welche zusätzlich zu den rein hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Phenylgruppen und den β -Lactamen vorhanden sind, zurückführen. Vergleichbare Beobachtungen, die sich ebenfalls mit π - π -Wechselwirkungen erklären lassen, wurden z.B. für die Chromatographie von Anti-Epileptika und Cephalexin auf Phenylphasen beschrieben [95, 96].

Die getestete Phenyletherphase besitzt somit im Gegensatz zur C-12 Phase eine zusätzliche polare Selektivität. Besonders deutlich sind die π - π -Wechselwirkungen bei Cefquinome und Cefazolin ausgeprägt, die beide aufgrund der aromatischen Reste R1 und R2 (s. Abb. 1 u. Tab. 2) sehr π -elektronenreich sind. Die Retentionszeit ist auf der Phenyletherphase um ca. 5 Minuten im Vergleich zur C-12 Phase länger.

Ein umgekehrtes Verhalten zeigten vor allem die monobasischen Penicilline (Pen G, Pen V, Oxa, Clox, Diclox, Naf). Diese wurden auf der unpolaren C-12-Phase deutlich stärker retardiert (unpolare Selektivität) als auf der weniger unpolaren Phenyletherphase. Jedoch verbesserte sich die Auflösung zwischen den monobasischen Penicillinen nicht deutlich. Vielmehr führt die stärkere Retention zu einer ungünstigen Verlängerung des chromatographischen Laufes um ca. 6 Minuten.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse mit den beiden getesteten HPLC-Phasen wurde die hydrophil desaktivierte Phenyletherphase für die weitere Methodenentwicklung verwendet.

Ein typisches (MRM)-Chromatogramm aller 15 β -Lactame unter Verwendung dieser HPLC-Phase ist in Abb. 15 dargestellt.

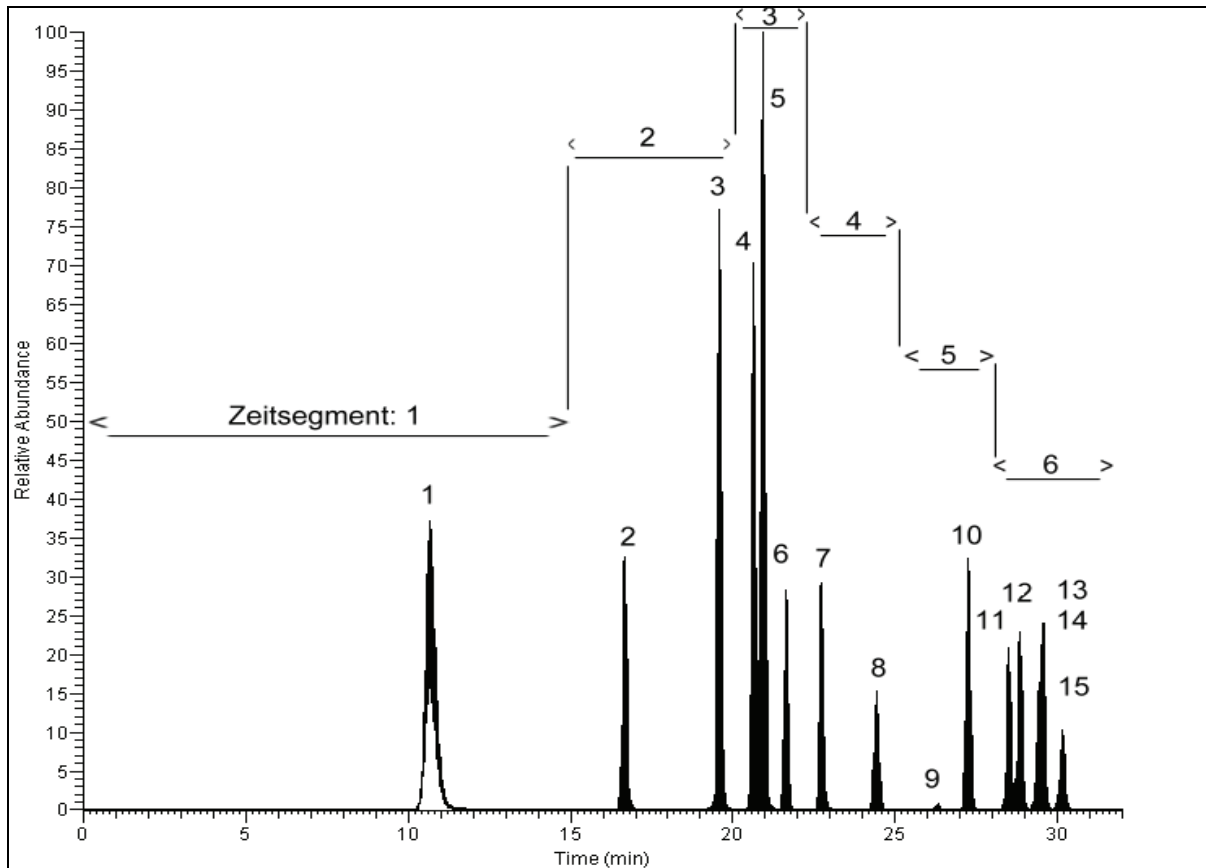


Abb. 15: Multiple reaction monitoring (MRM)-Chromatogramm von 15 β -Lactamen (50 ng/ml, 20 μ l Injektionsvolumen): Amoxicillin (1), Desacetyl-Cephapirin (2), Ampicillin (3), Cephalexin (4), Cephapirin (5), Cephalonium (6), Cefquinome (7), Cefazolin (8), Cefoperazon (9), Penicillin G (10), Penicillin V (11), Oxacillin (12), Cloxacillin, Nafcillin (13,14), Dicloxacillin (15)

Durch die entwickelte chromatographische Trennung war es möglich, 15 in der Multimethode erfasste β -Lactame in sechs verschiedenen Zeitsegmenten zu messen (s. 3.1.4.2).

Im Zeitsegment 1 (0 - 15 min) wird Amoxicillin, im Zeitsegment 2 (15,0 – 20,2 min) werden Desacetyl-Cephapirin und Ampicillin, im Zeitsegment 3 (20,2 – 22,2 min) werden Cephalexin, Cephapirin und Cephalonium, im Zeitsegment 4 (22,2 – 25,0 min) werden Cefquinome und Cefazolin, im Zeitsegment 5 (25,0 – 28,0 min) werden Cefoperzone und Pen G, im Zeitsegment 6 (28,0 – 32,0 min) werden Pen V, Oxacillin, Cloxacillin, Nafcillin und Dicloxacillin gemessen.

Die Verwendung der sechs Zeitsegmente ermöglichte ausreichend lange Messzeiten (dwell time) des Massenspektrometers für jede zu messende Massenspur, wodurch

erstmals eine hochempfindliche Quantifizierung und zugleich massenspektrometrische Bestätigung von 15 β -Lactamen, über jeweils zwei diagnostische Fragmentationen, in einem chromatographischen Lauf möglich wurde.

Die Nachteile einer nicht ausreichenden chromatographischen Trennung auf die Messempfindlichkeit wurden bei einer von Daeseleire et al. [65] publizierten LC-MS/MS-Multimethode für die Analytik von 11 β -Lactamen in Milch deutlich. Für das Messen von unbekanntem Proben mussten die Probenextrakte, im Gegensatz zu der hier entwickelten Multimethode, zweimal injiziert werden. Die erste Injektion diente dabei dem Screening auf alle 11 in der Methode erfassten β -Lactame, in dem nur ein diagnostisches Fragmentation im SRM Modus gemessen wurde.

Erst durch die zweite Injektion war es möglich, das bei der ersten Injektion ermittelte β -Lactam ausreichend empfindlich zu quantifizieren und im MRM Modus über mehrere diagnostische Fragmentationen zu bestätigen.

2.2.2 Optimierung des ESI-Triple-Quadrupol-Gerätes

Der entscheidende Schritt bei der Entwicklung von LC-MS/MS-Methoden unter Verwendung der ESI besteht darin, Molekülonen (Precursor ions) der zu analysierenden Substanzen zu erzeugen, die in der Kollisionszelle des Massenspektrometers zu diagnostischen Tochterionen (Daughter ions) fragmentiert werden (s. 2.2.3).

Hierzu verfügt das System über eine Reihe von variablen Parametern, mit denen der Elektrosprayprozess und die anschließende Überführung der erzeugten Gasphasenmolekülonen in das Massenspektrometer direkt beeinflusst werden kann. Es ist deshalb notwendig, diese Parameter zu optimieren, um eine maximale Empfindlichkeit der Messung für jedes β -Lactam zu erzielen.

Für die Durchführung dieser Untersuchungen wurden Lösungen der einzelnen β -Lactame mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ mittels Spritzenpumpe dem HPLC-Eluenten zudosiert. Der Fluss der Spritzenpumpe betrug 3 $\mu\text{l/min}$ bei einem HPLC-Fluss von 0,2 ml/min mit der Eluentenzusammensetzung von 50 % Eluent A und 50% Eluent B. Unter Berücksichtigung des Verdünnungseffektes, der durch den HPLC-Fluss verursacht wird, beträgt die Konzentration der β -Lactame, die in das ESI-Interface überführt werden, ca. 10^{-7} mol/l .

Diese Konzentration ist für die Elektrosprayionisation optimal, da die Ionisierungseffizienz bei Konzentrationen $< 10^{-5}$ mol/l maximal ist und ein linearer

Zusammenhang zwischen dem gemessenen Signal und der Konzentration besteht (s. 1.4.3.4). Die Erzeugung von Molekülonen und deren Überführung in das Massenspektrometer ist durch folgende variable Parameter beeinflussbar:

- 1.) Kapillartemperatur
- 2.) Spannung der Elektrospraynadel
- 3.) Sheatgasdruck, Auxiliarygasdruck
- 4.) Linsenspannungen im Massenspektrometer

Als Ausgangsbedingung für die Optimierungen wurde die Kapillartemperatur des Massenspektrometers auf 200°C, die Nadelspannung auf 5 kV, der Sheatgasdruck auf 70 psi (1 psi = 6894,76 Pa) und der Auxiliarygasdruck auf 0 psi gesetzt. Die Optimierungen wurden bei dem für die Substanzen geeignetsten ESI-Modus (+/-) durchgeführt (s. 2.2.3).

Für die Optimierung der Kapillartemperatur wurde diese von 200°C in 10°C Schritten, wenn nötig bis zur maximalen Temperatur von 400°C erhöht und dabei das Molekülonensignal der einzelnen β -Lactame gemessen.

Nach Abschluss der Kapillartemperaturoptimierung fand die Optimierung des Sheatgas- und Auxiliarygasdruckes für jedes β -Lactam bei der zuvor ermittelten optimalen Kapillartemperatur statt. Dazu wurde der Sheatgasdruck von 30 psi bis zum maximal einstellbaren Druck von 100 psi erhöht.

Nach der Ermittlung des optimalen Wertes wurde zusätzlich das Auxiliarygas zugeschaltet, dessen Aufgabe es ist, den erzeugten Elektrospray in Richtung der Kapillare zu fokussieren. Zuletzt wurde die Spannung der Elektrospraynadel im Bereich von 2 – 7 kV optimiert.

Bezüglich der Linsenspannungen des Massenspektrometers zeigte sich, dass die bereits bei der Gerätekalibrierung ermittelten Grundeinstellungen optimale Ergebnisse liefern und dass deshalb keine zusätzliche Optimierung der Linsenspannungen notwendig war.

Eine Zusammenfassung aller ermittelten Optimierungsdaten für die Kapillartemperatur, den Sheatgasdruck und der Nadelspannung sind in den Abb. 16, 17 u. 18 dargestellt.

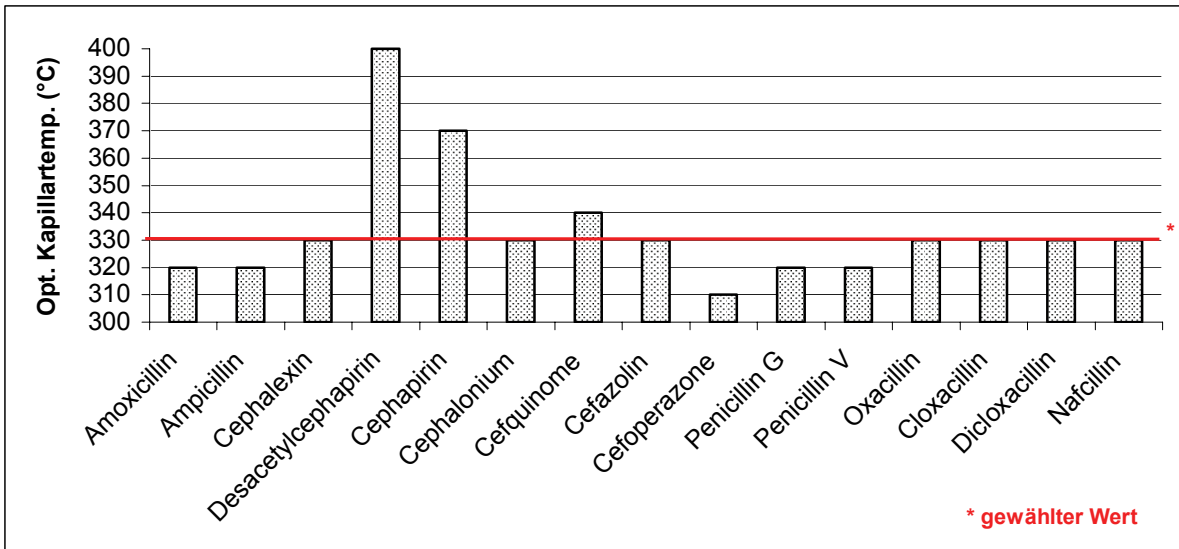


Abb. 16: Optimale Kapillartemperatur der einzelnen β -Lactame

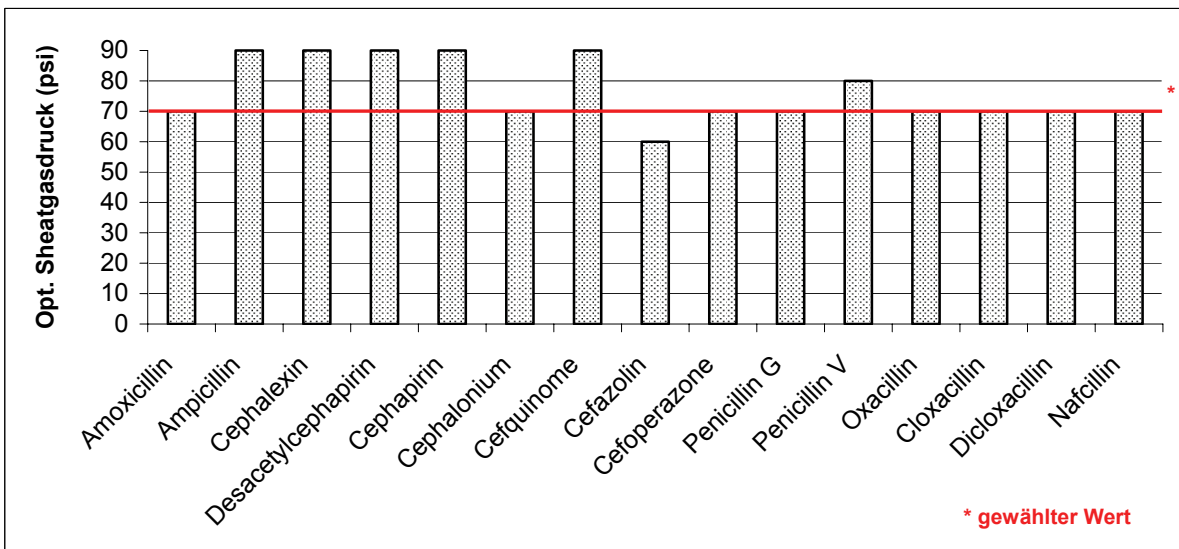


Abb. 17: Optimaler Sheatgasdruck der einzelnen β -Lactame

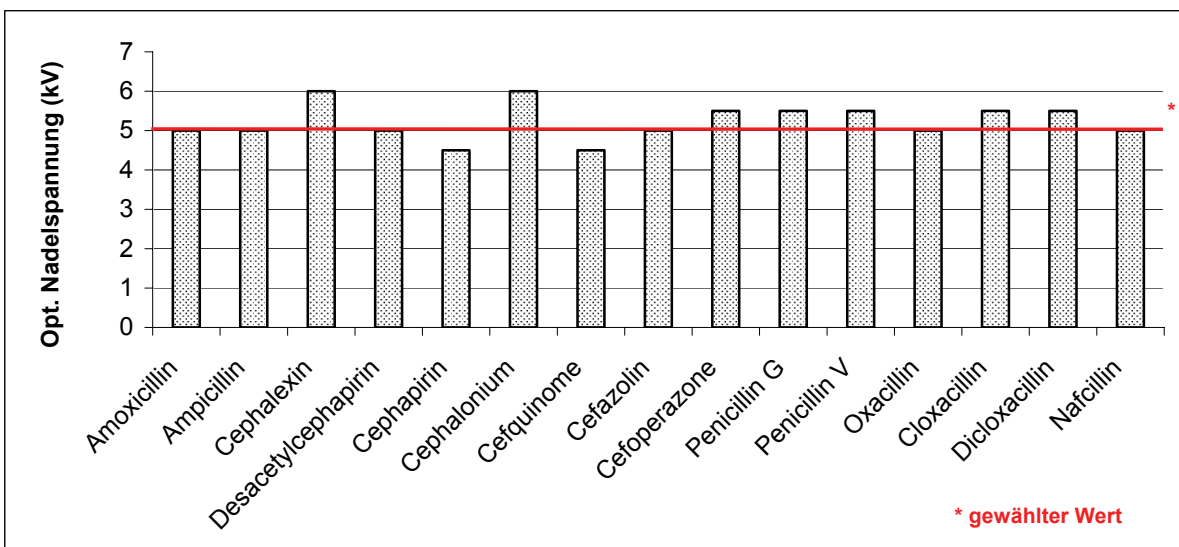


Abb. 18: Optimale Spannungen der Elektrospraynadel für die einzelnen β -Lactame

Wie sich aus Abb. 16 erkennen lässt, lagen die optimalen Kapillartemperaturen für die in der Methode erfassten β -Lactame zwischen 310°C und 340°C. Nur Desacetyl-Cephapirin und Cephapirin benötigen deutlich höhere Temperaturen von 400°C sowie 370°C. Die optimalen Sheatgasdrücke lagen zwischen 60 und 90 psi und die optimalen Nadelspannungen zwischen 4,5 und 6 kV.

Das Auxiliarygas zeigte bei der überwiegenden Anzahl der β -Lactame keinen positiven Einfluss, weshalb auf dessen Einsatz verzichtet wurde. Ein geringer Effekt des Auxiliarygases war zu erwarten, da dieses in der Regel erst bei höheren HPLC-Flussraten benötigt wird.

Bei der Optimierung der Nadelspannung musste besonders im negativen ESI-Modus darauf geachtet werden, dass es zu keinen Gasentladungen (corona discharge) kommt, was einen instabilen Elektrospray zur Folge hat und die Elektrosprayeffizienz stark verringert. Bei den Versuchen zeigte sich, dass im negativen ESI-Modus diese Gasentladungen bei ca. 5,5 kV durch einen deutlich steigenden Elektrospraystromfluss langsam begannen und bei 7 kV zu einem völligen Zusammenbruch dessen führten. Der gemessene Stromfluss betrug bei 5 kV ca. 0,7 μ A, wobei dieser bei 7 kV auf über 100 μ A anstieg. Im positiven ESI-Modus fand ein ähnlich hoher Anstieg zwar selbst bei 7 kV nicht statt, jedoch war auch hier ein Anstieg des Elektrospraystromflusses von ca. 1,7 μ A auf ca. 20 μ A zu beobachten.

Prinzipiell wäre es für das Erzielen einer maximalen Messempfindlichkeit optimal, wenn jedes einzelne β -Lactam bei seinem Optimum gemessen würde. Dies ist jedoch nicht möglich, da zum einen die zentrale Steuerungssoftware (Xcalibur) des LC-MS/MS-Systems nur jeweils einen festen Wert für die Kapillartemperatur, die Nadelspannung und den Sheatgasdruck zulässt und zum anderen eine Kapillartemperaturänderung während des chromatographischen Laufes zu träge reagieren würde.

Es war deshalb notwendig, einen Kompromiss bezüglich der Kapillartemperatur, der Nadelspannung und des Sheatgasdruckes zu finden. Dies war prinzipiell problemlos möglich, da die ermittelten Optimierungswerte zwischen den einzelnen β -Lactamen nicht sehr unterschiedlich waren.

Es wurden deshalb für die LC-MS/MS-Multimethode folgende gemeinsame Werte festgelegt: Kapillartemperatur 330°C, Sheatgasdruck 70 psi, Nadelspannung 5 kV.

2.2.2.1 Einfluss der Oberflächenaktivität von Cephapirin und Desacetyl-Cephapirin auf ihre Signalintensität und ihre Kapillartemperaturoptima

Desacetyl-Cephapirin und Cephapirin sind strukturell identische Cephalosporine, bis auf den Unterschied, dass Cephapirin zusätzlich über eine Acetylgruppe im Rest R2 verfügt (s. Abb. 1 u. Tab. 2). Das Fehlen der Acetylgruppe bei Desacetyl-Cephapirin führt zu einer Erhöhung der Polarität im Vergleich zu Cephapirin. Erkennbar wird dies vor allem durch eine deutlich kürzere Retentionszeit bei der Reversed-Phase Chromatographie (s. 2.2.1.1).

Eine genaue Beschreibung der Hydrophobizität von Verbindungen kann durch den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient P erfolgen. Dieser beschreibt die Verteilung einer Substanz zwischen einem Zwei-Phasen-System aus n-Octanol und Wasser. Er wird aus dem Quotienten der Gleichgewichtskonzentrationen der Substanz in wassergesättigtem n-Octanol und in n-Octanol gesättigtem Wasser ermittelt. Gewöhnlich wird dieser Wert als log P angegeben und nach folgender Gleichung berechnet:

$$\log P = \log \frac{[x]_{\text{oct}}}{[x]_{\text{aq}}} \quad (15)$$

$[x]_{\text{oct}}$ = Konzentration der Substanz in der Octanol-Phase
 $[x]_{\text{aq}}$ = Konzentration der Substanz in der Wasser-Phase

Die genauen log P-Werte sind für Desacetyl-Cephapirin und Cephapirin in der Literatur beschrieben [97]. Desacetyl-Cephapirin ist ohne die Acetylgruppe mit einem Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient (log P-Wert) von $-1,23$ deutlich polarer als Cephapirin, welches einen log P-Wert von $-0,42$ besitzt. Ferner lassen die log P-Werte der beiden Cephalosporine Rückschlüsse auf ihre Oberflächenaktivität zu. Desacetyl-Cephapirin ist wegen des negativeren log P-Wertes weniger oberflächenaktiv als das unpolare Cephapirin.

Bei den durchgeführten Optimierungen des Triple-Quadrupol Massenspektrometers zeigte sich, dass Desacetyl-Cephapirin aufgrund der niedrigeren Signalintensität bei allen Kapillartemperaturen weniger effizient ionisiert wird als Cephapirin. Darüber hinaus konnte die maximale Signalintensität für Desacetyl-Cephapirin im Gegensatz zu Cephapirin nicht innerhalb des maximal einstellbaren Kapillartemperaturbereichs von 400°C erreicht werden.

Die Transmissioneffizienz des Massenspektrometers wurde dabei für beide (m/z) Verhältnisse als konstant angesehen, da die Massendifferenz der beiden Verbindungen klein ist. Die Signalintensität in Abhängigkeit der Kapillartemperatur ist in Abb. 19 dargestellt.

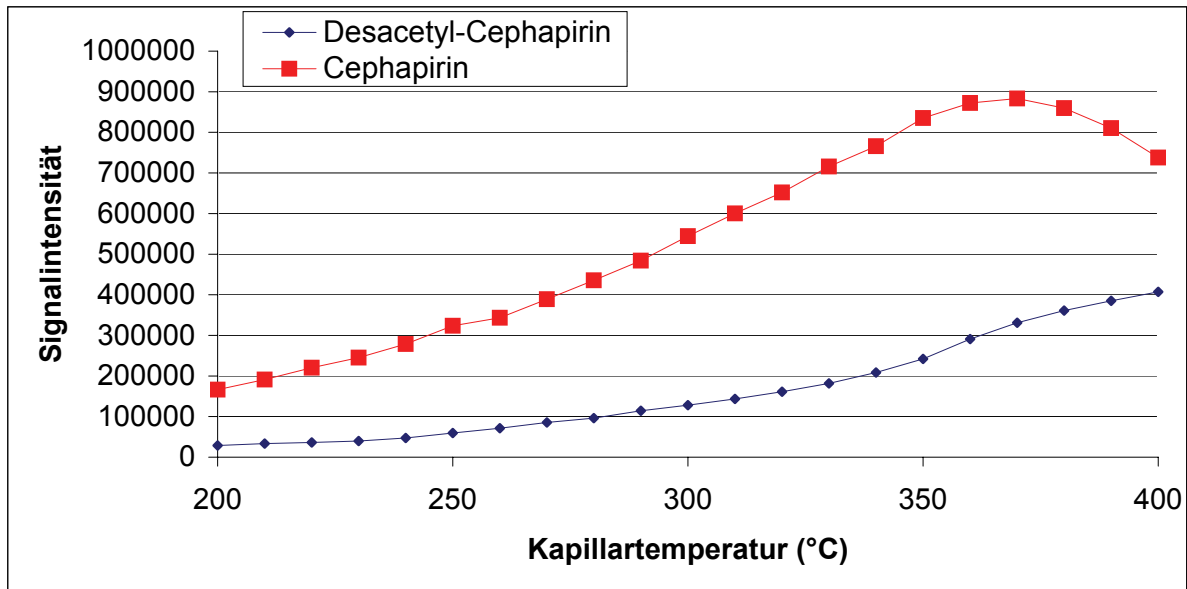


Abb. 19: Vergleich der erreichbaren Signalintensitäten von Cephapirin und Desacetyl-Cephapirin in Abhängigkeit von der Kapillartemperatur.

Eine plausible Erklärung für das Signalintensitätsverhalten der beiden Verbindungen lässt sich auf Basis des IEM-Modells (s. 1.4.3.3 u. 1.4.3.4) herleiten. Nach diesem Modell werden Ionen mit einer hohen Oberflächenaktivität und niedriger Solvationsenergie ($-\Delta G_{\text{sol}}^0$) im Vergleich zu Ionen mit niedriger Oberflächenaktivität und hoher Solvationsenergie ($-\Delta G_{\text{sol}}^0$) mit einer deutlich höheren Effizienz in die Gasphase überführt.

Bezüglich der Kapillartemperatur zeigte sich, dass der beobachtete Signalintensitätsunterschied, welcher durch die unterschiedlichen Oberflächenaktivitäten verursacht wird, dadurch verringert werden kann, indem der Desolvatisierungsprozess (Lösungsmittelverdampfung) durch eine höhere Kapillartemperatur beschleunigt wird [42]. Ein beschleunigter Desolvatisierungsprozess begünstigt den Elektrosprayprozess und damit insgesamt die Überführungseffizienz von Ionen in die Gasphase.

Bei den strukturanalogen Verbindungen Cephapirin und Desacetyl-Cephapirin lässt sich zusammenfassend feststellen, dass unterschiedliche Oberflächenaktivitäten der β -Lactame einen starken Einfluss auf die Messempfindlichkeit haben. Diese Effekte können in gewissem Umfang durch eine Erhöhung der Kapillartemperatur kompensiert werden.

2.2.2.2 Wahl des Elektrospraymodus (+/-)

Um einen bestmöglichen Zusammenhang zwischen dem zu messenden β -Lactam und seinem Molekulargewicht zu erhalten, ist die Erzeugung von protonierten und/oder deprotonierten Quasimolekülonen entscheidend. Im Fall der Protonierung liegt die gemessene Masse um eine Einheit über der des Molekulargewichtes. Die Produktion von Quasimolekülonen setzt bei der ESI voraus, dass die Ionisierung primär in der flüssigen Phase (HPLC-Eluent) stattfinden muss.

Mit Kenntnis der individuellen pK_s -Werte der zu messenden Verbindungen und unter Anwendung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ist es möglich, diesen Ladungszustand bei einem bestimmten pH-Wert in Lösung zu berechnen und den geeigneten ESI-Modus vorherzusagen [98]. Die für die untersuchten β -Lactame berechneten Daten finden sich in Tabelle 11.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei allen β -Lactamen um polyprotische Verbindungen handelt, welche die Fähigkeit besitzen, Protonen anzulagern oder abzugeben. Die unter Punkt 1.4.3.5 beschriebenen Protonentransferreaktionen in der Gasphase sind deshalb bei allen β -Lactamantibiotika nicht auszuschließen, weshalb die auf Basis der pK_s -Werte berechneten Vorhersagen als Näherungen zu betrachten sind.

Bei den monobasischen Penicillinen (Pen G, Pen V, Oxa, Clox, Diclox, Naf) handelt es sich aufgrund des 6-Aminopenicillansäure-Grundkörpers um saure Verbindungen mit einer freien Carboxylgruppe, während die amphoteren Aminopenicilline (Amox, Amp) neben der Säurefunktion am Grundkörper eine basische Aminofunktion im Rest R (s. Abb. 1 u. Tab. 1) tragen.

Die Cephalosporine besitzen ebenfalls wie die Penicilline aufgrund ihres 7-Aminocephalosporansäuregrundkörpers eine saure Carboxylgruppe. Jedoch handelt es sich bei den meisten Cephalosporinen nicht um monobasische Verbindungen,

sondern überwiegend um amphotere. Folgende Cephalosporine sind aufgrund ihrer basischen Gruppen in den Resten R₁ (s. Abb.1 u. Tab. 2) amphoter:

Cephalexin mit einer Aminobenzylgruppe analog zum amphoteren Ampicillin, Cephapirin mit einer Pyridinylgruppe, Cefazolin mit einer Tetrazolylgruppe, Cefquinome und Ceftiofur mit einer Aminothiazolylgruppe.

Cefquinome sowie Cephalonium sind darüber hinaus aufgrund ihrer Reste R₂ mit permanent positiver Ladung am Ringstickstoffatom sogenannte innere Salze. Cefoperazon und Cephalonium besitzen keine signifikant basischen Reste.

Tab. 11: Berechneter Ladungszustand der β -Lactame in Lösung bei pH 3,4 und der daraus abgeleitete optimale ESI-Modus (+/-).

β -Lactam	pK _{s1} (-R _{1,2} NH ⁺)	pK _{s2} (-COO ⁻)	Ladungs- zustand in Lösung	Optimaler ESI-Modus (+/-)
Monobasische Penicilline	-	2,6 – 2,8 ^a	84 % negativ	(-)
Amoxicillin	7,4 ^a	2,4 ^a	9 % positiv	(+)
Ampicillin	7,2 ^a	2,7 ^a	16 % positiv	(+)
Cephalexin	7,3 ^b	5,3 ^b	99 % positiv	(+)
Cephapirin	5,4 ^b	2,2 ^b	6 % positiv	(+)
Desacetyl-Cephapirin	5,4 ^b	2,2 ^b	6 % positiv	(+)
Cefazolin	4,9 ^c	2,5 ^d	8 % positiv	(+)
Cefoperazon	-	2,5 ^e	89 % negativ	(-)
Cephalonium	-	3,2 ^f	38 % positiv	(+)
Cefquinome	5,4 ^g	2,9 ^h	77 % positiv, 23 % 2 fach positiv	(+)
Ceftiofur, Desfuroylceftiofuracetamid	5,4 ^g	2,5 ^e	10 % positiv	(+)

^{a)} Literatur pK_s-Werte [99], ^{b)} Literatur pK_s-Werte [100], ^{c)} Literatur pK_s-Werte [101], ^{d)} Literatur pK_s-Werte [102], ^{e)} pK_s-Wert von Cefazolin übernommen, ^{f)} pK_s-Wert von Cefaloridin übernommen [103], ^{g)} pK_s-Wert berechnet [104], ^{h)} Literatur pK_s-Wert [105]

Unter Berücksichtigung der individuellen pK_s-Werte wurde der erwartete Ladungszustand beim pH-Wert des verwendeten Eluenten A (pH 3,41) für jedes β -Lactam unter Verwendung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (16) berechnet.

$$\text{pH} = \text{pK}_s + \log \frac{c(\text{A}^-)}{c(\text{HA})} \quad (16)$$

Die auf Basis der Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechneten Ergebnisse sind in Tab. 11 dargestellt.

Auf Basis der in Tab. 11 berechneten Werte sollten alle monobasischen Penicilline sowie Cefoperazon mit maximaler Empfindlichkeit als deprotonierte Molekülonen im negativen ESI-Modus gemessen werden können. Ein umgekehrtes Verhalten ist für alle anderen β -Lactame zu erwarten, da diese nach den durchgeführten Berechnungen positiv geladen in Lösung vorliegen.

In Abb. 20 sind die experimentell erhaltenen Werte grafisch dargestellt.

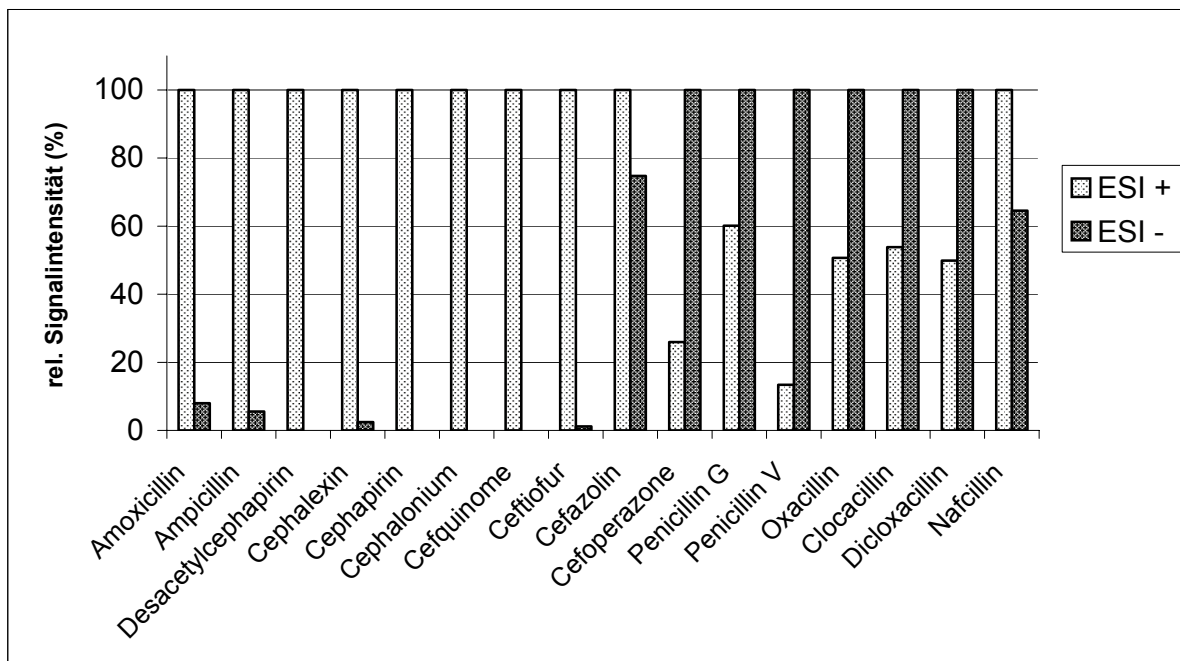


Abb. 20: Experimentell ermittelte relative Signalintensitäten (%) in Abhängigkeit des Elektrospraymodus.

Die experimentell ermittelten Werte stimmen dabei gut mit den rechnerisch vorhergesagten Elektrospray-Modi (+/-) überein.

Lediglich das monobasische Nafcillin zeigte im positiven ESI-Modus eine höhere Empfindlichkeit als im negativen ESI-Modus. Dieses Verhalten lässt sich auf Basis

des pK_s -Wertes der Carboxylgruppe von Nafcillin nicht erklären, zumal alle anderen monobasischen Penicilline diesem folgten.

Vielmehr ist eine Erklärung in der Seitenkette von Nafcillin zu suchen. Nafcillin verfügt über eine 2-Ethoxy-1-naphthalinyl-carbonyl-amino-Seitenkette, die eine Carbonylgruppe in direkter Nachbarschaft zum aromatischen Naphthalinringsystem beinhaltet.

Wird diese Carbonylgruppe protoniert, so ist eine sehr gute Resonanzstabilisierung der positiven Ladung mit insgesamt 9 mesomeren Grenzstrukturen möglich, wie sich dies aus Abb. 21. erkennen lässt. Durch die Möglichkeit der sehr guten Resonanzstabilisierung besitzt der Carbonylsauerstoff von Nafcillin im Vergleich zu allen anderen untersuchten monobasischen Penicillinen eine deutlich höhere Basizität, d.h. die Eigenschaft, ein Proton anzulagern. Es ist davon auszugehen, dass diese Protonierung am wahrscheinlichsten in der Gasphase stattfindet, da der pK_s -Wert der Carbonylgruppe in Lösung sehr klein sein dürfte und deshalb eine Protonierung in Lösung kaum stattfindet.

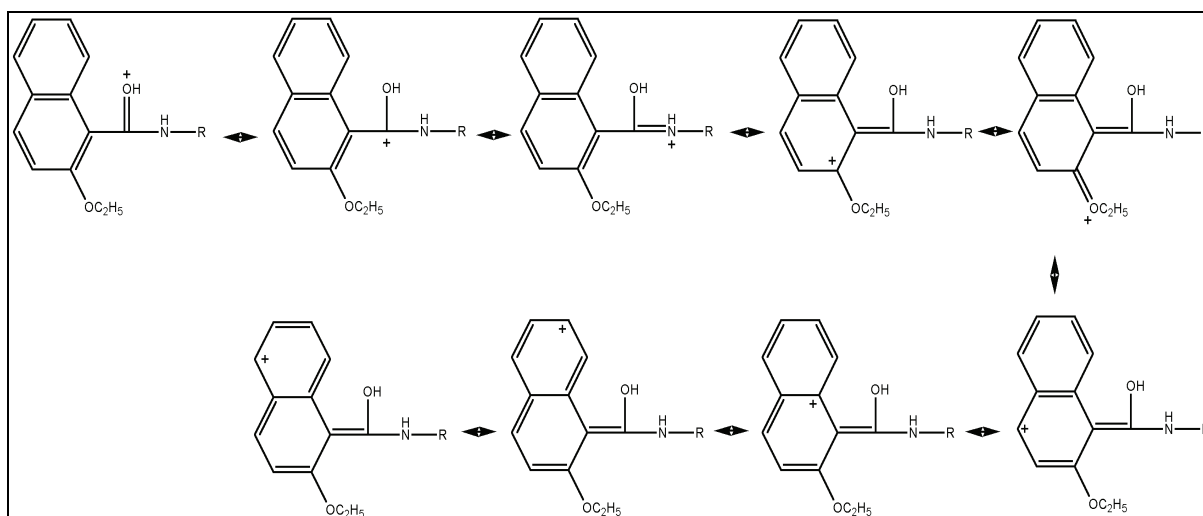
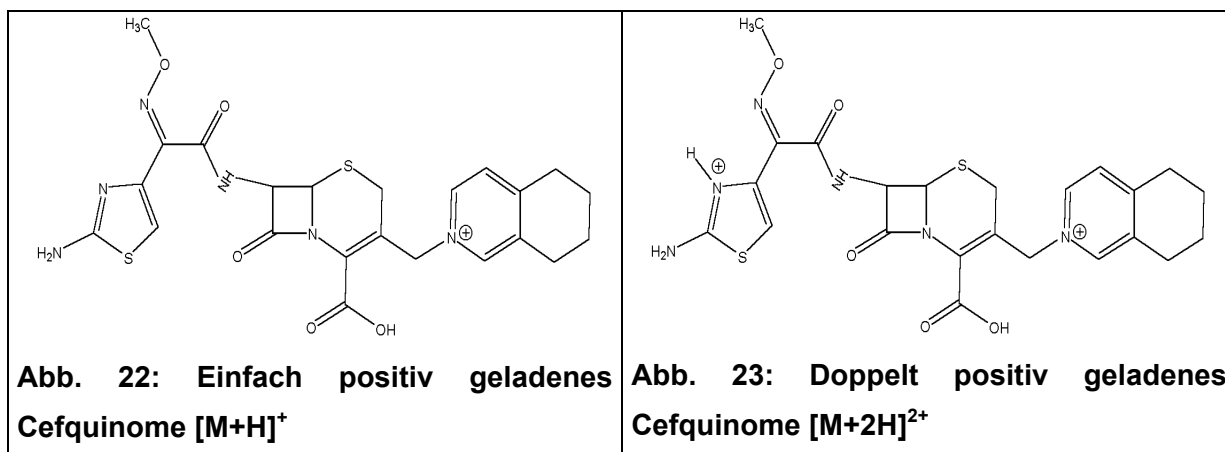


Abb. 21: Mögliche mesomere Grenzstrukturen von Nafcillin bei einer Protonierung des Carbonylsauerstoffatoms

Eine hohe Protonenaffinität wurde in der Literatur ebenfalls für das monobasische Penicillin Methicillin beschrieben, das über eine Dimethoxybenzoylgruppe im Rest R verfügt. Analog zum Nafcillin besitzt dieser Rest R eine Carbonylgruppe in direkter Nachbarschaft zum aromatischen Benzolringsystem [97].

2.2.2.1 Doppelladung von Cefquinome

Cefquinome besitzt aufgrund der inneren Salzstruktur als einziges β -Lactam die Fähigkeit, doppelt positiv geladen in Lösung vorzukommen. Beide Formen sind in Abb. 22 u. 23 dargestellt.



Nach den mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung durchgeführten Berechnungen sollte Cefquinome zu 77 % einfach positiv und zu 23 % doppelt positiv geladen in Lösung vorliegen. Um diese Vorhersage experimentell zu prüfen, wurde ein Massenspektrum über einen erweiterten Massenbereich aufgezeichnet, welches die Masse des doppelt geladenen Molekülions einschloss (s. Abb. 24).

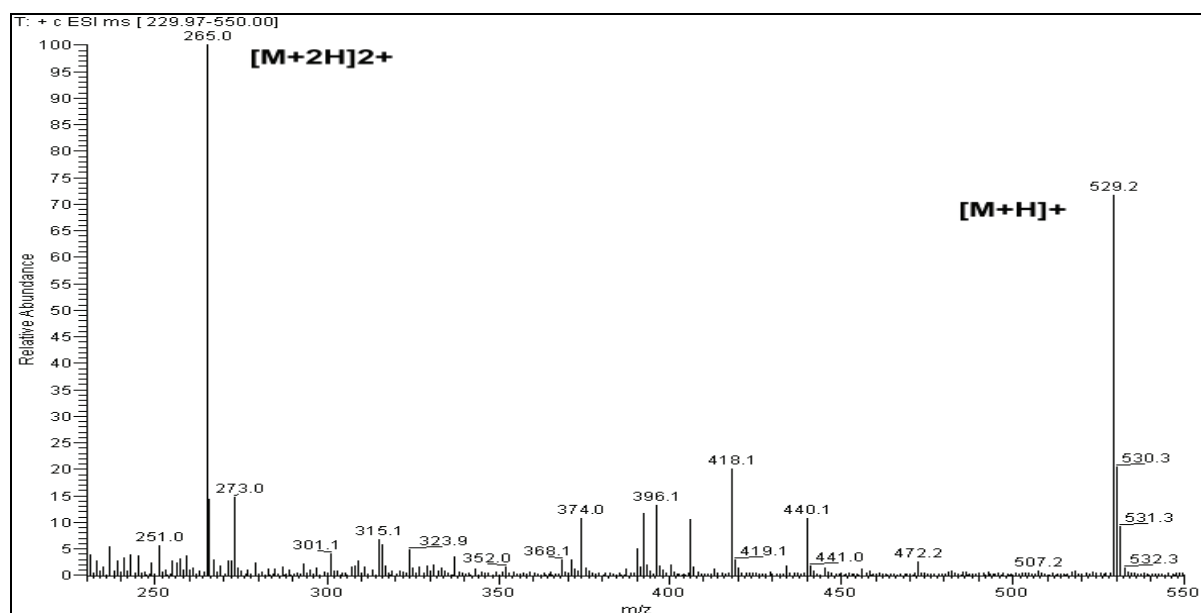


Abb. 24: ESI-Massenspektrum von Cefquinome im positiven ESI-Modus

Das Massenspektrums zeigt, dass entsprechend der Vorhersage einfach und doppelt positiv geladene Molekülionen auftreten. Jedoch stimmen die relativen Intensitäten nicht mit den berechneten überein.

Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Transmissions-effizienz des Massenspektrometers zurückzuführen.

Quadrupol-Massenspektrometer besitzen in der Regel für niedrige (m/z) eine deutlich höhere Transmissionseffizienz als für große (m/z).

2.2.2.2.2 Chemisches Rauschen in Abhängigkeit des gewählten Elektrospraymodus

Bei der Entwicklung von massenspektrometrischen Methoden ist es von großer Bedeutung, eine möglichst hohe Selektivität der Messung zu erreichen. In der Praxis bedeutet dies, dass sich das Masse/Ladungsverhältnis (m/z) der zu analysierenden Substanzen vom chemisch erzeugten Rauschen durch ein hohes Signal/Rauschverhältnis (S/N-Verhältnis) unterscheiden sollte.

Dabei hat die Wahl des ESI-Modus auf das S/N-Verhältnis einen großen Einfluss. Im allgemeinen erzeugt der negative ESI-Modus ein deutlich niedrigeres chemisches Rauschen als der positive ESI-Modus, was in Vorversuchen bestätigt werden konnte.

Grundsätzlich sollte deshalb der negative ESI-Modus im Vergleich zum positiven ESI-Modus die bessere Wahl sein, um die bei der ESI erzeugten Quasimolekülionen mit einem hohen S/N-Verhältnis zu messen.

Um dies zu prüfen wurden die monobasischen Penicilline (Pen G, Pen V, Oxa, Clox, Diclox, Naf) näher untersucht, da diese sowohl im negativen als auch im positiven ESI-Modus Quasimolekülionen erzeugen.

Es wurde hierzu ein Mix dieser Verbindungen in das LC-MS-System injiziert und das S/N-Verhältnis für die gemessenen Quasimolekülionen in beiden ESI-Modi (+/-) bestimmt (s. Abb. 25).

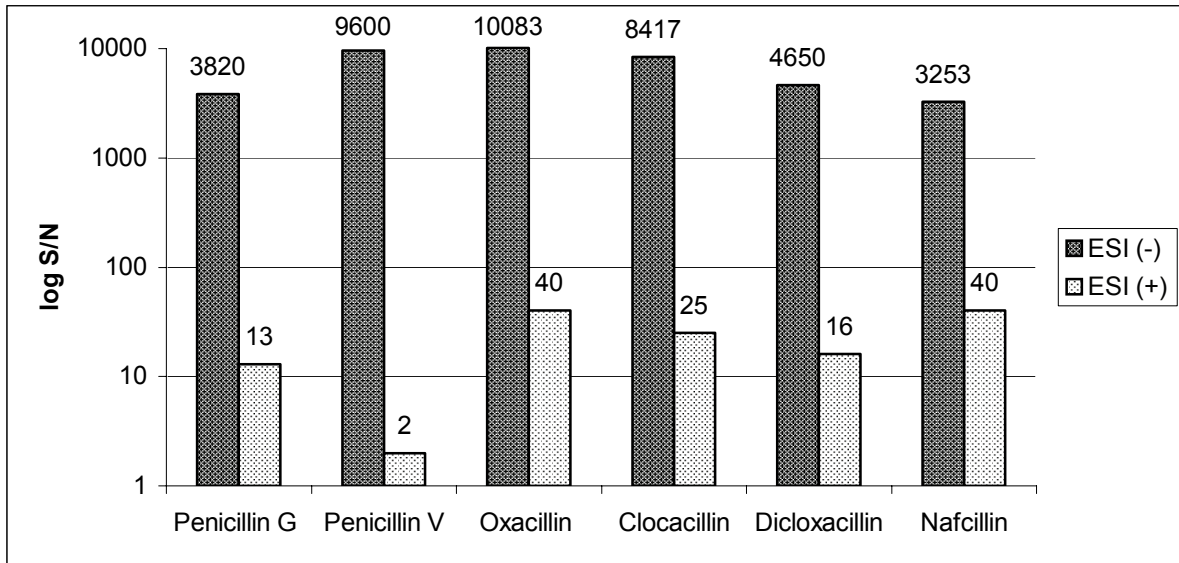


Abb. 25: Darstellung der gemessenen log S/N-Verhältnisse für die Molekülonen der monobasischen Penicilline in Abhängigkeit des gewählten ESI-Modus

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass mit dem negativen ESI-Modus neben der moderat höheren Signalintensität (s. Abb. 20) ein extrem besseres S/N-Verhältnis für die zu messenden monobasischen β -Lactame erzielt werden kann. Der negative ESI-Modus ist deshalb der geeignetster Elektrospray Modus für die monobasischen Penicilline.

2.2.2.2.3 Vergleich mit bereits publizierten LC-MS-Verfahren

Bei den LC-MS-Methoden, die während der letzten Jahre publiziert wurden, zeigt sich eine große Diskrepanz bezüglich der verwendeten Elektrospray-Modi (+/-) für die Messung der monobasischen Penicilline. Am häufigsten wurde der positive Modus verwendet [58, 60, 61, 31, 65, 66, 67, 68, 33], seltener der negative [71, 73, 75, 106].

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigten jedoch deutlich, dass unter den in dieser Methodik verwendeten Eluentenbedingungen der negative Modus für alle monobasischen Penicilline und Cefoperazon der empfindlichste ist und das beste S/N-Verhältnis liefert (s. Abb. 20 u. 25).

Auch stimmten die experimentellen Ergebnisse mit den theoretischen, nach der Henderson-Hasselbalch Gleichung berechneten, sehr gut überein.

Überwiegend werden bei allen publizierten LC-MS-Methoden saure HPLC-Eluenten verwendet, die sich jedoch vor allem von dem in dieser Methode verwendeten Eluenten durch eine 20-fach höhere Ameisensäurekonzentrationen von 0,1 % und dem dadurch von 3,4 auf 2,8 erniedrigten pH-Wert unterscheiden [58, 60, 63, 65, 66, 67, 33].

Um die hier entwickelte Methodik mit den Methodiken der Publikationen hinsichtlich der erreichbaren Messempfindlichkeit in beiden Elektrospray-Modi (+/-) besser vergleichen zu können, wurde eine Vergleichsmessung von Penicillin G als Modellsubstanz unter Verwendung eines Eluenten mit 0,005% und 0,1% Ameisensäure durchgeführt.

Die für beide Elektrospray-Modi (+/-) erzielten absoluten Signalintensitäten sowie deren relative Signalintensität (%) sind in Abb. 26 dargestellt.

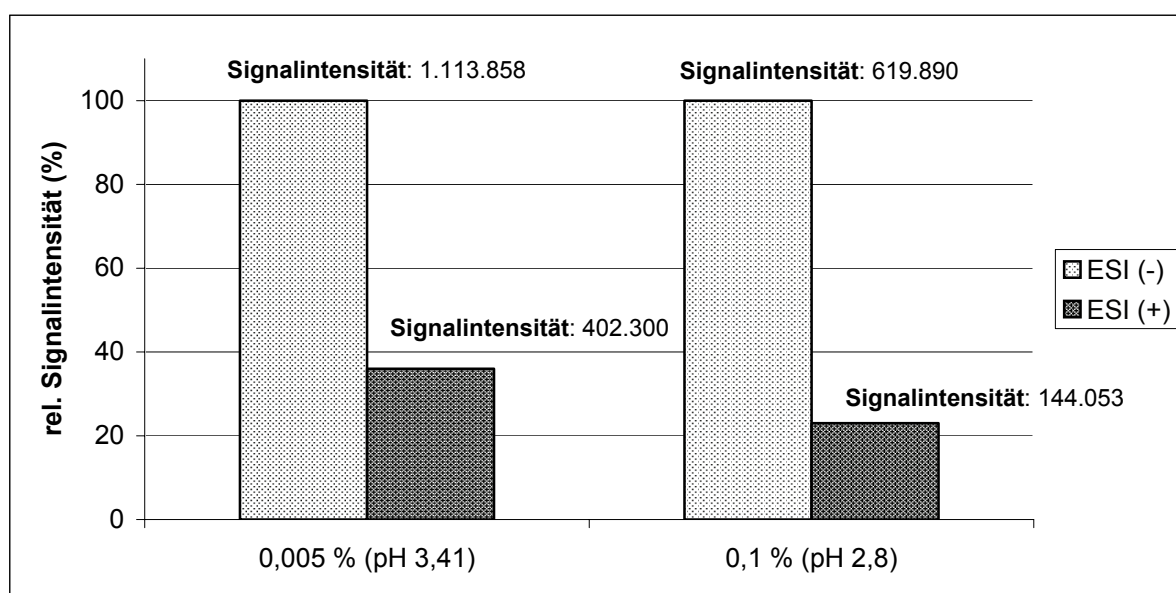


Abb. 26: Erreichte relative Signalintensitäten und absolute Signalintensitäten für die gemessenen Molekülonen von Penicillin G unter Verwendung eines Eluenten mit zwei unterschiedlichen Ameisensäurekonzentrationen (0,005% und 0,1% (v/v)). Die Messungen wurden in beiden ESI-Modi (+/-) durchgeführt.

Eine ähnliche Untersuchung wurde von Riediker et al. [67] für die β -Lactame Amoxicillin, Ampicillin, Penicillin G, Oxacillin, Cloxacillin durchgeführt, in dem für diese Verbindungen die Signalintensitäten bei einer Ameisensäurekonzentration von 0,03% und 0,1% miteinander verglichen wurden. Jedoch wurde im Gegensatz zu der hier durchgeführten Untersuchung nur der positive ESI-Modus berücksichtigt.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass eine 20-fach höhere Ameisensäurekonzentration im Eluenten und eine damit verbundene Senkung des pH-Wertes um 0,6 pH-Einheiten keinen bedeutenden Einfluss auf die relativen Signalintensitäten der im negativen und positiven ESI-Modus erzeugten Molekülonen hatte. Durch die niedrigere Ameisensäurekonzentration wurde für den negativen ESI-Modus eine ca. dreifach so hohe, beim positiven ESI-Modus eine ca. vierfach so hohe Signalintensität erzielt. Dabei zeigte der direkte Vergleich beider ESI-Modi (+/-), dass die Signalintensität für den negativen ESI-Modus, im Vergleich zum positiven ESI-Modus, ca. doppelt so hoch war.

Prinzipiell wäre zu erwarten gewesen, dass die Senkung des pH-Wertes zu einer erkennbaren Erhöhung des Signals im positiven ESI-Modus relativ zum negativen ESI-Modus führt, da sich bei pH 2,8 das Konzentrationsverhältnis von deprotoniertem Penicillin G (negativ geladene Carboxylgruppe) zu protoniertem Penicillin G (neutrale Carboxylgruppe) um ca. den Faktor 4 verkleinert.

Letztlich ist es schwierig, eine plausible Erklärung dafür zu finden, weshalb in einigen Publikationen der positive Modus für die monobasischen Penicilline der empfindlichste war.

Insbesondere die von Riediker et al. [67] erhaltenen Ergebnisse, wonach für Penicillin G bei einer Ameisensäurekonzentration von 0,1% die höchste Messempfindlichkeit im positiven ESI-Modus erzielt wurde, stehen in deutlichem Gegensatz zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse.

Möglicherweise sind ein anderes Design des ESI-Interface oder Protonentransferreaktionen in der Gasphase, welche bei dem in dieser Arbeit verwendeten LC-MS-System nicht auftraten, die Ursache.

Weitergehende Untersuchungen, die sich mit dem Einfluss unterschiedlicher Ameisensäurekonzentrationen auf die Messempfindlichkeit aller in der Multimethode erfassten β -Lactame befassten, sind unter Punkt 2.2.5 beschrieben.

2.2.3 Optimierung der Tandem-MS-Bedingungen (MS/MS)

Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass die ESI für alle β -Lactame, abhängig von der Wahl des ESI-Modus (+/-), zur intensiven Bildung von protonierten ($[M+H]^+$) oder deprotonierten ($[M-H]^-$) Quasimolekülonen führt. Eine nennenswerte Fragmentierung findet dabei nicht statt (s. Abb. 27).

Aufgrund dieser weitgehend ausbleibenden Fragmentierung besteht zwar ein guter Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht der entsprechenden β -Lactame, jedoch lassen sich daraus keine strukturellen Informationen ableiten, die unter anderem für eine eindeutige Bestätigung der Substanz nach dem EU-Identifizierungskonzept notwendig sind (s. 1.6).

Die strukturellen Informationen können jedoch durch eine gezielte Fragmentierung der Quasimolekülonen in der Kollisionszelle des Triple-Quadrupol Massenspektrometers zu diagnostischen Fragmentationen erhalten werden. Das Ausmaß der Fragmentierung lässt sich dabei durch die an die Kollisionszelle angelegten Offset-Spannung steuern (s. 1.5).

Für die Erfüllung des EU-Identifizierungskonzeptes müssen unter Berücksichtigung folgender Gründe für jedes β -Lactam mindestens 2 diagnostische Fragmentationen im MRM Modus gemessen werden:

- 1.) Durch das Messen von 2 diagnostischen Fragmentationen lässt sich das relative Intensitätsverhältnis der Ionen zueinander ermitteln. Dieses Verhältnis darf nur in vorgegebenen Grenzen schwanken.
- 2.) Insgesamt werden durch diese Vorgehensweise 4 IP's erhalten (1 Punkt für das Vorläuferion und 2 x 1,5 Punkte für die beiden diagnostischen Fragmentationen). Dabei wird die geforderte Mindestpunktzahl von 3 IP's, für Substanzen mit Höchstmengenfestsetzung gemäß Richtlinie 96/23/EC (Gruppe B), sogar übererfüllt.

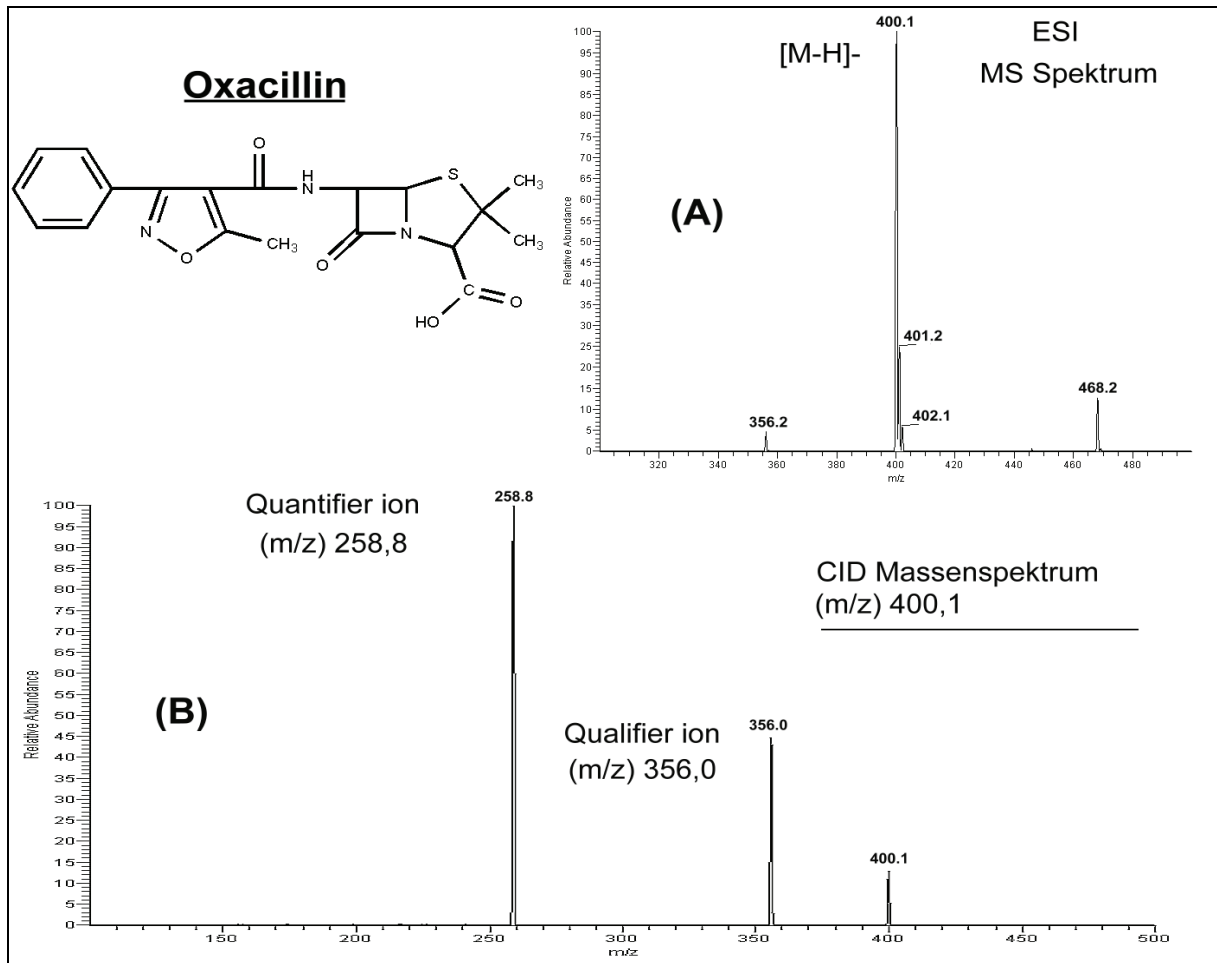


Abb. 27: (A) Massenspektrum von Oxacillin im negativen ESI-Modus. Intensives Quasimolekülion $[M-H]^-$ mit (m/z) 400,1 ohne nennenswerte Fragmentierung. (B) CID-Massenspektrum von Oxacillin. Insgesamt werden zwei diagnostische Fragmentionen mit (m/z) 356,0 und (m/z) 258,8 erzeugt.

Um eine maximale Messempfindlichkeit im MRM-Modus zu erreichen, wurde die Offset-Spannung für jedes einzelne β -Lactam so gewählt, dass nahezu alle Quasimolekülionen (Vorläuferionen) in der Kollisionszelle fragmentiert werden. Dabei durfte die Spannung nicht zu hoch gewählt werden, um eine Erniedrigung der Messempfindlichkeit infolge der Bildung von zu vielen kleinen, wenig intensiven Fragmentionen zu vermeiden.

Das MS-sowie das CID-Massenspektrum ist für Oxacillin in Abb. 27 beispielhaft dargestellt. Eine komplette Zusammenfassung der verwendeten diagnostischen Fragmentionen für alle β -Lactame sowie die zeitgesteuerten MS/MS-Parameter sind im Experimentellen Teil unter Punkt 3.1.4.2 aufgeführt.

Aus dem CID-Massenspektrum von Oxacillin lässt sich erkennen, dass zwei intensive diagnostische Fragmentationen erzeugt werden. Die Quantifizierung erfolgt dabei über das intensivste diagnostische Fragmentation (Quantifier Ion) und die Bestätigung (Identifizierung) über das zweitintensivste diagnostische Fragmentation (Qualifier Ion) durch den Vergleich der relativen Peakflächen.

2.2.4 Überprüfung der Messstabilität des LC-MS/MS-Systems

Im Anschluss an die durchgeführten Optimierungen war es notwendig zu überprüfen, ob diese erfolgreich waren und zu einer akzeptablen Messstabilität führen. Dazu wurde ein Mix aller 15 β -Lactame mehrfach in das LC-MS/MS-System injiziert und die Peakflächen der diagnostischen Fragmentationen (Quantifier-, Qualifierion) nach der chromatographischen Trennung bestimmt. In Tab. 12 sind die Variationskoeffizienten der Peakflächen (Quantifier Ion) für eine Serie von fünf Injektionen mit einer Konzentration von 50 ng/ml dargestellt.

Tab. 12: Berechnete Variationskoeffizienten aus den gemessenen Peakflächen der Quantifier-Ionen (n=5)

β -Lactam	CV (%)	
	Amoxicillin	24,8 (*)
Ampicillin	1,6	
Cephalexin	2,1	
Cephapirin	2,9	
Desacetycephapirin	1,2	
Cephalonium	2,2	
Cefquinome	2,9	
Cefazolin	1,7	
Cefoperazon	4,6	
Penicillin G	1,4	
Penicillin V	4,0	
Oxacillin	3,7	
Cloxacillin	1,0	
Dicloxacillin	3,9	
Nafcillin	0,9	

(*) CV (%) unter Einbeziehung aller Messwerte

(**) CV (%) nachdem die Werte der ersten 3 Injektionen verworfen wurden

Es zeigte sich, dass die Präzision für nahezu alle β -Lactame, mit einem CV (%) kleiner 5 %, als sehr gut zu bewerten ist. Lediglich Amoxicillin zeigte mit einem CV (%) von 24,8 % eine ungewöhnlich schlechte Präzision. In Abb. 28 sind die

gemessenen Peakflächen von Amoxicillin als Funktion der aufeinanderfolgenden Injektionen dargestellt.

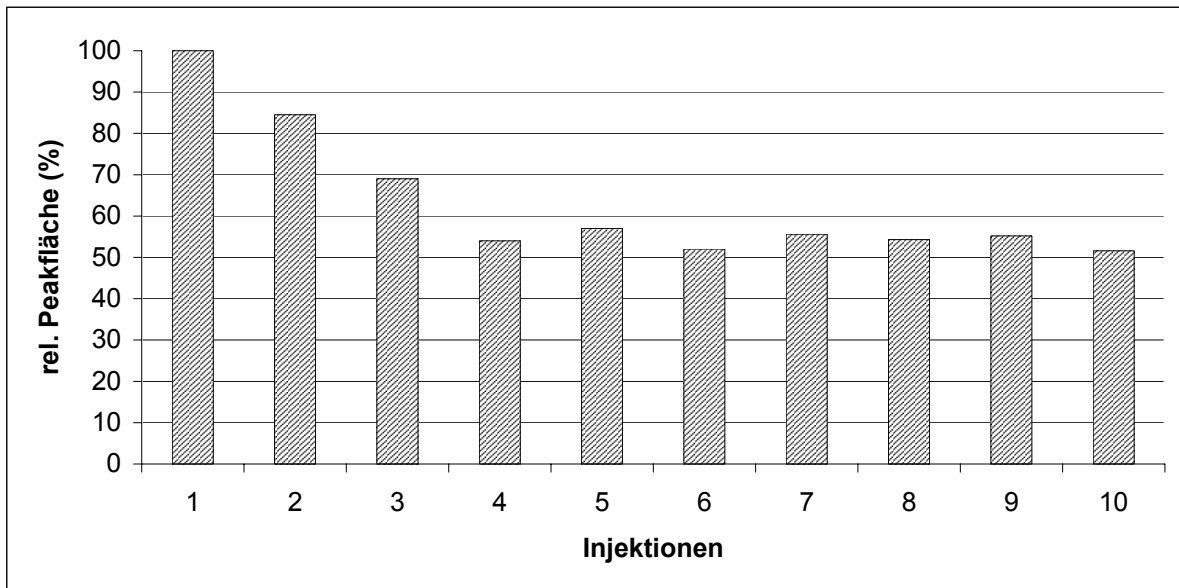


Abb. 28: Relative Peakflächen von Amoxicillin in Abhängigkeit der durchgeführten Injektionen

Bei genauer Betrachtung der gemessenen Peakflächen ist zu erkennen, dass diese nicht normal verteilt sind, sondern dass ein deutlicher Trend der Messwerte vorliegt. Die gemessenen Peakflächen der ersten drei Injektionen sind signifikant höher als die darauffolgenden.

Ein Stabilitätsproblem der Amoxicillin-Messlösung konnte sicher ausgeschlossen werden, da eine frisch hergestellte Lösung, welche im Anschluss an die ersten 10 Injektionen gemessen wurde, keinen erneuten Trend zeigte.

Das aufgetretene Messproblem für Amoxicillin ist somit als ein rein gerätetechnisches Problem auf Seiten des Massenspektrometers zu bewerten. Ein ähnliches Phänomen wurde in der Literatur bei der LC-MS-Bestimmung von Aminoglycosiden beschrieben [77]. Aufgrund dieser Beobachtungen war es letztlich unumgänglich, bei jeder Probenserie die ersten 3 Injektionen zu verwerfen.

2.2.5 Einfluss des Ameisensäuregehaltes auf die Effizienz der ESI

Bei der Optimierung der chromatographischen Trennung (s. 2.2.1) wurde bewusst eine niedrige Ameisensäurekonzentration von 0,005 % (v/v) im Eluenten A verwendet, um mögliche Signalunterdrückungen zu vermeiden, die bei höheren Additiv- oder Pufferkonzentrationen im allgemeinen bei der ESI zu erwarten sind (s. 1.4.3.4).

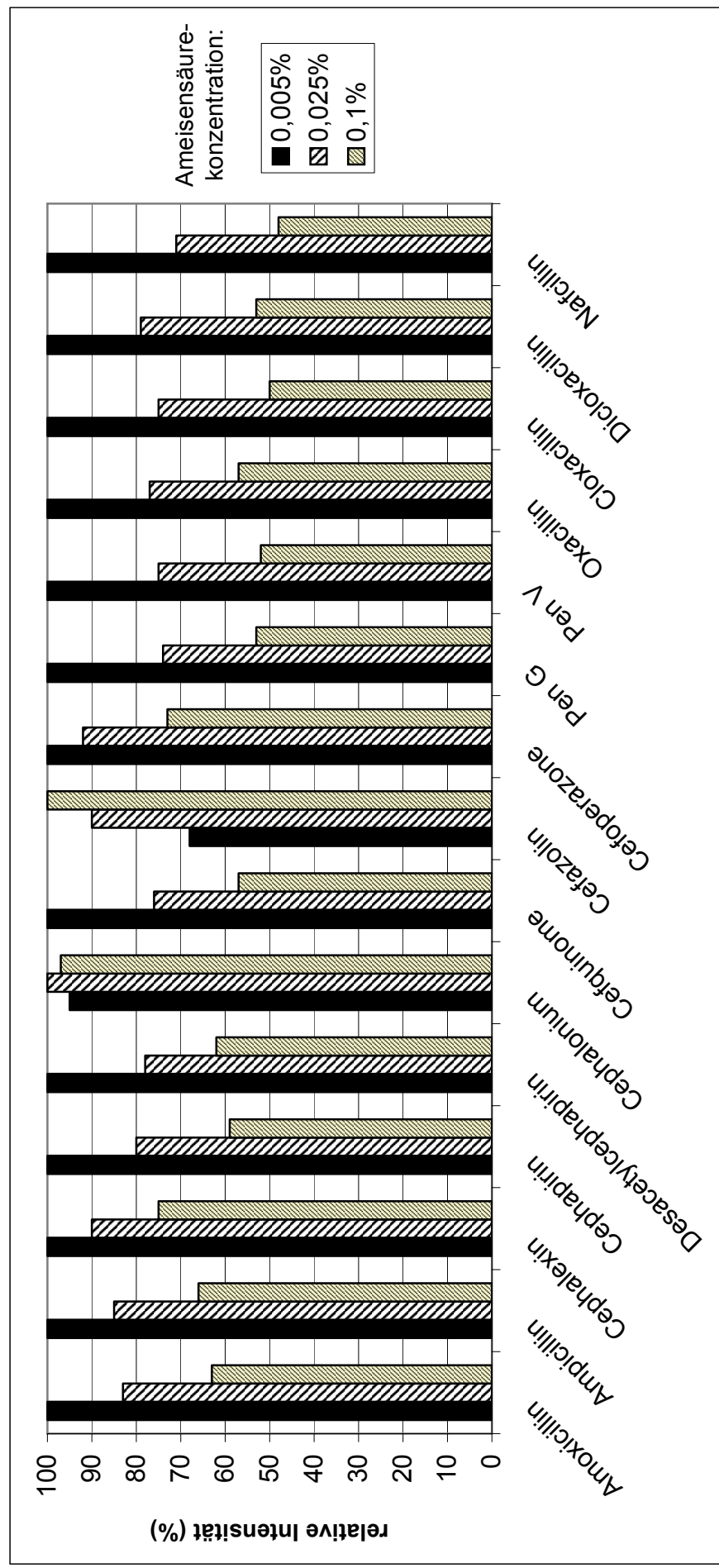


Abb. 29: Einfluss unterschiedlicher Ameisensäurekonzentrationen im Eluenten A auf die Signalintensität (n=3)

Unter den entwickelten Eluentenbedingungen, mit einer für die Chromatographie minimal notwendigen Ameisensäurekonzentration von 0,005 % (v/v), konnte eine gute und stabile Chromatographie aller in der Multimethode erfassten β -Lactame erzielt werden.

Darüber hinaus war es von Interesse, inwieweit höhere Ameisensäurekonzentrationen im Eluenten A die Elektrosprayeffizienz (Messempfindlichkeit) der einzelnen β -Lactame beeinflussen. Um den Einfluss höherer Säurekonzentrationen zu bestimmen, wurden drei verschiedene Eluenten A mit 0,005 % (v/v, pH 3,41), 0,025% (v/v, pH 3,11) und 0,1 % (v/v pH 2,80) Ameisensäure für die Chromatographie verwendet. Als Messlösung wurde ein Mix aller 15 β -Lactamantibiotika mit einer Konzentration von 50 ng/ml verwendet. Von dieser Messlösung wurden 20 μ l in das System injiziert und die erhaltenen Peakflächen gemessen.

Zu Auswertungszwecken wurde für jede getestete Ameisensäurekonzentration des Eluenten A der Standard insgesamt drei mal injiziert und daraus der Mittelwert der Peakflächen berechnet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 29 als relative Intensität zum jeweils höchsten Messwert in Prozent dargestellt.

Aus den Ergebnissen lässt sich erkennen, dass die niedrigste Ameisensäurekonzentration im Eluenten A von 0,005 % (v/v) für nahezu alle untersuchten β -Lactame die größte Messempfindlichkeit ermöglicht. Eine Ausnahme stellt Cefazolin dar, das mit höchster Empfindlichkeit bei einem Ameisensäuregehalt von 0,1 % (v/v) gemessen werden kann. Die Messempfindlichkeit der Substanz Cephalonium war bei allen drei Ameisensäurekonzentrationen nahezu konstant. Bei den monobasischen Penicillinen (Pen G, Pen V, Oxa, Clox, Diclox, Naf) führt eine Erhöhung des Ameisensäuregehaltes auf 0,1 % (v/v) zu einem hohen Empfindlichkeitsverlust von ca. 50%. Bei den amphoteren Aminopenicillinen (Amox, Amp) lag dieser bei ca. 35 %. Die Cephalosporine (Dcephap, Cephap, Cefqu) zeigten einen Empfindlichkeitsverlust von ca. 40%, während Cephalex und Cefo mit ca. 25 % den niedrigsten Verlust aufwiesen.

Prinzipiell wäre zumindest für die amphoteren Penicilline, bei einer Senkung des pH-Wertes um 0,6 pH Einheiten (höchste Ameisensäurekonzentration), eine deutliche Erhöhung der Sensitivität infolge der höheren positiven Ladung (berechnet über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung) um ca. den Faktor 2,8 zu erwarten gewesen.

Z.B. liegt Ampicillin bei einem pH-Wert von 3,4 (niedrigste Ameisensäurekonzentration) zu 16% und bei einem pH-Wert von 2,8 (höchste Ameisensäurekonzentration) zu 43 % positiv geladen in Lösung vor.

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die relative Elektrospray-Sensitivität vom pH-Wert des Eluenten unabhängig ist. Vielmehr führt die höhere Ameisensäurekonzentration und die damit verbundene Erhöhung des Elektrolytgehaltes zu einer Signalunterdrückung.

Das hier beobachtete Phänomen wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben und als „Wrong-way round-Ionisation“ bezeichnet [107, 108, 109]. Erklärbar ist dieses Phänomen durch eine beim Elektrosprayprozess stattfindende Senkung des pH-Wertes (positiver ESI-Modus) oder eine Erhöhung des pH-Wertes (negativer ESI-Modus) des Eluenten aufgrund stattfindender Redoxreaktionen an der Elektrospraynadel [45, 110, 111].

Ferner konnte von Gatlin et al. gezeigt werden, dass sich innerhalb der beim Elektrosprayprozess erzeugten Mikrotröpfchen ein inhomogener pH-Gradient ausbildet. Dieser inhomogene pH-Gradient führt zu einer Acidifizierung oder Alkalisierung der äußeren Tröpfchenoberfläche mit einer Schichtdicke von 5 bis 27 nm [112].

Abschließend lässt sich feststellen, dass die hier für die β -Lactame erhaltenen Ergebnisse die Theorie des IEM-Modells (s. 1.4.3.3 u. 1.4.3.4) bestätigen. Demnach wird eine maximale Messempfindlichkeit nur bei sehr niedrigen Additivkonzentrationen erzielt.

2.2.6 Optimierung der Extraktion/Aufreinigung für die Matrices Rindermuskel, Rinderniere und Milch

Bei allen bisher für die Rückstandsanalytik von β -Lactamantibiotikarückständen publizierten Verfahren wurden abhängig von der Probenmatrix sehr unterschiedliche Extraktions- und Aufreinigungsverfahren eingesetzt.

Um eine größtmögliche Vereinfachung der Probenaufarbeitung zu erreichen, war es deshalb das Ziel der zu entwickelnden LC-MS/MS-Multimethode, ein nahezu einheitliches Extraktions- und Aufreinigungsverfahren für die Matrices Rindermuskel, Rinderniere und Milch zu entwickeln.

Im allgemeinen setzt sich ein solches Verfahren aus zwei Hauptarbeitsschritten zusammen, die generell für physikalisch-chemische Analysenverfahren charakteristisch sind [113]:

- 1.) Extraktion der β -Lactame aus dem Probenmaterial und deren Abtrennung von Proteinen (Makromolekülen),
- 2.) Aufreinigung der gewonnenen Extrakte.

Jeder dieser einzelnen Schritte ist im Rahmen der Methodenentwicklung zu optimieren, um eine möglichst quantitative Extraktion der Wirkstoffe und deren Abtrennung von Matrixbestandteilen zu erzielen. Nur wenn diese Schritte ausreichend zuverlässig und robust sind, können die β -Lactame mit der LC-MS/MS-Messtechnik unter Einhaltung der EU Qualitätsanforderungen (s. 1.6) präzise quantifiziert werden.

2.2.6.1 Wahl der Extraktions- und Deproteinierungsbedingungen

Die Extraktion und Deproteinierung kann durch eine ganze Reihe unterschiedlicher Verfahren erreicht werden. Zum einen ist die Extraktion und Deproteinierung mittels Acetonitril, als organischem Lösungsmittel, das in der Literatur am häufigsten beschriebene Verfahren [63, 64, 31, 65, 32, 33, 75, 82, 83, 84, 85, 87, 93, 114, 115, 116, 117, , 118, 119].

Neben Acetonitril wurden als Lösungsmittel auch Ethanol [120], Methanol [121] und Aceton [122, 123] verwendet. Verfahren, bei denen auf die Deproteinierung durch den Einsatz von organischen Lösungsmitteln vollständig oder zum größten Teil

verzichtet wurde, verwendeten entweder Natrium-Wolframat/Schwefelsäure für die Extraktion und Deproteinierung [73, 86, 88, 92, 124, 125, 126, 127, 128, 129] oder direkt die Ultrafiltration nach vorheriger Zugabe eines organischen Lösungsmittels [54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 170]. Die Extraktion und Deproteinierung mit Trichloressigsäure wurde für die säurestabilen Penicilline beschrieben [71, 72, 74, 130, 131, 132, 133, 134].

Ein weniger häufig verwendetes Verfahren für die Extraktion stellt die MSPD-Technik (matrix-solid-phase-dispersion) dar. Hierbei werden Gewebeproben direkt mit C-18 modifiziertem Silikamaterial verrieben, in eine Leersäule gefüllt und mit einem organischen Lösungsmittel eluiert [135, 136].

Die Durchführung der Extraktion und Deproteinierung mit Acetonitril stellt jedoch unter Berücksichtigung der nachfolgend beschriebenen Punkte das geeignetste Verfahren für die zu entwickelnde LC-MS/MS-Multimethode dar:

- 1.) Acetonitril besitzt neben den sehr guten Deproteinierungseigenschaften die Fähigkeit als „drug releasing solvent“ zu wirken, indem es adsorptive Bindungen zwischen den β -Lactamen und den Proteinen löst [54, 89, 170]. Diese Eigenschaft ist besonders für die Extraktion der unpolaren Isoxazolyenicilline wichtig, da diese eine besonders starke Proteinbindung aufweisen;
- 2.) Gegenüber anderen organischen Lösungsmitteln besitzt Acetonitril hervorragende Deproteinierungseigenschaften, deren Wirksamkeit in folgender Reihenfolge abnimmt: Acetonitril > Aceton > Ethanol > Methanol [137]. Ferner ist Methanol als Extraktionslösungsmittel weit weniger geeignet, da es einen schnellen Abbau der Penicilline unter Bildung von Penicillin-Methylestern verursacht [138];
- 3.) Die Natriumwolframat/Schwefelsäurefällung wurde aufgrund der geringeren Extraktionseffizienz im Vergleich zu Acetonitril [87] und die Säureextraktion mit z.B. Trichloressigsäure wegen der Säurelabilität von Penicillin G als ebenfalls weniger geeignet betrachtet;
- 4.) Die an sich schnell durchzuführende Ultrafiltration ist auf die Matrix Milch beschränkt;

- 5.) Auf die Verwendung der MSPD wurde verzichtet, da in der Regel mit diesem Extraktionsverfahren nur eine unscharfe und unvollständige Elution der Penicilline aus der MSPD-Säule zu erreichen ist [139].

Die mittels der Acetonitril-Extraktion (s. 3.1.5.1) primär erhaltenen Probenextrakte waren klar und frei von Geweberesten, was auf die sehr guten Deproteinierungseigenschaften von Acetonitril zurückzuführen ist. Abhängig von der Probenmatrix waren die Extrakte unterschiedlich stark gefärbt. Die Extrakte von Niere und Milch zeigten eine gelbliche Farbe, die Muskelextrakte waren farblos.

Während der gesamten Probenaufarbeitung wurde möglichst auf Glasgefäße verzichtet, um Adsorptionsverluste zu vermeiden [140, 126]. Aus diesem Grund wurden alle Extraktionsschritte in Polypropylengefäßen durchgeführt. Die verwendeten Glaskölbchen, in denen die Acetonitrilentfernung stattfand, wurden zuvor mit einer 10 % DCMS in Toluol silyliert.

2.2.6.2 Aufreinigung (Clean-up) der Acetonitril-Extrakte

Wegen der hohen Spezifität des LC-MS/MS-Systems wurde in Vorversuchen geprüft, ob die primär erhaltenen Acetonitrilextrakte nach der Lösungsmittelentfernung direkt ohne weitere Aufreinigungsschritte gemessen werden können.

Diese an sich zeitsparende Vorgehensweise, bei dem in das LC-MS-System nahezu unaufgereinigte Extrakte injiziert werden, wird in der Literatur häufig als „dilute and shoot“ bezeichnet [53].

Die Ergebnisse aus Vorversuchen mit der Matrix Rinderniere zeigten, dass prinzipiell die Injektion solcher minimal aufgereinigter Extrakte und das Messen der darin enthaltenen β -Lactame möglich ist. Jedoch führte der hohe Gehalt an Matrixkoextraktiven in der Messlösung, besonders für das hochpolare Amoxicillin, zu chromatographischen Problemen mit völlig verzerrten Peaks (s. Abb. 30) und zu Signalunterdrückungen. Ferner waren die Extrakte, insbesondere die Nierenextrakte, nicht stabil. Selbst nach vorheriger Filtrierung bildeten sich nach einer Standzeit von ca. 2 Stunden erneut Trübungen und Niederschläge, was letztlich deren Injektion unmöglich machte.

Die Ergebnisse aus den durchgeführten Vorversuchen zeigten, dass es unumgänglich ist, die primär erhaltenen Acetonitrilextrakte weiter aufzureinigen, um eine selektive und robuste Chromatographie zu erreichen.

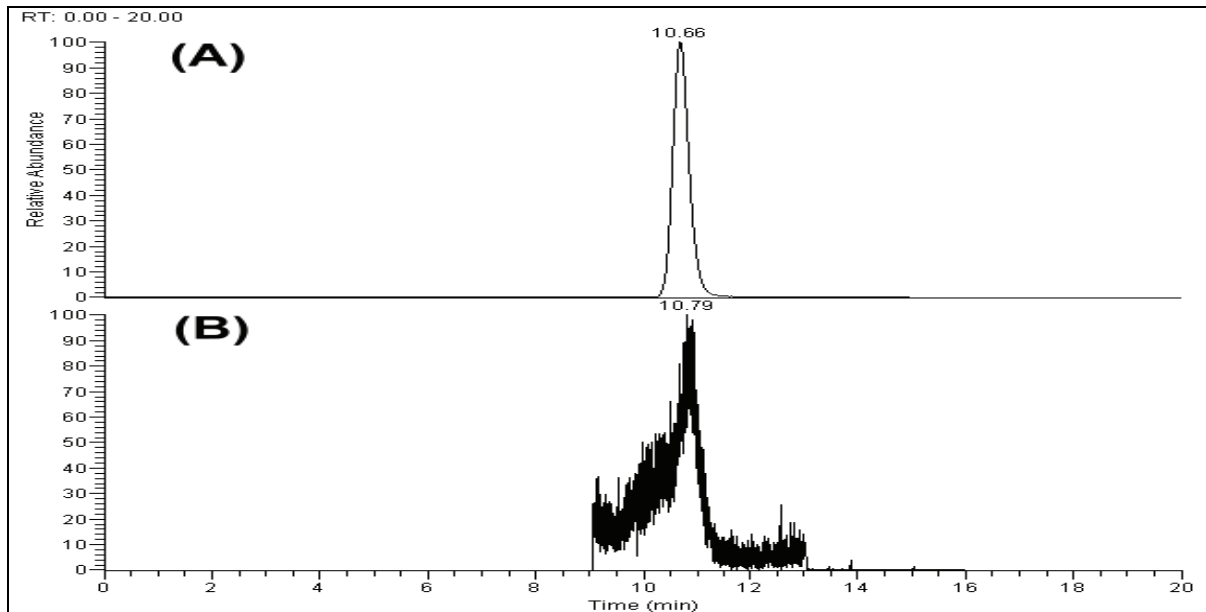


Abb. 30: Einfluss eines unaufgereinigten Nierenextraktes auf die Chromatographie von Amoxicillin. (A) Mittels SPE aufgereinigter Nierenextrakt. (B) Unaufgereinigter Nierenextrakt. Die dotierte Konzentration betrug 50 µg/kg.

2.2.6.2.1 Wahl des Aufreinigungsverfahrens

Die Festphasenextraktion (SPE) stellt das meist beschriebene Verfahren in der Literatur dar, um die primär erhaltenen Probenextrakte aufzureinigen und aufzukonzentrieren. Dabei kamen überwiegend Reversed-Phase (Umkehrphasen) [63, 31, 66, 67, 32, 70, 71, 74, 33, 87, 88, 90, 92, 117, 122, 125, 126, 127, 128, 129, 134, 141, 142, 143, 144] und weniger häufig Kationenaustauscher [124] sowie Graphitphasen [68] zum Einsatz. Vereinzelt wurden Umkehrphasen- sowie Ionenaustausch-Aufreinigungsschritte miteinander kombiniert, um die Selektivität der Aufreinigung zu erhöhen [73, 86].

Die Flüssig/Flüssig-Verteilung zwischen wässrigen Puffern und organischen Lösungsmitteln [69, 75, 93] sowie die HPLC-Fraktionierung [82, 83, 84, 92, 114, 115, 118, 119] wurden ebenfalls beschrieben.

Die in der Multimethode zu erfassenden β -Lactamantibiotika stellen eine Klasse von Verbindungen dar, die sich hinsichtlich ihrer Polarität (log P-Wert) und ihres Ladungszustandes in Lösung (monobasisch, amphoter) sehr stark unterscheiden. Das amphotere Amoxicillin stellt das polarste und das monobasische Dicloxacillin das unpolare zu messende β -Lactam dar.

Aufgrund dieser großen Diversität innerhalb der Gruppe der β -Lactame wurde die Aufreinigung der Probenextrakte an einer Reversed-Phase SPE-Kartusche, unter Berücksichtigung der nachfolgend beschriebenen Punkte, als am geeignetsten betrachtet:

- 1.) Die Flüssig/Flüssig-Verteilung, die bei einem sauren pH-Wert durchgeführt werden muss, ist nur für die monobasischen Penicilline mit neutralen Seitenketten, jedoch nicht für die amphoteren Penicilline anwendbar. Darüber hinaus ist bei dieser Vorgehensweise der saure pH-Wert als kritisch für die Stabilität des säurelabilen Penicillins G zu betrachten.
- 2.) Eine Aufreinigung mittels eines Kationenaustauschers besitzt wie die Flüssig/Flüssig-Verteilung den Nachteil, ausschließlich für eine begrenzte Anzahl von β -Lactamen (amphotere β -Lactame) anwendbar zu sein.
- 3.) Obwohl die Verwendung eines Anionenaustauschers für die Aufreinigung aller β -Lactame geeignet sein sollte, zeigten die unter 2.2.6.2.2 hierzu durchgeführten Untersuchungen, dass dieser für die amphoteren β -Lactame weniger geeignet ist als für die monobasischen.

2.2.6.2.2 Test einer Anionenaustauscher SPE-Kartusche

Alle β -Lactame besitzen als Gemeinsamkeit eine saure Carboxylgruppe, weshalb ihre Aufreinigung an einer Anionenaustauscher SPE-Kartusche theoretisch möglich sein sollte. Bis jetzt wurde der Einsatz eines Anionenaustauschers für die Probenaufreinigung in der Literatur ausschließlich für die monobasischen Penicilline beschrieben [73, 145].

In dieser Arbeit sollte in Vorversuchen die Eignung einer Anionenaustauscher SPE-Kartusche, sowohl für die Aufreinigung von amphoteren β -Lactamen als auch von monobasischen β -Lactamen, untersucht werden. Als Modellsubstanzen dienten die amphoteren β -Lactame (Ampicillin, Cephalexin) und monobasischen β -Lactame (Pen V und Oxacillin).

Um eine maximale Retention aller β -Lactame auf dem Anionenaustauscher zu gewährleisten, erfolgte die Aufgabe bei einem pH-Wert von 9,5 (zwei pH-Einheiten oberhalb des pK_s -Wertes der Aminogruppe der amphoteren β -Lactame). Es kann so sichergestellt werden, dass alle β -Lactame vollständig negativ geladen in der Aufgabelösung vorliegen.

Nach der Aufgabe des Standardmixes (200 ng je β -Lactam) erfolgte die Elution der vier β -Lactame mit 4 ml eines 0,1 M Citratpuffers (pH 7). In Tab. 13 sind die erhaltenen Wiederfindungen dargestellt.

Tab. 13: Erhaltene Wiederfindungen an einer Anionenaustauscher SPE-Kartusche (n=3). Die aufgegebene Substanzmenge betrug absolut 100 ng je β -Lactam

β -Lactam	Ampicillin	Cephalexin	Penicillin V	Oxacillin
Wiederfindung (%)	39	30	83	88

Prinzipiell wäre aufgrund des pH-Wertes der Aufgabelösung von 9,5 eine gleich gute Wiederfindung aller β -Lactame mit der Anionenaustauscher SPE-Kartusche zu erwarten gewesen.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Wiederfindungen für die monobasischen β -Lactame mit 83 % für Pen V und 88 % für Oxacillin deutlich über denen der amphoteren liegen. Möglicherweise lassen sich die niedrigeren Wiederfindungen für Ampicillin und Cephalexin durch sekundäre Wechselwirkungen zu den Restsilanolgruppen des Silikagels erklären.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei einem Test von silikabasierenden Reversed-Phase SPE-Kartuschen für die Aufreinigung der amphoteren β -Lactame unter Punkt 2.2.6.2.4 gemacht.

Die Verwendung des Anionenaustauschers ist somit nicht gleichermaßen gut für die Aufreinigung der monobasischen und der amphoteren β -Lactame geeignet. Darüber hinaus sollte bei der Verwendung von Ionenaustauschern generell berücksichtigt werden, dass die Retention der β -Lactame sehr stark vom Salzgehalt der Aufgabelösung abhängt [67]. Hohe Natriumchloridgehalte, wie sie nach der Acetonitrilentfernung (s. 2.2.6.2.3) im wässrigen Extrakt vorhanden sind, wären für den Anionenaustauscher nicht tolerierbar, da diese eine sofortige Elution der Verbindungen verursachen würde.

2.2.6.2.3 Acetonitril- und Fettentfernung für die weitere Aufreinigung mittels Reversed-Phase SPE

Die direkte Aufgabe der primär erhaltenen Acetonitrilextrakte auf Reversed-Phase SPE-Kartuschen ist nicht möglich, da der hohe Lösungsmittelgehalt eine Retention

der β -Lactame auf dem Sorbens vollständig verhindern würde. Das Acetonitril muss deshalb vor der Aufgabe entfernt werden.

In Vorversuchen zeigte sich, dass die Entfernung größerer Acetonitrilmengen (> 10 ml) am effektivsten und schnellsten mittels eines Rotationsverdampfers erreicht werden konnte. Andere getestete Möglichkeiten zur Lösungsmittelentfernung, wie die Verwendung einer Vakuumzentrifuge oder eines Heating-Moduls, waren aufgrund der langsamen Lösungsmittelentfernung ungeeignet.

Während der Acetonitrilentfernung aus den primären Probenextrakten mittels des Rotationsverdampfers trat im Gegensatz zu reinem Acetonitril ein starkes Schäumen auf. Es war so unmöglich, eine konstante und schnelle Lösungsmittelentfernung zu erreichen.

Durch Zugabe einer gesättigten Kochsalzlösung (ca. 20 %) wurde dieses Schäumen verhindert und eine scharfe Phasentrennung in eine untere wässrige Phase und in eine obere Acetonitrilphase stellte sich ein. Dies ermöglichte eine schnelle Acetonitrilentfernung.

Durch die Zugabe der Kochsalzlösung wurde zusätzlich verhindert, dass die Extrakte bis zur Trockne einengen, was bei den β -Lactamen zu hohen Substanzverlusten führt [140]. Die Dauer der Acetonitrilentfernung betrug ca. 15 Minuten je Probe. Unter Verwendung von zwei Rotationsverdampfern konnten 12 Proben innerhalb von 90 Minuten abrotiert werden.

Die nach der Acetonitrilentfernung erhaltenen Extrakte von Muskulatur und Niere waren zum Teil noch relativ trüb und enthielten feste Fettpartikel. Um ein Verstopfen der SPE-Kartuschen zu vermeiden, mussten die Schwebstoffe und Fettpartikel entfernt werden. Dies gelang am effizientesten durch Versetzen der Extrakte mit einem definierten Volumen Phosphatpuffer und nachfolgendem Zentrifugieren. Es bildete sich dabei eine obere Fettphase aus, welche leicht entfernt werden konnte (s. 3.1.5.2).

2.2.6.2.4 Vergleich unterschiedlicher Reversed-Phase Sorbentien für die SPE

Für die Durchführung der Reversed-Phasen SPE stehen eine ganze Reihe unterschiedlicher, kommerziell erhältlicher Sorbentien zur Verfügung. Diese basieren entweder auf Polymerharzbasis oder auf oberflächenmodifizierter Kieselgelbasis. Bei den Polymerphasen handelt es sich entweder um Polymere aus Styrol und Divinylbenzol oder um Polymere aus N-Vinylpyrrolidon und Divinylbenzol. Letztere

besitzen neben den rein hydrophoben Eigenschaften auch hydrophile Eigenschaften und dadurch eine gute Benetzbarkeit mit Wasser.

Diese Wasserbenetzbarkeit soll unter anderem zu einer verbesserten Extraktion von hochpolaren Verbindungen aus wässrigen Lösungen beitragen [146]. Darüber hinaus besitzen Polymerphasen eine sehr hohe Bindungskapazität von ca. 30 %, die ca. 10 mal höher ist als bei silikabasierenden Sorbentien [147]. Ein weiterer Vorteil der Polymersorbentien ist das Fehlen von aktiven Oberflächen (Restsilanolgruppen), die mit den Analyten sekundäre Wechselwirkungen eingehen können.

Insgesamt wurden drei verschiedene SPE-Kartuschen miteinander verglichen, um die am besten geeignete, in Bezug auf die erreichbaren Wiederfindungen, auswählen zu können. Die eine Kartusche enthielt 60 mg Polymerharz (Waters Oasis HLB), synthetisiert aus den beiden Monomeren N-Vinylpyrrolidon und Divinylbenzol, die beiden anderen Kartuschen (Waters tc-18, Macherey&Nagel Chromabond C18-ec) enthielten 500 mg eines C-18 oberflächenmodifizierten Kieselgels.

Die Kartuschen wurden getestet, indem ein Mix aller für die Methode relevanten β -Lactame mit einer Absolutmenge von 150 ng je β -Lactam aufgegeben wurde. Es war dabei wichtig, die β -Lactame bei einem pH-Wert von 8,5 (0,05 M Phosphatpuffer) aufzugeben, da nur unter diesen leicht alkalischen Bedingungen eine maximale Retention des amphoteren Amoxicillins zu erreichen ist [88].

Nach der Aufgabe des Substanzmixes und einem Waschschrift mit 1 ml Wasser wurden die β -Lactame mit 3 ml einer Mischung aus 50 % Wasser und 50 % Acetonitril (v/v) eluiert (s. 3.1.5.3).

Dieses Eluat konnte aufgrund des hohen Acetonitrilgehaltes und der daraus resultierenden hohen Elutionskraft nicht direkt zur HPLC eingesetzt werden. Das im Eluat enthaltene Acetonitril (1,5 ml) wurde deshalb mittels eines Stickstoffstromes am Heating-Modul bei 40°C entfernt. Nach der Einstellung eines Endvolumens von 2 ml mit Wasser wurden 20 μ l in das LC-MS/MS-System injiziert.

Tab. 14: Erzielte Wiederfindungen für die drei getesteten Reversed-Phase SPE-Kartuschen (n=2)

β-Lactam	Oasis HLB (WDF %)	Waters tc-18 (WDF%)	Chromabond C-18-ec (WDF %)
Amoxicillin	102	73	9
Ampicillin	105	76	36
Cephalexin	106	103	58
Cephapirin	104	106	79
Cephalonium	105	104	61
Cefquinome	91	79	52
Cefazolin	97	108	61
Cefoperazon	101	100	97
Pen G	103	92	86
Pen V	107	103	84
Oxacillin	110	106	88
Cloxacillin	104	104	77
Dicloxacillin	106	104	58
Nafcillin	107	107	76

Die Ergebnisse in Tab. 14 zeigen, dass die SPE-Kartusche mit Polymerharz im Vergleich zu den beiden silikabasierenden SPE-Kartuschen eine vollständige Wiederfindung für alle untersuchten β-Lactame ermöglicht. Besonders auffällig war bei den silikabasierenden SPE-Kartuschen die niedrige Wiederfindung für Amoxicillin und Ampicillin.

Eine Erklärung kann neben der geringeren Retention, wegen der hohen Hydrophilie dieser Substanzen, in sekundären Wechselwirkungen mit den Restsilanolgruppen des Silikagels gefunden werden.

Es ist allgemein bekannt, dass besonders Aminogruppen enthaltende Verbindungen, wozu auch die amphoteren β-Lactame Amoxicillin und Ampicillin zählen, stark an aktive Oberflächen adsorbiert werden [148]. Dabei sind diese Effekte um so ausgeprägter, je unvollständiger das C-18 Material bei der Herstellung desaktiviert (endcapped) wurde. Die Annahme der Adsorption ist vor allem deshalb am wahrscheinlichsten, da im Effluat der C-18 SPE-Kartuschen keine β-Lactame nachweisbar waren.

Da die SPE-Kartusche mit Polymerharz im Vergleich zu den beiden silikabasierenden SPE-Kartuschen für die Extraktion der β-Lactame am besten geeignet ist, wurde diese zur weiteren Aufreinigung der Extrakte nach dem Acetonitrilentfernungsschritt (s. 2.2.7.2.3) verwendet.

2.2.7 Auswirkungen der Matrixkoextraktive auf die Elektrosprayionisation

ESI-LC-MS/MS-Instrumente besitzen aufgrund der Tandem-MS-Möglichkeit gegenüber den konventionellen HPLC-UV/DAD-Instrumenten eine sehr hohe Selektivität. Matrixkoextraktive, die in den Probenextrakten von komplexen Matrices häufig in großen Mengen vorkommen, sind bei der MS/MS-Detektion im Gegensatz zur UV/DAD-Detektion für den Analytiker nicht direkt sichtbar.

Jedoch können diese „ungesehenen“ Matrixkoextraktive die ESI stark beeinflussen, was dazu führen kann, dass die gemessenen Peakflächen der Substanzen in Matrix stark von den gemessenen Peakflächen der reinen wässrigen Standards, in denen keine Matrixkoextraktive enthalten sind, abweichen. Es treten dabei entweder Signalerhöhungen „signal enhancement effects“ oder Signalunterdrückungen „signal suppression effects“ auf. Das Auftreten dieser sogenannten Matrixeffekte wurde bereits vielfach in der Literatur bei der Analyse von Substanzen in komplexen Matrices beschrieben [149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 51].

Es ist deshalb bei der hier durchzuführenden Methodenentwicklung unumgänglich, diese möglichen Matrixeffekte zu untersuchen, zu identifizieren und diese bei deren Auftreten zu berücksichtigen. Ohne eine Berücksichtigung dieser Matrixeffekte würde es zwangsläufig zu großen Quantifizierungsfehlern und zu einer nicht abschätzbaren Messunsicherheit kommen, wenn lediglich über externe Kalibriergeraden der reinen Standards quantifiziert werden würde.

Eine Möglichkeit, diese Matrixeffekte zu identifizieren, besteht darin, die fertigen Blind-Probenextrakte nachträglich mit den β -Lactamen zu dotieren und die Wiederfindungen mittels externer Kalibriergeraden zu bestimmen. Eine Wiederfindung, die sich von 100 % unterscheidet, kann somit direkt auf die Matrixkoextraktive zurückgeführt werden, die sich nicht in der Standardlösung befinden. Für die Durchführung dieser Untersuchung wurden fünf Rohmilchproben von fünf verschiedenen Milchkühen und fünf Rindermuskel- und Rindernierenproben von zwei Kälbern, zwei Färsen und einer Kuh aufgearbeitet und die erhaltenen Extrakte nachträglich „post extraction“ mit einem Mix aller 15 β -Lactame an deren jeweiligem MRL dotiert. Zusätzlich wurden sechs handelsübliche H-Milchproben untersucht, um zu prüfen, ob die industriell hergestellte H-Milch andere Matrixeffekte verursacht als unbehandelte Rohmilch. Die β -Lactame, für die aktuell keine MRL

Werte in Rindermuskel und Rinderniere festgelegt sind, wurden mit jeweils 50 ng/ml dotiert. Penicillin V wurde in Milch mit 10 ng/ml zudotiert. Die Auswirkungen der Matrixkoextraktive auf die ESI der β -Lactame sind in Tab. 15 dargestellt.

Tab. 15: Einfluss der Matrixkoextraktive auf die ESI der β -Lactame in den verschiedenen Matrices in % (jeweils 5 Proben unterschiedlicher Herkunft). Negative Werte entsprechen einer **Signalunterdrückung, positive Werte entsprechen einer **Signalerhöhung**.**

β -Lactam	Matrixeffekt Rohmilch (%)	Matrixeffekt H-Milch (%)	Matrixeffekt Rindermuskel (%)	Matrixeffekt Rinderniere (%)
Amoxicillin	(*)	- 56	(*)	- 20,8
Ampicillin	- 9,8	- 25	- 5,6	- 18,8
Cephalexin	- 8,0	- 21	- 5,0	- 11
Cephapirin	- 3	- 22	- 6,6	- 10,8
Desacetyl-Cephapirin	- 10,8	(**)	- 8,8	- 16,6
Cephalonium	+ 36,0	+ 22	+ 28,4	+ 28,6
Cefquinome	+ 28,2	(*)	+ 14,4	+ 100,4
Cefazolin	+ 18,8	- 58	+ 18,6	+ 8,8
Cefoperazon	(*)	- 43	(*)	- 33,4
Pen G	+ 19,4	- 47	+ 10,2	- 11,8
Pen V	+ 24,8	- 21	+ 16,2	- 13,0
Oxacillin	+ 30,6	- 11	(*)	(*)
Cloxacillin	+ 25,6	(*)	(*)	(*)
Dicloxacillin	+ 31,4	+ 17	(*)	- 19,8
Nafcillin	+ 22,8	+ 10	- 12,0	(*)

(*) n. s. = nicht signifikant, t-test (95%), (**) wurde nicht bestimmt

In den Abb. 31 bis 34 sind die Auswirkungen der Matrixeffekte grafisch dargestellt. Die abgebildeten Fehlerbalken entsprechen der einfachen Standardabweichung aus den Werten der gemessenen Einzelproben (n=5).

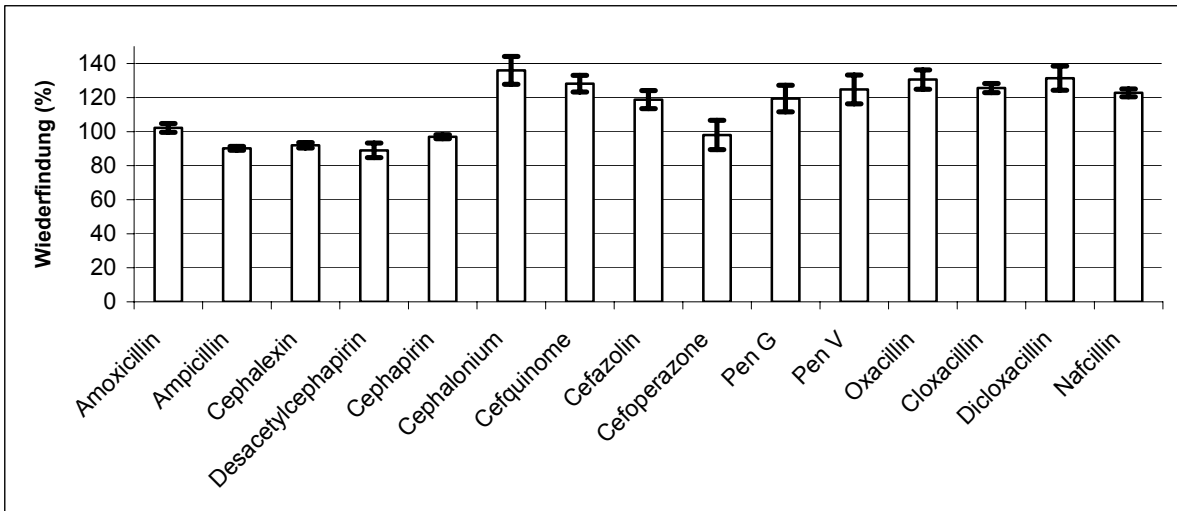


Abb. 31: Einfluss der Matrixkoextraktive auf die ESI der β -Lactame im Extrakt von 5 Rohmilchproben unterschiedlicher Herkunft

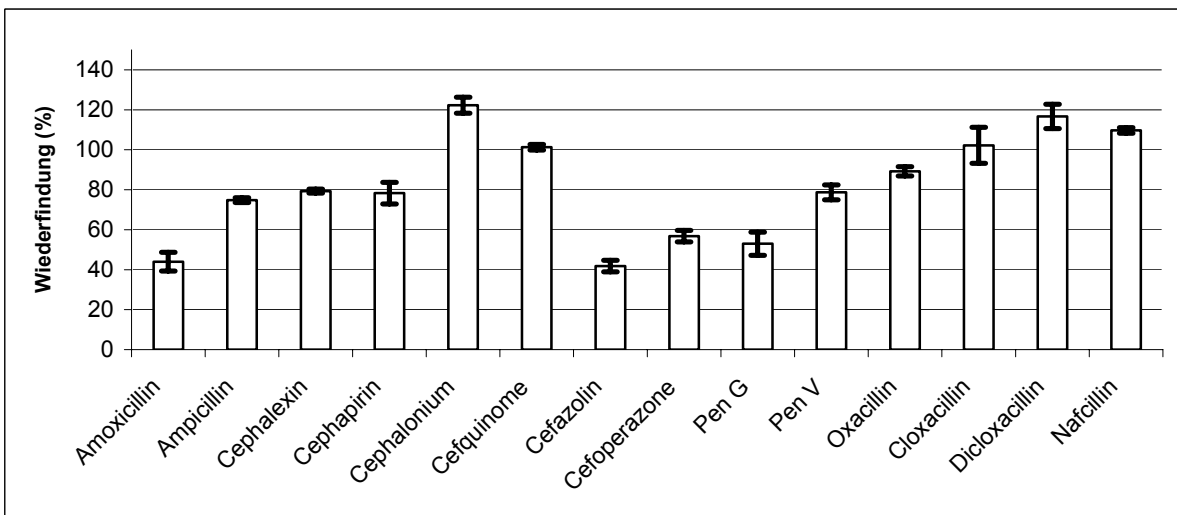


Abb. 32: Einfluss der Matrixkoextraktive auf die ESI der β -Lactame im Extrakt von 5 H-Milchproben unterschiedlicher Hersteller

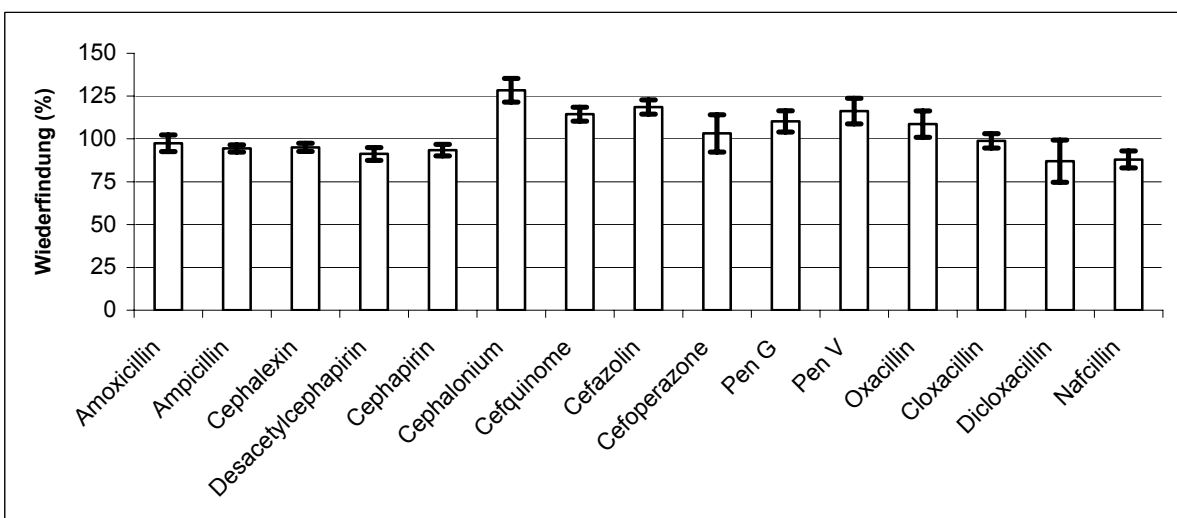


Abb. 33: Einfluss der Matrixkoextraktive auf die ESI der β -Lactame im Extrakt von 5 Rindermuskelproben unterschiedlicher Herkunft

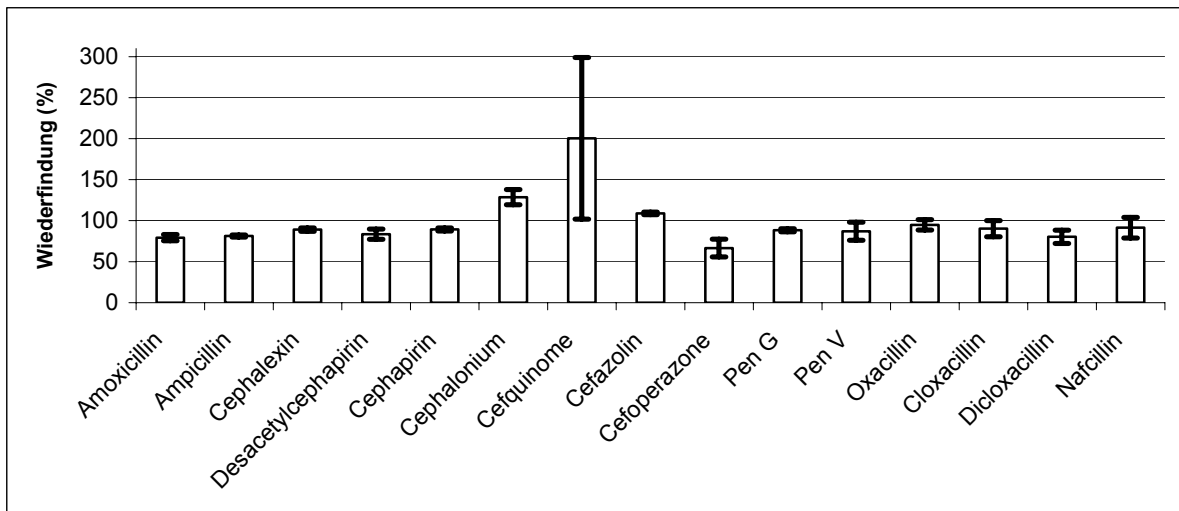


Abb. 34: Einfluss der Matrixkoextraktive auf die ESI der β -Lactame im Extrakt von 5 Rindernierenproben unterschiedlicher Herkunft

Die Untersuchungen zeigten, dass signifikante Signalunterdrückungen sowie signifikante Signalerhöhungen für die β -Lactame in allen untersuchten Matrices (Milch, H-Milch, Rinderniere, Rindermuskel) zu beobachten waren.

Diese Effekte waren dabei sehr stark von der untersuchten Matrix abhängig. Nierenextrakte und H-Milchextrakte beeinflussten die Ionisation der β -Lactame am stärksten, die Effekte bei Rohmilch- und Rindermuskelextrakten waren jedoch weniger stark ausgeprägt.

Die mechanistischen Aspekte, die hinter diesen Matrixeffekten stehen, wurden im Theoretischen Teil unter (1.4.3.4 u. 1.4.3.5) beschrieben.

Wie sich aus den in den Abb. 30 - 34 dargestellten Standardabweichungen erkennen lässt, schwanken die Matrixeffekte zwischen den verschiedenen Proben einer Matrix nicht stark. Die Werte sind normalverteilt und besitzen eine kleine Standardabweichung.

Es war deshalb möglich, Matrixeffektfaktoren für die β -Lactame zu berechnen, welche signifikant beeinflusst (t-Test, 95%) sind. Diese Faktoren wurden später bei der Methodvalidierung (siehe 2.5), die mittels externer Kalibriergeraden durchgeführt wurde, zusammen mit den Wiederfindungsfaktoren zur Korrektur der Ergebnisse verwendet.

Es war jedoch nicht möglich, einen Matrixeffektfaktor für Cefquinome in Rinderniere zu berechnen, da Cefquinome als einziges β -Lactam in den verschiedenen Proben stark schwankende, nicht normalverteilte Signalerhöhungseffekte zeigte. Die einzelnen Wiederfindungen waren: Kalb 1 (135 %), Kalb 2 (128 %), Kuh (296 %),

Färsen 1 (123 %) und Färsen 2 (320 %). Die mögliche Kompensation dieser Effekte wird unter 2.2.7.1 beschrieben.

2.2.7.1 Kompensation der Matrixeffekte am Beispiel von Cefquinome und Cephalonium in Rindernierenextrakt mittels des Standardadditionsverfahrens

Die typische Vorgehensweise, Matrixeffekte oder eine unvollständige Wiederfindung bei bioanalytischen Methoden zu kompensieren, ist die Verwendung eines geeigneten internen Standards. Für Methoden mit konventionellen Detektoren, wie z.B. dem UV/DAD-Detektor, besitzt der interne Standard vor allem die Aufgabe, Variabilitäten bei der Probenaufarbeitung (Analytverluste) zu kompensieren. Jedoch muss der interne Standard bei LC-MS/MS-Methoden mit ESI zusätzlich Variabilitäten auf Seiten der Ionisation kompensieren können, die durch koeluiierende Matrixkoextraktive verursacht werden.

Für LC-MS/MS-Methoden mit ESI kommen ausschließlich stabilisotopenmarkierte- oder strukturell sehr ähnliche Verbindungen, die mit dem Analyten zeitgleich eluieren (Koelution), als interne Standards für die Kompensation in Frage [149, 150, 160].

Die gleichen Anforderungen bezüglich der Wahl des Internen Standards gelten auch für andere massenspektrometrische Verfahren wie z.B. bei der GC/MS. Von Preu et al. [164] konnte gezeigt werden, dass eine richtige und präzise Quantifizierung von Penicillin G mittels GC/MS erst durch die Verwendung des von Schlösser et al. [165] synthetisierten $^{13}\text{C}_2$ Penicillin G, als Interner Standard, gelang. Dagegen war die Verwendung von Penicillin V als Interner Standard ungeeignet.

Die oben durchgeführten Matrixeffekt-Untersuchungen zeigten, dass jedes β -Lactam individuell und unterschiedlich stark durch Matrixeffekte beeinflusst wurde. Für eine Kompensation dieser Matrixeffekte wäre deshalb für jedes einzelne β -Lactam ein Interner Standard notwendig. Optimal wäre der Einsatz von stabilisotopenmarkierten β -Lactam Standards. Diese Möglichkeit ist jedoch kaum realisierbar, da diese Standards zum jetzigen Zeitpunkt kommerziell nicht erhältlich sind und deren Synthese zu aufwendig und zu teuer wäre.

Eine weitere auch in der Literatur beschriebene Methode zur Matrixeffektkompensation ist die kontinuierliche Zugabe eines strukturanalogen Internen Standards zum HPLC-Effluent mittels einer Spritzenpumpe [151]. Dieser

Ansatz wurde jedoch nicht verfolgt, da für die praktische Umsetzung eine weitere HPLC-Pumpe benötigt worden wäre.

Bei nahezu allen bisher publizierten LC-MS-Verfahren für die Analytik von β -Lactamen wurden Matrixeffekte beobachtet. Eine gezielte Untersuchung dieser Matrixeffekte, insbesondere die Identifizierung von variablen Matrixeffekten in Abhängigkeit der Probenherkunft, wurde in diesen Arbeiten jedoch nicht beschrieben oder untersucht. Generell wurden bei allen Verfahren Matrixkalibriergeraden für die Quantifizierung verwendet, um eine Kompensation dieser Matrixeffekte zu erreichen. Diese Vorgehensweise ist jedoch nur dann anwendbar, wenn sichergestellt werden kann, dass die Matrixeffekte für die zu analysierende Verbindung durch die Probenmatrix, wie auch durch die für die Matrixkalibrierung verwendeten analytischen Matrix, identisch sind.

Für die Substanz Cefquinome war diese Voraussetzung in Rindernierenextrakt nicht gegeben (s. 2.2.7), da dieses Cephalosporin in allen fünf untersuchten Rindernierenextrakten stark schwankende Signalerhöhungen zeigte. Unter diesen Bedingungen ist sowohl die Quantifizierung über externe Standardkalibriergeraden, als auch die Quantifizierung über Matrixkalibriergeraden, die in den Publikationen verwendete Quantifizierungsmethode, ungeeignet.

Ein Quantifizierungsverfahren, mit dem gleichzeitig Matrixeffekte kompensiert werden können, stellt das Standardadditionsverfahren dar. Bei diesem einfach durchzuführenden Verfahren werden keine stabilisotopenmarkierten- oder strukturanalogen Substanzen benötigt. Vielmehr wird die zu messende Substanz selbst als Leitsubstanz verwendet.

Im folgenden wird die Tauglichkeit dieses Verfahrens zur Quantifizierung von Cefquinome und Cephalonium in Rindernierenextrakt und die Eignung zur Matrixeffektkompensation beschrieben. Die Vorgehensweise ist unter Punkt 3.1.7.1 beschrieben.

Die erhaltenen Wiederfindungen beider Quantifizierungsverfahren (Externe Quantifizierung, Standardadditionsmethode) sind für Cefquinome und Cephalonium in den Abb. 35 u. 36 grafisch dargestellt.

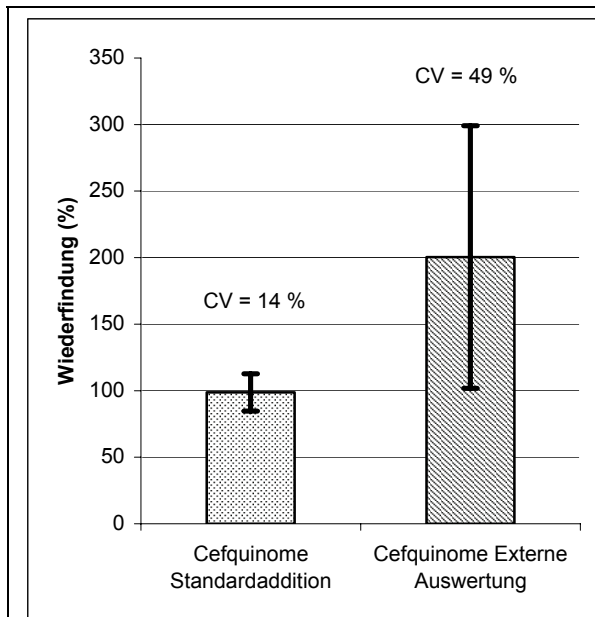


Abb. 35: Ermittelte Cefquinomegehalte (200 ng/ml dotiert) von 5 untersch. Blindnierenextrakten, unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Quantifizierungsverfahren

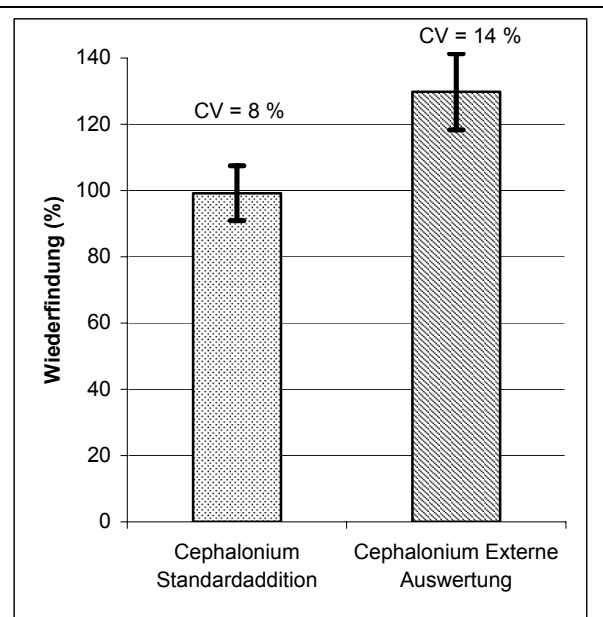


Abb. 36: Ermittelte Cephaloniumgehalte (50 ng/ml dotiert) von 5 untersch. Blindnierenextrakten, unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Quantifizierungsverfahren

Durch die Quantifizierung der Gehalte von Cefquinome und Cephalonium in den 5 verschiedenen Rindernierenextrakten mittels des Standardadditionsverfahrens konnten die durch die koeludierenden Matrixkoextraktive verursachten Signalerhöhungen auf Seiten der ESI und die schlechte Präzision nahezu vollständig kompensiert werden.

Das Standardadditionsverfahren stellt somit das geeignete Quantifizierungsverfahren für die in der LC-MS/MS-Methode erfassten β -Lactame dar. Prinzipiell ist das Standardadditionsverfahren unverzichtbar, wenn es darum geht, β -Lactame in unbekanntem, komplexen Matrices mittels ESI-LC-MS/MS genau und präzise zu quantifizieren.

Aus diesem Grund wurden die typischen Wiederfindungen, welche zur Berechnung der Wiederfindungsfaktoren verwendet werden (s. 2.2.9), unter Einsatz dieser Quantifizierungsmethode ermittelt.

2.2.8 Umwandlung von Cephapirin zu Desacetyl-Cephapirin in Gewebemhomogenaten

Untersuchungen zum Ausscheidungsverhalten von Cephapirin bei medikamentierten Tieren zeigten, dass dieses Cephalosporin nach parenteraler Verabreichung partiell zum mikrobiell aktiven Desacetyl-Cephapirin und Essigsäure metabolisiert wird [166]. Aufgrund dieser Metabolisierung wurde für Cephapirin in der Verordnung (EWG) 2377/90 ein MRL für die Summe aus Cephapirin und Desacetyl-Cephapirin festgesetzt. Die stattfindende Metabolisierung ist in Abb. 37 dargestellt.

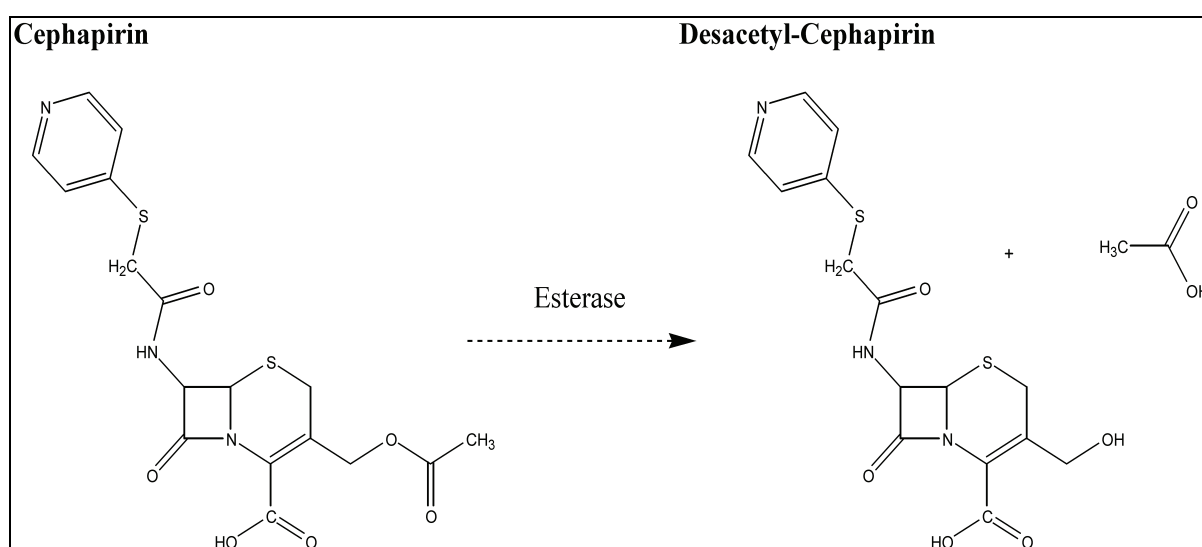


Abb. 37: Metabolisierung von Cephapirin zu Desacetyl-Cephapirin und Essigsäure.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Wiederfindungsexperimenten in Rindermuskel- und Rindernierenhomogenat zeigte sich, dass Cephapirin nach dem Zudosieren zu den Gewebemhomogenaten und einer Einwirkzeit von 10 Minuten nicht mehr detektiert werden konnte. Für Milch war ein analoges Verhalten nicht zu beobachten. Aufgrund der Verfügbarkeit eines zertifizierten Desacetyl-Cephapirin-Standards und der Möglichkeit mit der entwickelten LC-MS/MS-Multimethode sowohl Cephapirin als auch Desacetyl-Cephapirin in einer Methode messen zu können, war es möglich, Desacetyl-Cephapirin als Metabolit in den dotierten Gewebemhomogenaten massenspektrometrisch zu bestätigen und zu quantifizieren.

Ein LC-MS/MS-Chromatogramm von einem dotierten Rindernierenhomogenat am MRL ist in Abb. 38 dargestellt. Aus diesem Chromatogramm lässt sich anhand der

Massenspuren A (Desacetyl-Cephapirin) und B (Cephapirin) die vollständige Metabolisierung von Cephapirin zu Desacetyl-Cephapirin erkennen.

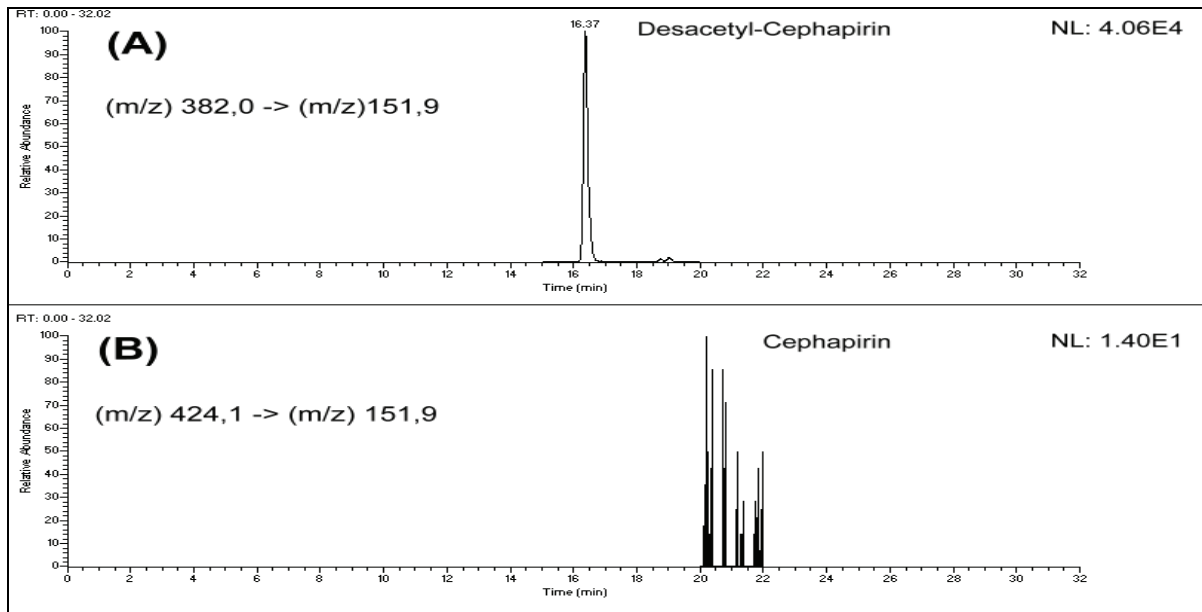


Abb. 38: LC-MS/MS-Chromatogramm eines mit Cephapirin dotierten Rindernierenhomogenates (100 µg/kg). (A) Massenspur für Desacetyl-Cephapirin. (B) Massenspur für Cephapirin (nur noch Grundrauschen zur Retentionszeit von Cephapirin vorhanden). Vollständige Metabolisierung von Cephapirin.

Vergleichbare Beobachtungen zur Metabolisierung von Cephapirin in Gewebehomogenaten wurden in der Literatur beschrieben. Jedoch war bei diesen Arbeiten zum einen eine präzise Quantifizierung von Desacetyl-Cephapirin, aufgrund der Nichtverfügbarkeit eines zertifizierten Standards [167] und zum anderen aufgrund der ungenügenden Messstabilität des LC-MS-Systems [33], nicht möglich.

Mit der hier entwickelten LC-MS/MS-Multimethode konnte Desacetyl-Cephapirin über den gesamten zu untersuchenden Konzentrationsbereich (0.5, 1.0 und 1.5 x MRL) genau und mit hoher Präzision quantifiziert werden. Es wurden dabei lineare Wiederfindungsgeraden erhalten. Zwei Wiederfindungsgeraden für Rindermuskel- und Rindernierenhomogenat, welche bei der Methodvalidierung an einem der drei Validierungstage (s. 2.5) erhalten wurden, sind in den Abb. 39 u. 40 beispielhaft dargestellt.

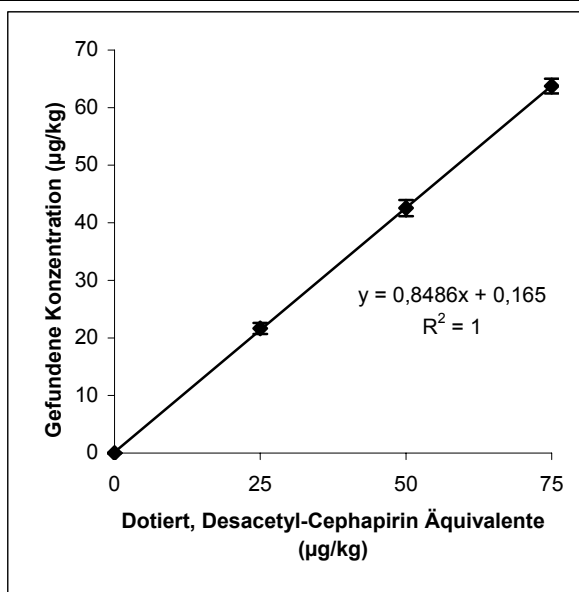


Abb. 39: Ermittelte Wiederfindungsgerade für Desacetyl-Cephapirin in Rindermuskelhomogenat (n =4)

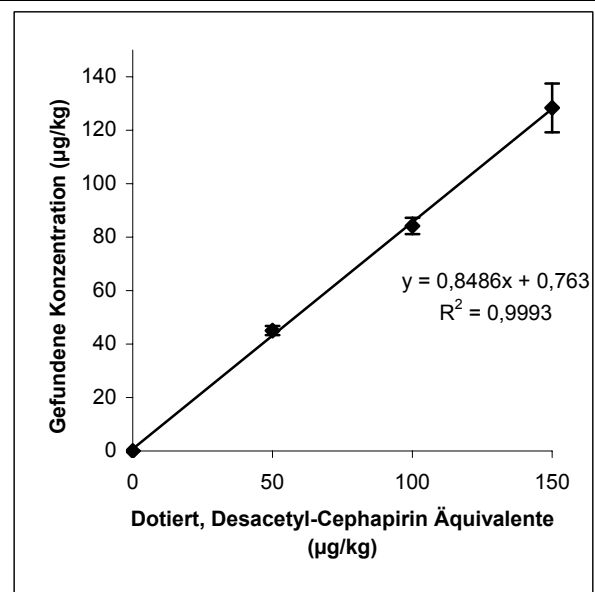


Abb. 40: Ermittelte Wiederfindungsgerade für Desacetyl-Cephapirin in Rindernierenhomogenat (n =4)

Aufgrund der quantitativen Metabolisierung von Cephapirin kann eine Validierung für die Muttersubstanz in Rinderniere und Rindermuskel nicht durchgeführt werden. Ebenso kann die Überwachung des festgesetzten MRL hier nur über den Metaboliten Desacetyl-Cephapirin stattfinden.

Obwohl eine vergleichbare Metabolisierung in dotierter Milch nicht stattfand, muss jedoch berücksichtigt werden, dass Cephapirin nach einer intramammären Applikation teilweise zu Desacetyl-Cephapirin im Euter des Tieres metabolisiert wird [167].

Für die Matrix Milch ist deshalb eine Validierung für beide Substanzen zwingend notwendig, um den MRL sicher überwachen zu können.

2.2.9 Typische Wiederfindungen und Untersuchung der Verluststellen

Bei dem beschriebenen Verfahren zur Probenaufarbeitung lagen die typischen Wiederfindungen einiger β -Lactame in den untersuchten Matrices zum Teil deutlich unter 100 %. Die typischen Wiederfindungen sind dabei die Wiederfindungen des Gesamtverfahrens, welche während der Methodenetablierung mittels des Standardadditionsverfahrens ermittelt wurden (s. Tab. 16).

Anmerkung: Die Wiederfindungen von Desacetyl-Cephapirin konnten aufgrund der späten Verfügbarkeit des Standards nicht während der Methodenetablierung mittels des Standardadditionsverfahrens ermittelt werden. Die in der Tab. 16 aufgeführten typischen Wiederfindungen für Desacetyl-Cephapirin entsprechen den mittleren Wiederfindungen der drei Serien, welche bei der Methodvalidierung unter Punkt 2.5 für drei Konzentrationsniveaus (0,5 x MRL, 1 x MRL, 1,5 x MRL) erhalten wurden.

Tab. 16: Typische Wiederfindungen für die in der Methode erfassten β -Lactame an ihrem jeweiligen MRL

β -Lactam	Typische WDF (%) Milch		Typische WDF (%) Muskel		Typische WDF (%) Niere	
	MW	n	MW	n	MW	n
Amoxicillin	57	4	65	4	46	4
Ampicillin	81	9	88	5	78	9
Cephalexin	83	9	81	6	75	9
Cephapirin	100	9	(*)	-	(*)	-
Desacetyl-Cephapirin	84	36	82	36	87	36
Cephalonium	96	8	96	6	88	7
Cefquinome	93	8	98	6	86	9
Cefazolin	85	8	99	4	87	9
Cefoperazon	96	8	111	4	85	5
Pen G	95	8	99	6	85	9
Pen V	102	7	99	4	75	9
Oxacillin	115	8	104	4	88	9
Cloxacillin	114	8	94	4	90	9
Dicloxacillin	112	8	94	4	76	9
Nafcillin	114	7	101	4	86	9

(*) Cephapirin wird in Rindermuskel und Rinderniere vollständig zu Desacetyl-Cephapirin metabolisiert (s. 2.2.9).

Um die Verluststellen besser eingrenzen und charakterisieren zu können, wurden die Substanzen an den drei kritischen Aufarbeitungsschritten zudotiert und die Wiederfindungen durch Doppelbestimmungen, mittels des Standardadditionsverfahrens, ermittelt:

- Schritt 1: Extraktion, Deproteinierung
- Schritt 2: Acetonitril-Entfernung
- Schritt 3: SPE-Aufreinigung

Die auftretenden Verluste lassen sich bei Schritt 1 durch eine Proteinbindung, Verluste bei Schritt 2 durch einen Abbau beim Abrotieren und Verluste bei Schritt 3 durch eine verringerte Retention der Substanzen auf der SPE-Kartusche infolge von Matrixkoextraktiven im Extrakt, erklären.

Die Ergebnisse der Verluststellenbestimmung sind in der Tab. 17 für die signifikant von Verlusten betroffenen β -Lactame dargestellt. Eine Verluststellenbestimmung wurde für Desacetyl-Cephapirin nicht vorgenommen.

Tab. 17: Signifikante Verluste in Prozent an den drei kritischen Aufarbeitungsschritten (n=2)

Substanz (Matrix)	Verlust durch Proteinbindung (Schritt 1)	Verlust durch ACN-Entfernung (Schritt 2)	Verlust an der SPE- Kartusche (Schritt 3)
Amoxicillin			
Milch	26	(*)	28
Muskel	26	(*)	12
Niere	26	(*)	24
Ampicillin			
Milch	18	(*)	(*)
Muskel	11	(*)	(*)
Niere	17	(*)	(*)
Cephalexin			
Milch	21	(*)	(*)
Muskel	22	(*)	(*)
Niere	11	(*)	(*)

(*) nicht signifikant

Bei den durchgeführten Verluststellenbestimmungen in Milch, Rindermuskel und Rinderniere zeigte sich, dass Substanzverluste bei Schritt 1 aufgrund einer Proteinbindung, ausschließlich für die polaren β -Lactame (Amoxicillin, Ampicillin, Cephalexin), zu beobachten waren. Für die übrigen β -Lactame konnten bei dieser Untersuchung, die mittels einer Doppelbestimmung durchgeführt wurde, bei keinem der Aufarbeitungsschritte signifikante Substanzverluste festgestellt werden. Amoxicillin, welches das polarste in der Multimethode erfasste β -Lactam repräsentiert, zeigte als einziges β -Lactam zusätzlich zur Proteinbindung weitere

Verluste von 28 % für Milch, 12 % für Muskel und 24 % für Rinderniere an der SPE-Kartusche (Schritt 3).

Diese Verluste lassen sich am plausibelsten damit erklären, dass eine quantitative Adsorption von Amoxicillin an das Sorbens durch die hohen Gehalte an Matrixkoextraktiven behindert wird, zumal der reine Standard eine vollständige Wiederfindung zeigte.

Substanzverluste durch den Acetonitril-Entfernungsschritt (Schritt 2) konnten selbst für Penicillin G, welches das labilste aller in der Methode erfassten β -Lactame repräsentiert, nicht beobachtet werden. Dies ist ein Beleg dafür, dass dieser Schritt, welcher mittels des Rotationsverdampfers durchgeführt wird, als sehr schonend zu bezeichnen ist, obwohl er bei 37°C durchgeführt wird und ca. 15 Minuten dauert.

Prinzipiell erwies sich die Extraktion mit Acetonitril als besonders geeignet. Zum einen wurden klare und gut deproteinierte Probenextrakte erhalten, zum anderen zeigte das Lösungsmittel hervorragende Extraktionseigenschaften. Insbesondere die mittelpolaren, monobasischen β -Lactame (Pen G, Pen V, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Nafcillin) konnten in den dotierten Matrices Milch, Rindermuskel und Rinderniere nahezu vollständig wiedergefunden werden. Eine Protein-Analytbindung kann somit ausgeschlossen werden.

Detaillierte Untersuchungen, wie sich die Wiederfindungen der monobasischen β -Lactame in dotiertem Rindermuskel durch eine Acetonitril-Extraktion im Vergleich zu einer wässrigen Extraktion verbessern lassen, wurden bis jetzt nicht publiziert.

Die Vorteile der Acetonitril-Extraktion gegenüber einer wässrigen Extraktion werden jedoch deutlich, wenn man die von Verdon et al. [141] mittels einer Phosphatpufferextraktion und die von Sorensen et al. [88] mittels einer Natriumwolframat/Schwefelsäure Extraktion erhaltenen Wiedererfindungen für Pen G, Pen V, Oxacillin, Cloxacillin, Nafcilin, Dicloxacillin in Rindermuskel mit denen in dieser Arbeit erhaltenen vergleicht.

Die Wiederfindungsdaten in Abhängigkeit des gewählten Extraktionsverfahrens sind grafisch in Abb. 41 dargestellt.

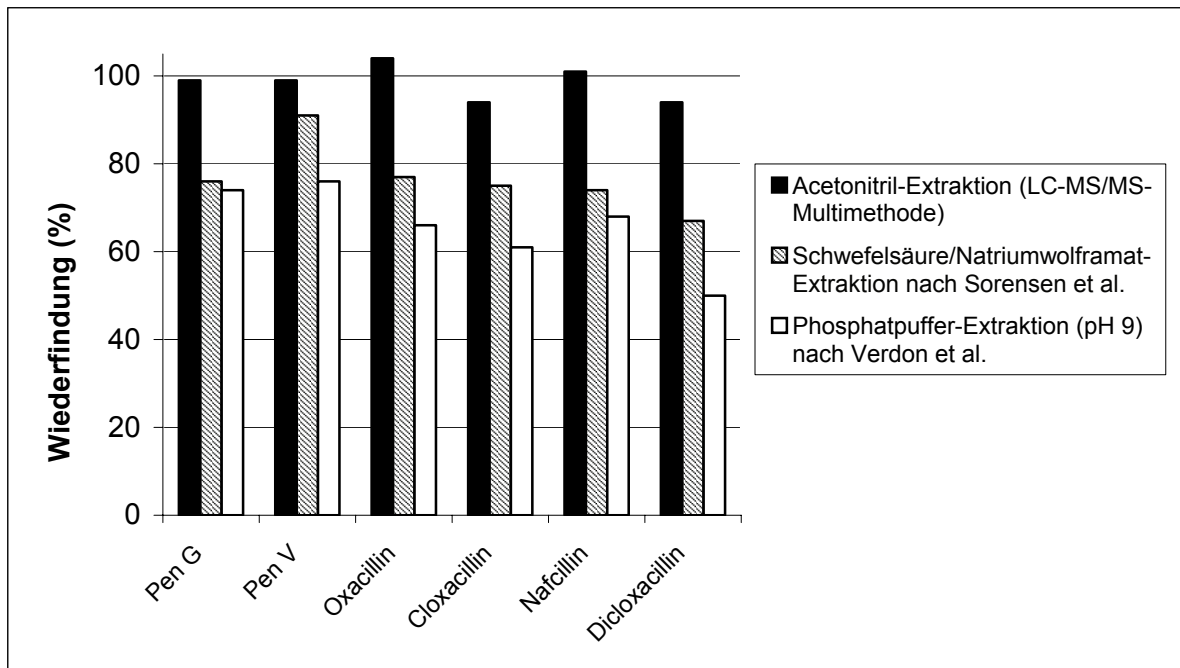


Abb. 41: Erzielte Wiederfindungen der monobasischen β -Lactame in dotiertem Rindermuskel in Abhängigkeit des Extraktionsverfahrens

Bezüglich der Wiederfindungen lässt sich bei den beiden wässrigen Aufarbeitungen erkennen, dass diese einen Trend zeigen, welcher von der Polarität der monobasischen β -Lactame abhängt. Mit zunehmender Hydrophobität der Verbindungen (Pen G < Pen V < Oxacillin < Cloxacillin < Nafcillin < Dicloxacillin) ist eine Abnahme der Wiederfindung zu erkennen, welche auf größer werdende adsorptiven Bindungen an die Proteine zurückzuführen ist.

Durch die in Abb. 41 dargestellten Wiederfindungen der monobasischen β -Lactame in Rindermuskel konnte gezeigt werden, dass mit der Acetonitril-Extraktion gegenüber den rein wässrigen Extraktionen (Schwefelsäure/Natriumwolframat-Extraktion, Phosphatpuffer-Extraktion) eine nahezu vollständige Wiederfindung dieser β -Lactame erreicht werden kann.

Diese Ergebnisse bestätigen die Fähigkeit von Acetonitril als „drug-releasing solvent“ zu wirken, in dem es in der Lage ist, adsorptive Bindungen zwischen den Analyten und den Proteinen zu unterbrechen.

Analoge Beobachtungen wurden bereits für die Matrix Milch beschrieben [170, 168]. Acetonitril ist als Extraktionslösungsmittel in der Lage, diese hydrophoben Wechselwirkungen zu unterbrechen.

2.2.10 Effizienz der wässrigen Aufarbeitung bei der Analyse von Amoxicillin in Rindermuskel

Obwohl zur Extraktion der β -Lactame das als „drug-releasing solvent“ wirkende Lösungsmittel Acetonitril verwendet wurde, zeigte sich insbesondere für das polare Amoxicillin in allen untersuchten Matrices eine starke Proteinbindung von 26 %. Für die mittelpolareren β -Lactame trat unter den gleichen Extraktionsbedingungen keine signifikante Proteinbindung auf.

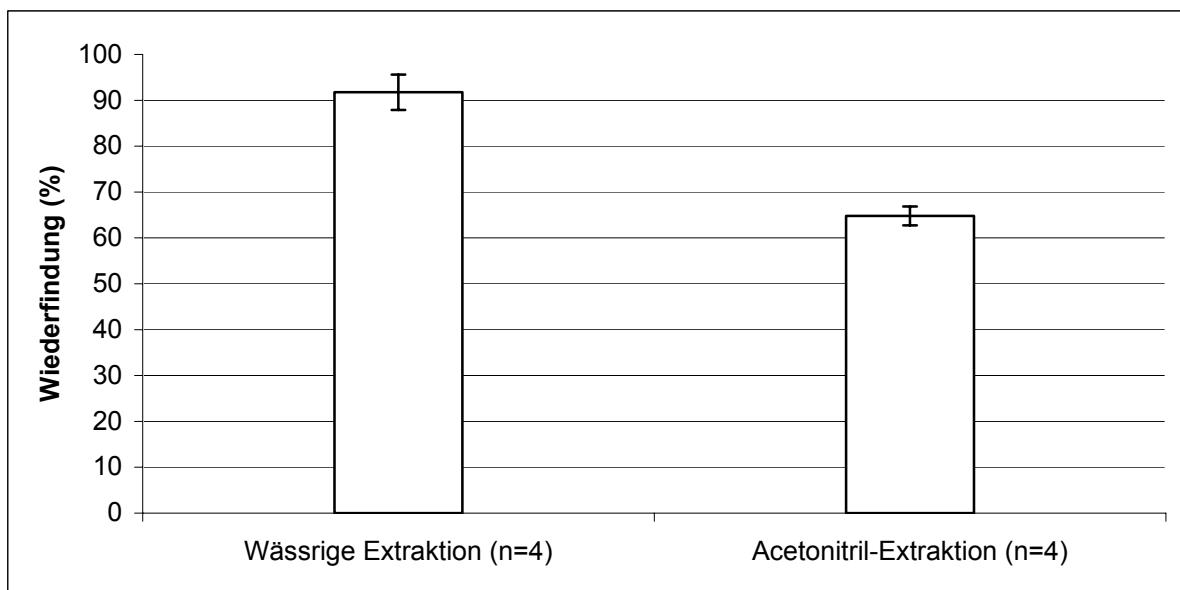


Abb. 42: Erzielte Wiederfindungen von Amoxicillin aus dotiertem Rindermuskelhomogenat (50 μ g/kg) nach wässriger und nach Acetonitril-Extraktion (Die Auswertungen erfolgten über das Standardadditionsverfahren).

Möglicherweise ist Acetonitril für die Extraktion der polaren β -Lactame weniger gut geeignet als z.B. ein rein wässriger Extraktionspuffer, obwohl Acetonitril insbesondere für die monobasischen β -Lactame sehr gute Extraktionseigenschaften besitzt (s. 2.2.9).

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden 4 Rindermuskelhomogenate mit Amoxicillin am MRL dotiert und eine wässrige Extraktion mit Phosphatpuffer (0,005 M, pH 8,5) durchgeführt. Die erhaltenen Wiederfindungen sind in Abb. 42 grafisch dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit der wässrigen Extraktion im Gegensatz zur Acetonitril-Extraktion die Wiederfindung von 65 % auf 92 % deutlich erhöht werden konnte.

Die Phosphatpuffer-Extraktion ermöglichte somit im Vergleich zur Acetonitril-Extraktion eine nahezu vollständige Wiederfindung von Amoxicillin.

Mit großer Wahrscheinlichkeit liegt der Grund darin, dass der rein wässrige Phosphatpuffer, aufgrund seiner im Vergleich zu Acetonitril hohen Polarität, für das polare Amoxicillin das geeignetere Lösungsmittel ist.

Obwohl diese Untersuchung zwar ausschließlich für Amoxicillin in Rindermuskel durchgeführt wurde, ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass ähnliche Ergebnisse für die anderen polaren β -Lactame (Amoxicillin, Ampicillin, Cephalexin, Desacetyl-Cephapirin, Cephapirin) zu erwarten gewesen wären.

Letztlich lassen die erhaltenen Ergebnisse den Schluss zu, dass Acetonitril nicht für alle in der LC-MS/MS-Multimethode erfassten β -Lactame gleichermaßen gut als Extraktionslösungsmittel geeignet ist.

Prinzipiell ist jedoch die Acetonitril-Extraktion der rein wässrigen Extraktion vorzuziehen, da Acetonitril im Gegensatz zum Phosphatpuffer sehr gute Deproteinierungseigenschaften besitzt und im Gegensatz zur Phosphatpuffer-Extraktion sehr klare primäre Probenextrakte erhalten werden.

2.2.11 Lösen möglicher Wirkstoff-Matrix-Bindungen durch Einsatz einer Endopeptidase (Subtilisin carlsberg)

Eine Vielzahl von pharmakologisch wirksamen Verbindungen besitzen die Eigenschaft, sich sehr stark an die Proteine der zu untersuchenden Probenmatrix zu binden. Diese Bindungen beruhen entweder auf hydrophoben Wechselwirkungen oder auf ionischen Wechselwirkungen. Hohe Proteinbindungen wurden z.B. für die Benzodiazepine in Leber [169] und für die Isoxazolypenicilline [170] sowie Penicillin G in Milch beobachtet.

Aufgrund der möglichen Proteinbindungen sollte es bei der Entwicklung von Extraktionsverfahren immer das Ziel sein, ein geeignetes Extraktionsverfahren zu verwenden, mit dem eine maximale Ausbeute von sowohl freien als auch von proteingebundenen Rückständen erzielt werden kann. Die bisherigen Untersuchungen haben an dotiertem Probenmaterial gezeigt, dass das organische Lösungsmittel Acetonitril hervorragend für die Extraktion der monobasischen β -Lactame geeignet ist, indem es als „drug-releasing solvent“ wirkt (s. 2.2.9).

Eine weitere Möglichkeit, die Ausbeute von proteingebundenen Rückständen zu verbessern, stellt die gezielte Hydrolyse der Probenmatrix mit unspezifischen Proteasen dar [171, 172].

Bis jetzt wurde der Einsatz des unselektiven proteolytischen Enzyms (Subtilisin Carlsberg, Endopeptidase), welches alle Peptidbindungen in der Proteinkette spaltet, für die Extraktion von Penicillinrückständen lediglich für die Matrix Milch beschrieben [170]. Jedoch zeigte sich bei diesen Untersuchungen, dass keine verwertbaren Ergebnisse erhalten werden konnten. Durch die Verwendung der Endopeptidase wurden zu viele Matrixbestandteile freigesetzt, welche die Detektion der Isoxazolympenicilline (Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin) mittels elektrochemischer Detektion unmöglich machten.

Das Ziel der im folgenden beschriebenen Untersuchungen sollte es sein, die Tauglichkeit der Endopeptidase in Bezug auf die erreichbare Ausbeute von Penicillin G Rückständen in Rinderniere, unter Verwendung der hochselektiven LC-MS/MS-Technik, zu prüfen. Weiter sollten die Ausbeuten mit der Acetonitril-Extraktion verglichen werden.

Um möglichst realistische Bedingungen für diese Untersuchung zu haben, wurde kein Blank-Material verwendet, welches mit dem Analyten dotiert wird, sondern gewachsenes Untersuchungsmaterial. Der Grund liegt darin, dass Analyten, die eine Bindung an Proteine oder Matrixbestandteile eingehen können, in dotiertem Probenmaterial eventuell einen anderen Bindungsstatus als in gewachsenem Material aufweisen.

Pen G konnte mittels der LC-MS/MS-Multimethode in allen Extrakten selektiv und störungsfrei gemessen werden. Die Auswertung fand sowohl mittels einer externen Kalibriergeraden sowie mit der Standardadditionsmethode statt, um mögliche Matrixeffekte auf Seiten der ESI ausschließen zu können. Nur so ist es möglich, untereinander vergleichbare quantitative Ergebnisse zu erhalten. Die Ergebnisse sind in den Tab. 18 u. 19 und in der Abb. 43 dargestellt.

Tab. 18: Erhaltene Ausbeuten von Pen G unter Verwendung der Endopeptidase Subtilisin Carlsberg (n=6)

Matrixeffekt	Ausbeute (externe Auswertung)	Ausbeute (Standard- addition)	CV (%) (externe Auswertung)	CV (%) (Standardaddition)
- 19 (%)	44 µg/kg	54 µg/kg	24	20

Tab. 19: Erhaltene Ausbeuten von Pen G unter Verwendung der Acetonitrilextraktion (n=6)

Matrixeffekt	Ausbeute (externe Auswertung)	Ausbeute (Standard- addition)	CV (%) (externe Auswertung)	CV (%) (Standardaddition)
- 30 (%)	62 µg/kg	89 µg/kg	9	7

Ein Vergleich der unterschiedlichen Aufarbeitungstechniken zeigte, dass die Extraktion mit Acetonitril das geeignete Extraktionsverfahren für die Bestimmung von gewachsenen Pen G-Rückständen ist. Die Verwendung der Endopeptidase erbrachte im Gegensatz zur Extraktion mit Acetonitril nicht die erwartete höhere Ausbeute, obwohl der Probenextrakt nach der Endopeptidasebehandlung keinerlei sichtbares Gewebe mehr enthielt (dunkelgrüne Farbe, leicht trüb) und deshalb eine optimale Freisetzung der gewachsenen Pen G-Rückstände zu erwarten gewesen wäre.

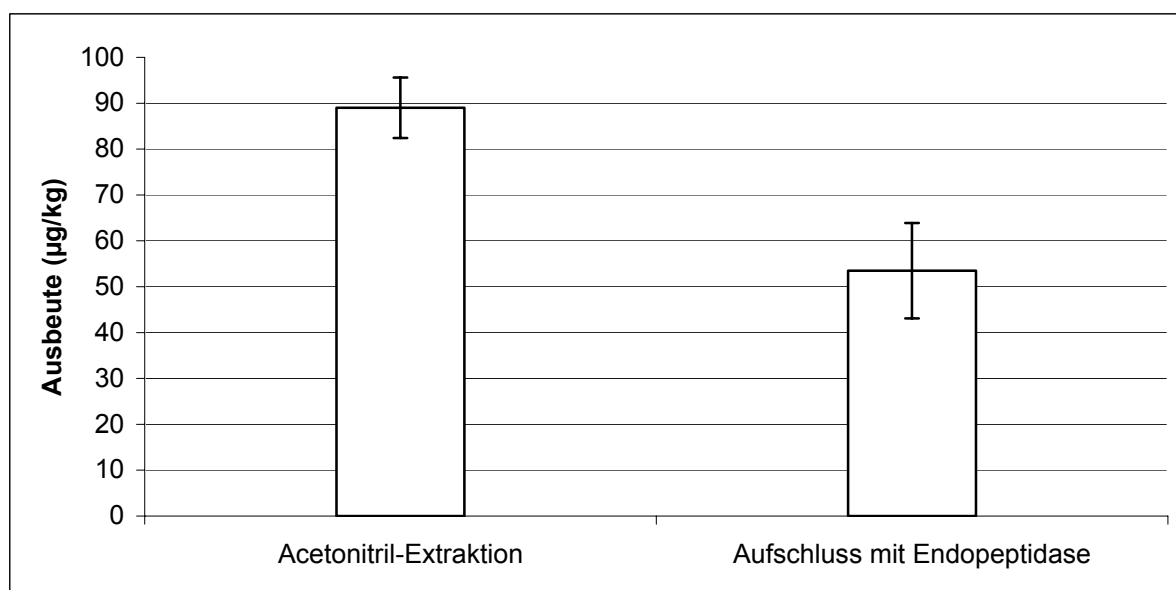


Abb. 43: Vergleich der erhaltenen Ausbeuten von Pen G nach Acetonitrilextraktion und Aufschluss mit der Endopeptidase (Subtilisin Carlsberg)

Allerdings muss die Ergebnisbetrachtung kritisch erfolgen, da der reine Pen G-Standard unter den Extraktionsbedingungen mit der Endopeptidase (Hitze- und Alkalieinwirkung), um 20 % abbaute.

Möglicherweise ist dieser Abbau in Gegenwart von Matrix zwar geringer, jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass dieser Abbau zu einer niedrigeren Ausbeute im Vergleich zur Acetonitrilextraktion beiträgt.

Interessant war die Beobachtung, dass die Matrixeffekte abhängig vom Extraktionsverfahren unterschiedlich ausfielen. Die Acetonitrilextrakte verursachten eine Signalunterdrückung von 30 % im Vergleich zu 19 % bei den Endopeptidaseextrakten. Diese Unterschiede veranschaulichen nochmals deutlich die Notwendigkeit, ein geeignetes Quantifizierungsverfahren zu verwenden.

Letztlich kann bei ESI-LC-MS/MS-Methoden eine Quantifizierung unter gleichzeitiger Kompensation von Matrixeffekten, ohne die Verfügbarkeit eines geeigneten internen Standards, nur mittels des Standardadditionsverfahrens erreicht werden. Die Auswertung mittels externer Kalibriergeraden führt zu einer nicht abschätzbaren Messunsicherheit.

2.3 LC-MS/MS-Methodenentwicklung für die quantitative Bestimmung von Ceftiofurrückständen in Rohmilch mittels LC-MS/MS

Ceftiofur wird nach parenteraler Verabreichung an Rinder, Schweine, Schafe und Ratten mit einer Plasmahalbwertszeit von weniger als 10 Minuten schnell zu dem antimikrobiell aktiven Desfuoylceftiofur (DFC) metabolisiert. Die weitere Metabolisierung führt zur Bildung von Desfuoylceftiofur-Glutathion-Disulfid (DFC-glut), Desfuoylceftiofur-Cystein-Disulfid (DFC-cystein), 3,3-Desfuoylceftiofur-Disulfid (DFC-Dimer) und Desfuoylceftiofur-Protein [173, 174, 175, 176, 177, 178]. Eine Übersicht dieser Metabolisierung ist in der Abb. 44 dargestellt.

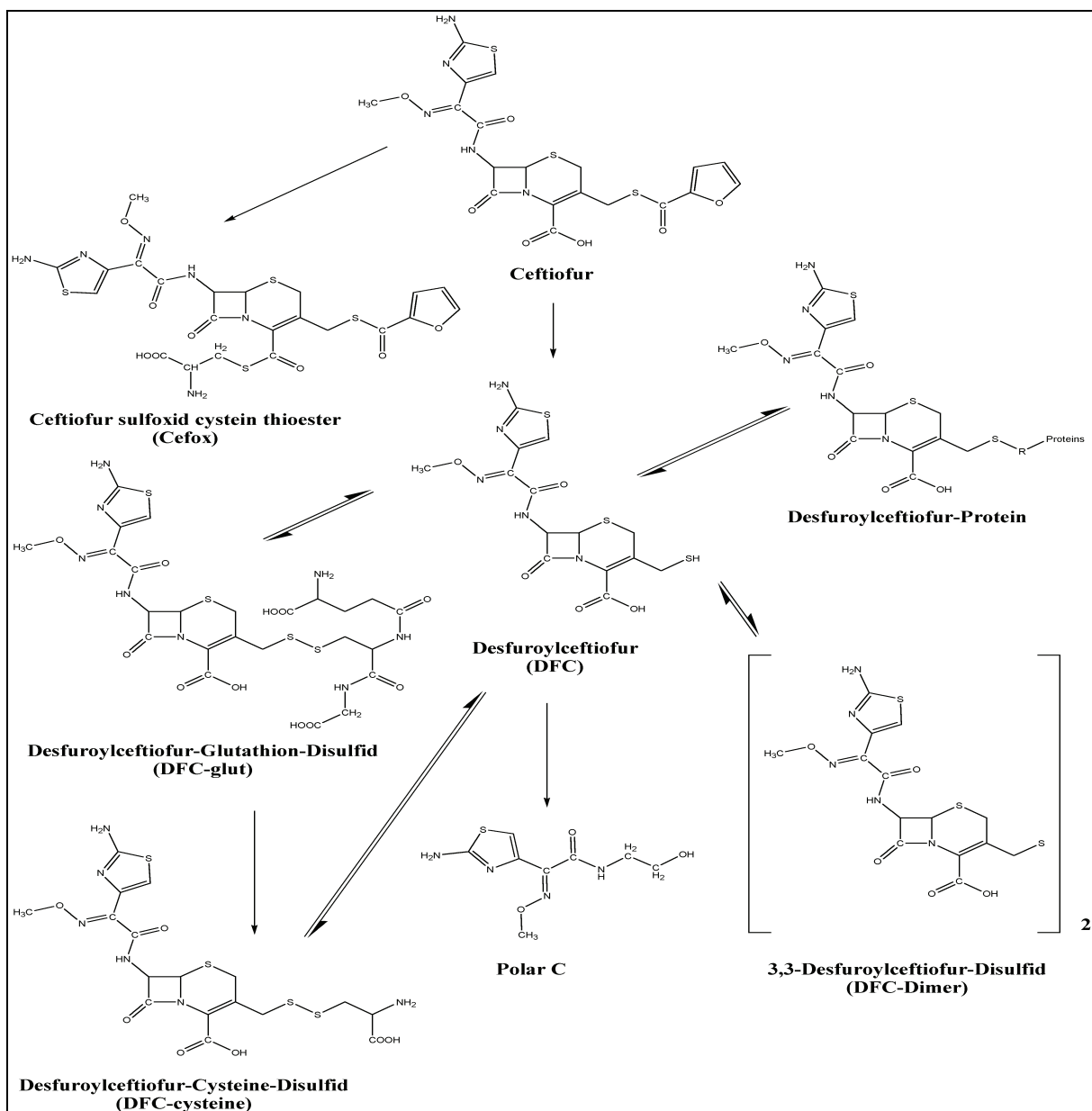


Abb. 44: Metabolisierung von Ceftiofur in Rindern, Schweinen, Schafen und Ratten [175]. Cefox wird ausschließlich in Ratten gebildet.

Die Verabreichung von Ceftiofur an Rinder erfolgt im Abstand von 24 h durch subkutane Injektion mit einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht an 3 bis 5 aufeinanderfolgenden Tagen. Die intramammäre Verabreichung ist für Ceftiofur nicht zulässig. Werden in der Milch Rückstände der Muttersubstanz gefunden, ist von einer illegalen Anwendung auszugehen.

Die Besonderheit dieses Antibiotikums besteht darin, dass für Milch keine Wartezeiten einzuhalten sind. Untersuchungen zum Ausscheidungsverhalten von Ceftiofur bei milchgebenden Kühen zeigten, dass 0,1 % der verabreichten Dosis in die Milch übergehen. Dabei war der Hauptrückstand proteingebundenes Desfuroylceftiofur [15].

Aufgrund der intensiven Metabolisierung von Ceftiofur wurde in der Verordnung (EWG) 2377/90 ein MRL von 100 µg/kg als Summe aller den β-Lactamring enthaltenden und als Desfuroylceftiofur gemessenen Rückstände festgesetzt.

Für eine genaue Quantifizierung aller Ceftiofurrückstände mit intaktem β-Lactamring müssen deshalb zuerst folgende chemische Umsetzungen durchgeführt werden [179]:

- 1.) Reduktive Freisetzung des konjugierten Desfuroylceftiofurs mittels Dithioerythritol (DTE).
- 2.) Alkylierung der freien Thiol-Gruppe mittels Iodacetamid zum Schutz vor erneuter Oxidation (s. Abb. 45).

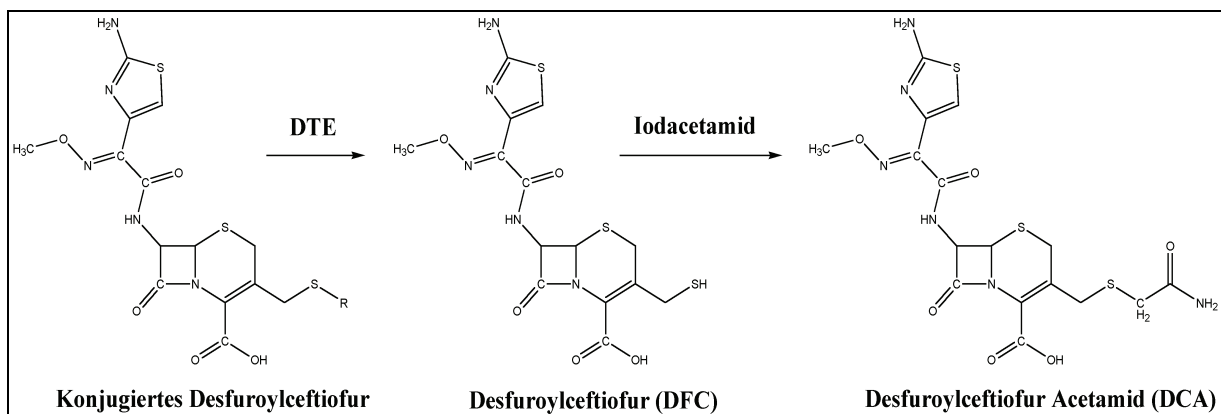


Abb. 45: Freisetzung von Desfuroylceftiofur mit DTE und Stabilisierung durch Alkylierung mittels Iodacetamid.

Gegenüber einer Vielzahl von publizierten HPLC-UV-Methoden, die in der Lage sind, die Summe aller Ceftiofurrückstände in tierischen Geweben, Plasma [179, 180, 181] und Milch [173, 182] zu bestimmen, wurden bisher ausschließlich LC-MS/MS-Methoden zum Nachweis der Muttersubstanz [57, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 68, 32] in Milch beschrieben. Es ist deshalb mit diesen LC-MS/MS-Methoden nicht möglich, den gesetzlichen MRL zu überwachen, da die Muttersubstanz nur bei einer illegalen, d.h. intramammären Anwendung in der Milch vorkommt. Ziel war es deshalb, eine LC-MS/MS-Bestätigungsmethode zu entwickeln, die es ermöglicht, die Summe aller Ceftiofurrückstände über das Desfuroylceftiofur-Acetamid Derivat in Milch zu quantifizieren und zu bestätigen. Gegenüber den publizierten HPLC-UV-Methoden, die eine äußerst material- und zeitaufwendige Probenaufarbeitung mit 3 SPE-Aufreinigungsschritten benötigen, sollte die Probenaufarbeitung der LC-MS/MS-Methode stark vereinfacht werden. Die Freisetzungs- und Derivatisierungsschritte werden entsprechend einer publizierten HPLC-UV-Methode durchgeführt [179].

2.3.1 Chromatographische Trennung (HPLC)

Es wurden dieselben chromatographischen Bedingungen wie für die β -Lactam Multimethode verwendet (s. 2.2.1.1). Ein typisches (MRM) Chromatogramm von DCA, entsprechend einer Konzentration von 100 ng/ml Desfuroylceftiofur, bezogen auf die freie Säure und einem Injektionsvolumen von 25 μ l, ist in Abb. 46 dargestellt.

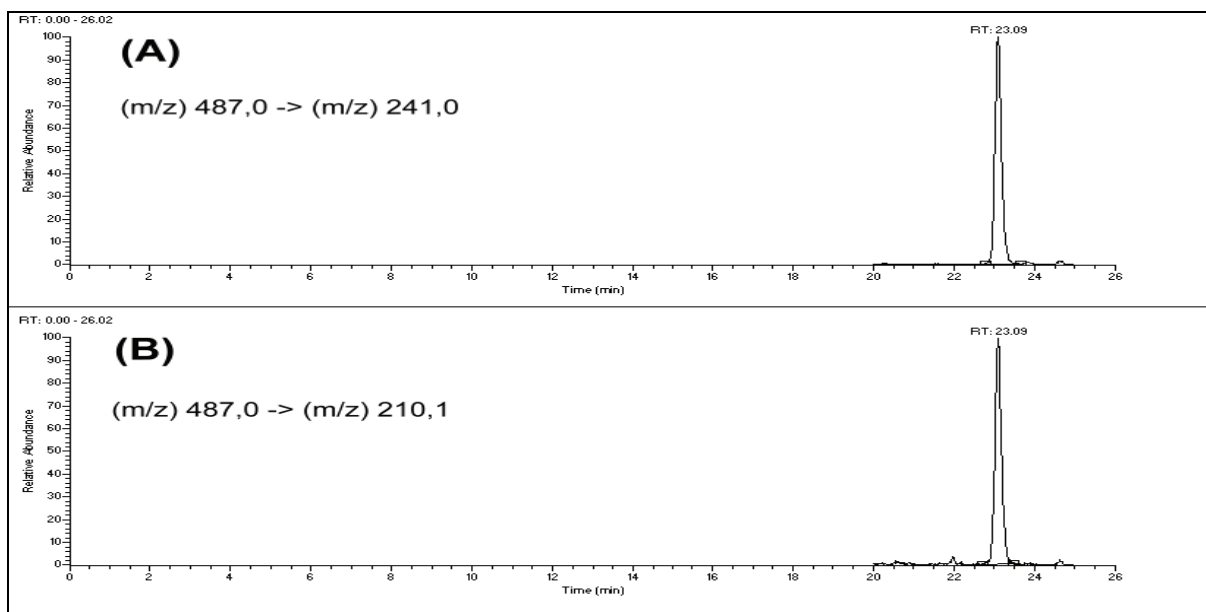


Abb. 46: Multiple reaction monitoring (MRM) Chromatogramm von DCA (entsprechend 100 ng/ml Desfuroylceftiofur): (A) Quantifier Ionen Chromatogramm, (B) Qualifier Ionen Chromatogramm.

2.3.2 Optimierung des ESI-Triple-Quadrupol-Systems und des Elektrospray-Modus (+/-)

Zur Optimierung des ESI-Triple-Quadrupol-Gerätes auf die Zielsubstanz DCA war es notwendig, die bereits unter Punkt 2.2.2 beschriebenen variablen Parameter zu optimieren.

DCA ist als Standardsubstanz kommerziell nicht erhältlich, weshalb diese Verbindung zuerst synthetisiert werden musste, indem Ceftiofur mit DTE reduktiv zu Desfuroylceftiofur und anschließend mittels Iodacetamid zu Desfuroylceftiofur-acetamid umgesetzt wurde (s. Abb. 45). Die Herstellung fand analog zu Punkt 3.2.5 statt. Die Endkonzentration der Standardlösung betrug dabei 10 µg/ml (Desfuroylceftiofur).

Diese Standardlösung wurde zunächst mittels der Spritzenpumpe dem HPLC-Eluenten zudosiert. Jedoch zeigte das gemessene Massenspektrum im positiven ESI-Modus ein sehr starkes Rauschen, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf die nicht genügende Aufreinigung der hergestellten Standardlösung zurückzuführen war.

Durch dieses Rauschen war es sehr schwierig, das Signal des Quasimoleküls $[M+H]^+$ mit (m/z) 487 für die Optimierungsdurchführung zu messen. Eine störungsfreie Detektion des Molekülionensignals konnte jedoch durch eine vorausgehende Chromatographie erreicht werden. Letztlich war es unumgänglich, für jeden Optimierungsschritt eine einzelne Injektion durchzuführen.

Eine Zusammenfassung der erhaltenen Optimierungswerte für DCA ist in Tab. 20 dargestellt.

Tab. 20: Optimierungswerte für das ESI-Triple-Quadrupol-System.

Kapillar-Temperatur (°C)	Nadelspannung (kV)	Sheatgasdruck (psi)
360	5	70

Analog zur Muttersubstanz Ceftiofur zeigte sich auch für DCA, dass der positive Elektrospraymodus der empfindlichste und geeignetste Modus ist. Das relative Intensitätsverhältnis in Prozent ist für beide Modi (+/-) in Abb. 47 dargestellt.

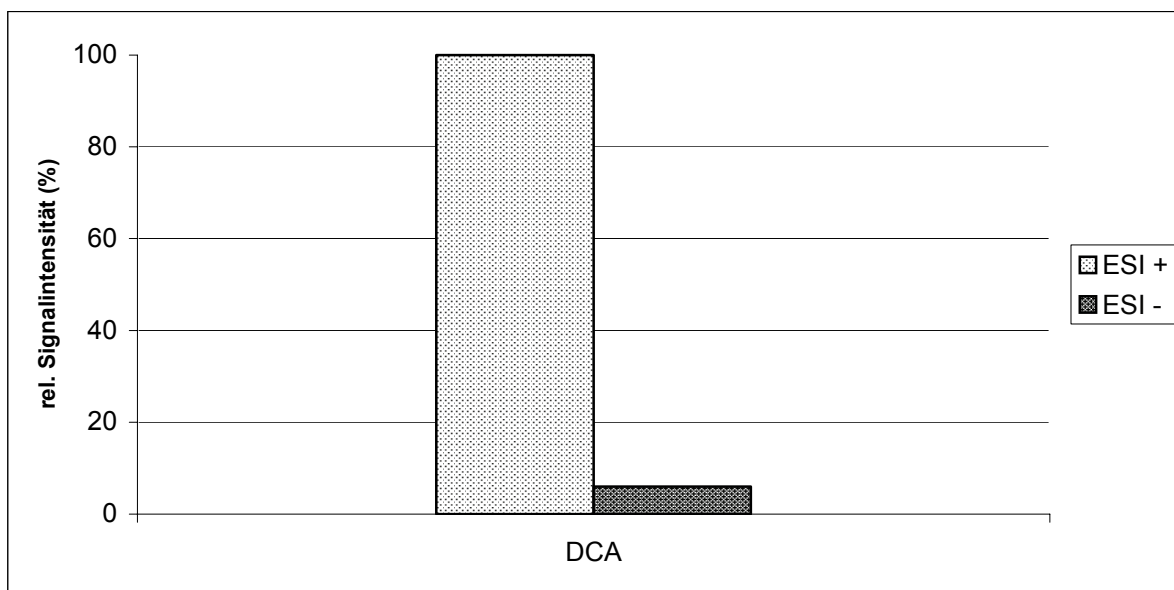


Abb. 47: Experimentell ermittelte relative Signalintensitäten (%) für DCA in Abhängigkeit des Elektrospraymodus.

2.3.3 Optimierung der Tandem-MS-Bedingungen (MS/MS)

Ceftiofur und DCA sind strukturanaloge Verbindungen, die sich lediglich in ihren unterschiedlichen Resten R unterscheiden (s. Abb. 48).

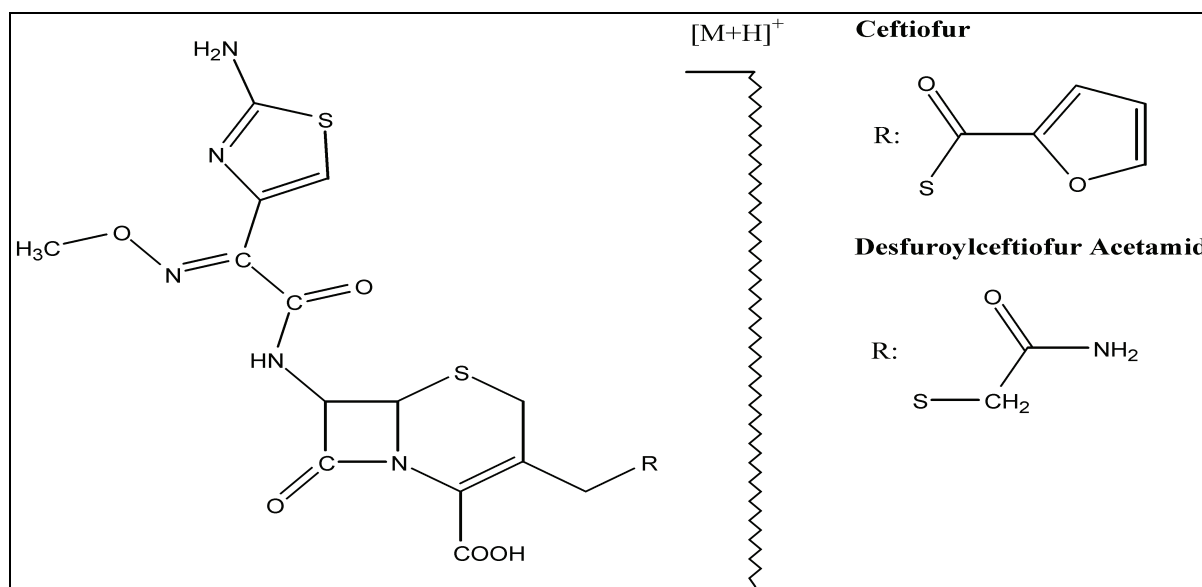


Abb. 48: Strukturformeln für Ceftiofur und Desfuroylceftiofur Acetamid (DCA)

Bei der Optimierung des MRM zeigte sich, dass beide Verbindungen identische CID-Massenspektren erzeugen (siehe Abb. 49 u. 50).

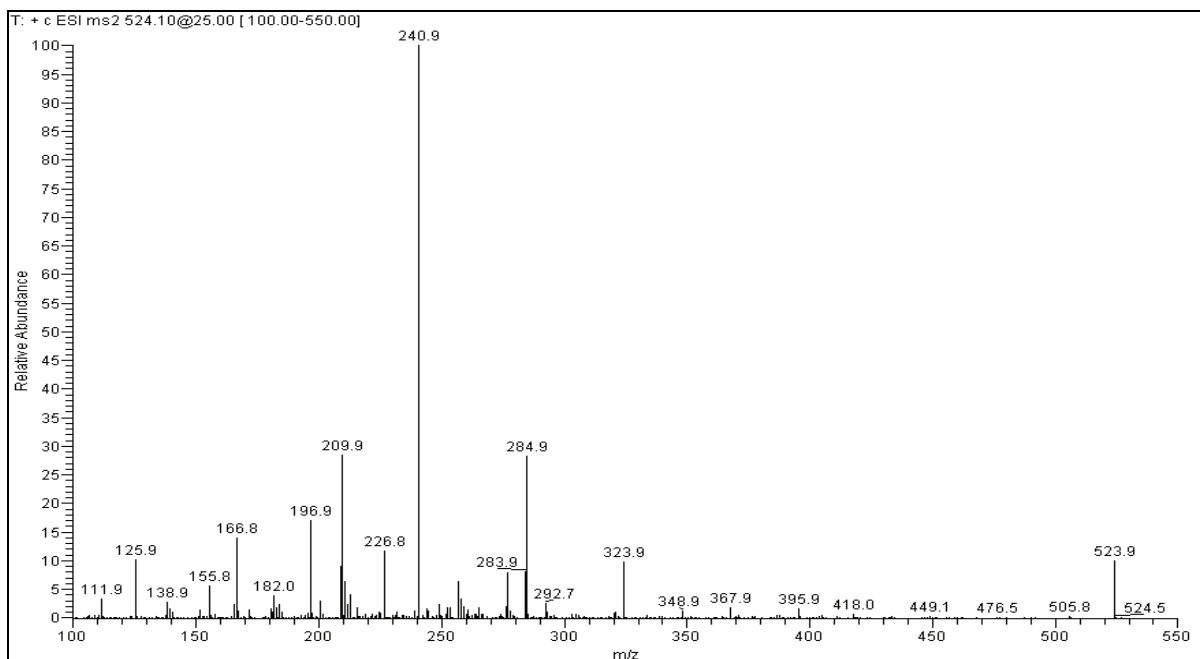


Abb. 49: CID-Massenspektrum von Ceftiofur

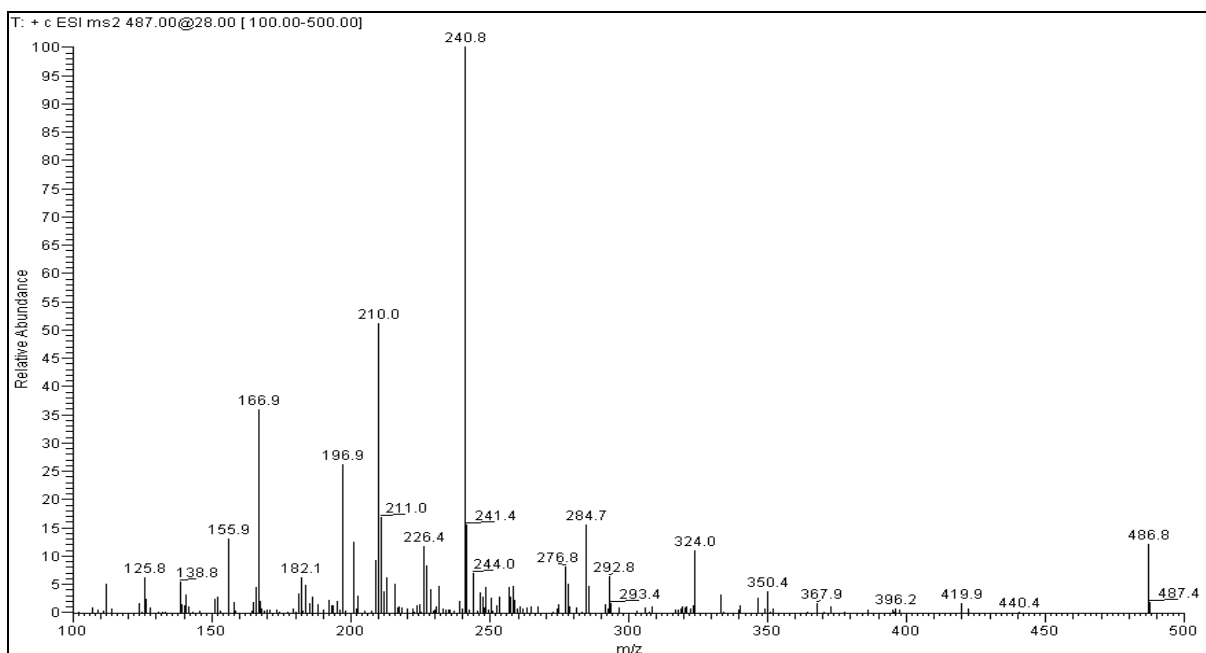


Abb. 50: CID-Massenspektrum von Desfuroylceftiofur Acetamid (DCA)

Die intensivsten bei dem Kollisionsprozeß erzeugten Tochterionen besitzen folgende Massen (m/z): **396, 368, 349, 324, 285, 277, 241, 227, 210, 209, 197, 184, 183, 182, 167, 166, 156, 139, 126, 112**. Die Ergebnisse belegen somit eindeutig, dass der Fragmentierungsmechanismus nicht durch die unterschiedlichen Reste R der beiden Verbindungen beeinflusst wird. Aufgrund dieser Ergebnisse müssen bereits publizierte Fragmentierungsmechanismen für Ceftiofur in Frage gestellt werden, da diese fälschlicherweise den Rest R mit einbeziehen [60, 63, 64].

2.3.3.1 Postulierung des Fragmentierungsmechanismus von Ceftiofur und Desfuroylceftiofur Acetamid

Prinzipiell zeigen Penicilline sowie Cephalosporine aufgrund ihres gemeinsamen β -Lactamgrundkörpers eine klassenspezifische Fragmentierung. Besonders charakteristisch ist die Spaltung entlang des β -Lactamringes.

Bei diesem Mechanismus handelt es sich um eine 2+2 Cycloreversion [183]. Diese Fragmentierung tritt unter anderem primär bei allen energiereichen Ionisierungsverfahren mittels EI, CI, DCI, FAB oder TSP auf. Bei der sehr milden ESI kann diese Fragmentierung jedoch erst durch eine kollisionsinduzierte Fragmentierung (CID) der Quasimolekülonen oder durch Bestrahlung dieser mit energiereichem Licht (Infrared multiphoton dissociation, IRMPD) erzeugt werden. Neben der klassenspezifischen Fragmentierung findet die molekülspezifische Fragmentierung statt, welche in der Regel sehr komplex ist und stark von den Substituenten des β -Lactamringes abhängt.

Für Ceftiofur und Desfuroylceftiofur Acetamid gibt es bisher in der Literatur keine vollständige Aufklärung des in dieser Arbeit beobachteten CID-Fragmentierungsmechanismus. Es war deshalb das Ziel für einen Großteil der erhaltenen Tochterionen von Ceftiofur und DCA einen plausiblen Fragmentierungsmechanismus zu postulieren.

Um dabei genauere Strukturinformationen über die beim MS/MS-Prozess erzeugten Tochterionen zu erhalten und um die Fragmentierungswege besser entschlüsseln zu können, war es notwendig, diese Tochterionen weiter zu fragmentieren.

Unter Verwendung der In-Source-CID in Verbindung mit der CID war es möglich, MS/MS/MS (MS^3) Spektren mit dem verwendeten Triple-Quadrupol Massenspektrometer zu erhalten. Darüber hinaus wurde ein Ion-Trap Massenspektrometer zur Erstellung vom MS/MS/MS/MS (MS^4) Spektren eingesetzt.

Die vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismen sind in den Abb. 51 bis 56 dargestellt.

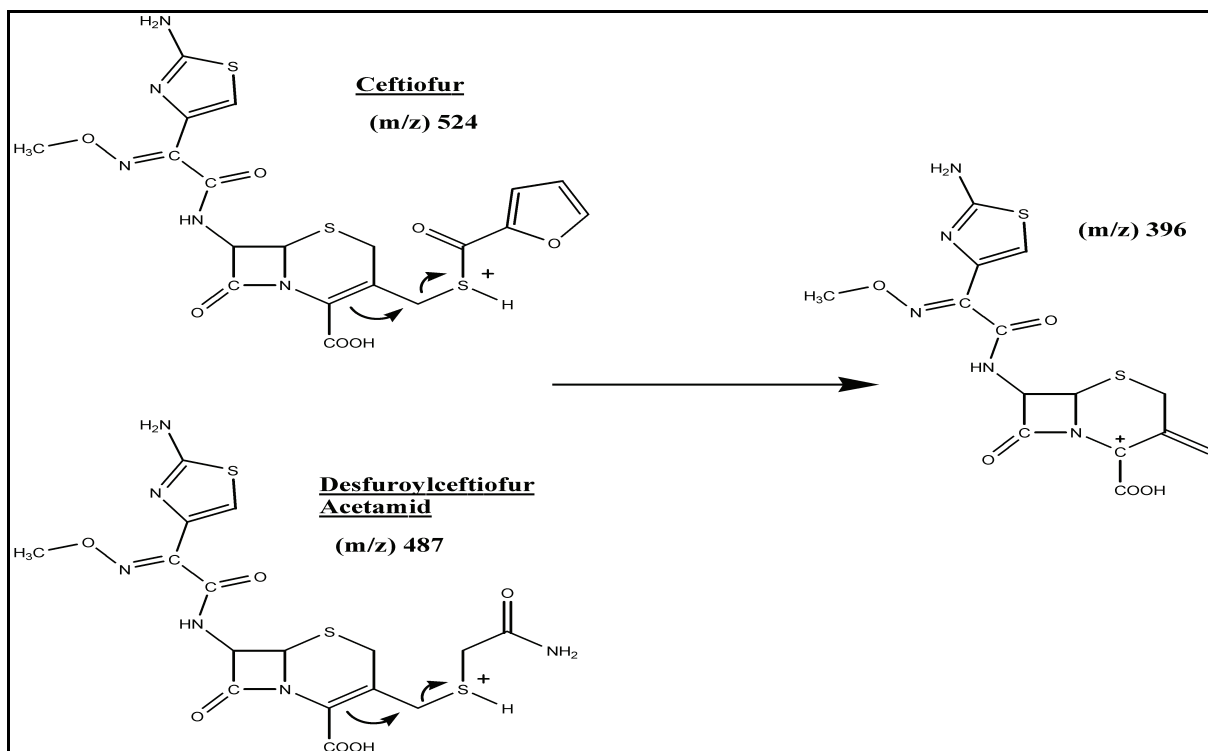


Abb. 51: Vorgeschlagene Bildung von (m/z) 396 aus den protonierten Molekülionen (m/z) 524 und 487

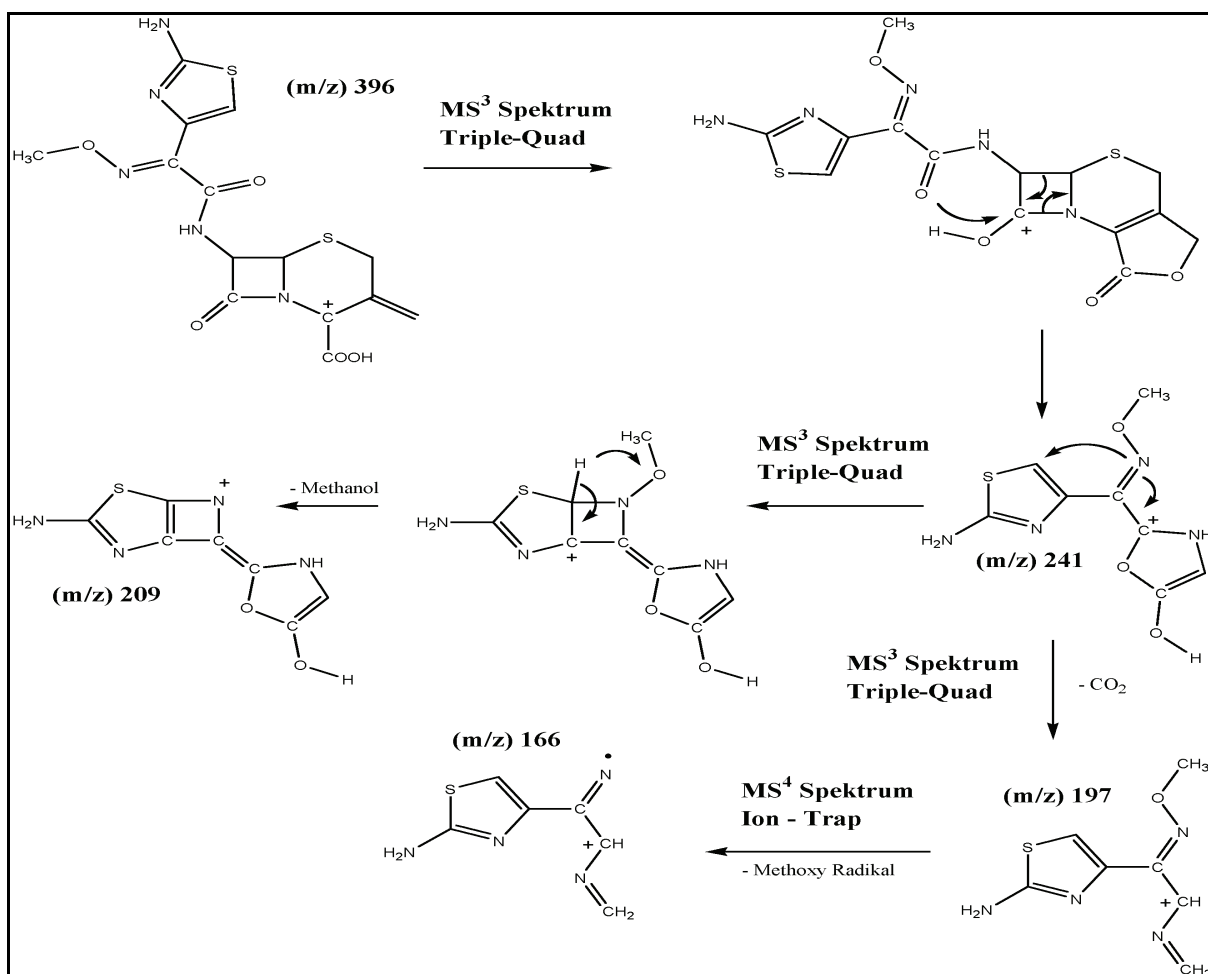


Abb. 52: Vorgeschlagene Fragmentierung von (m/z) 396 zu (m/z) 241, 209, 197, 166

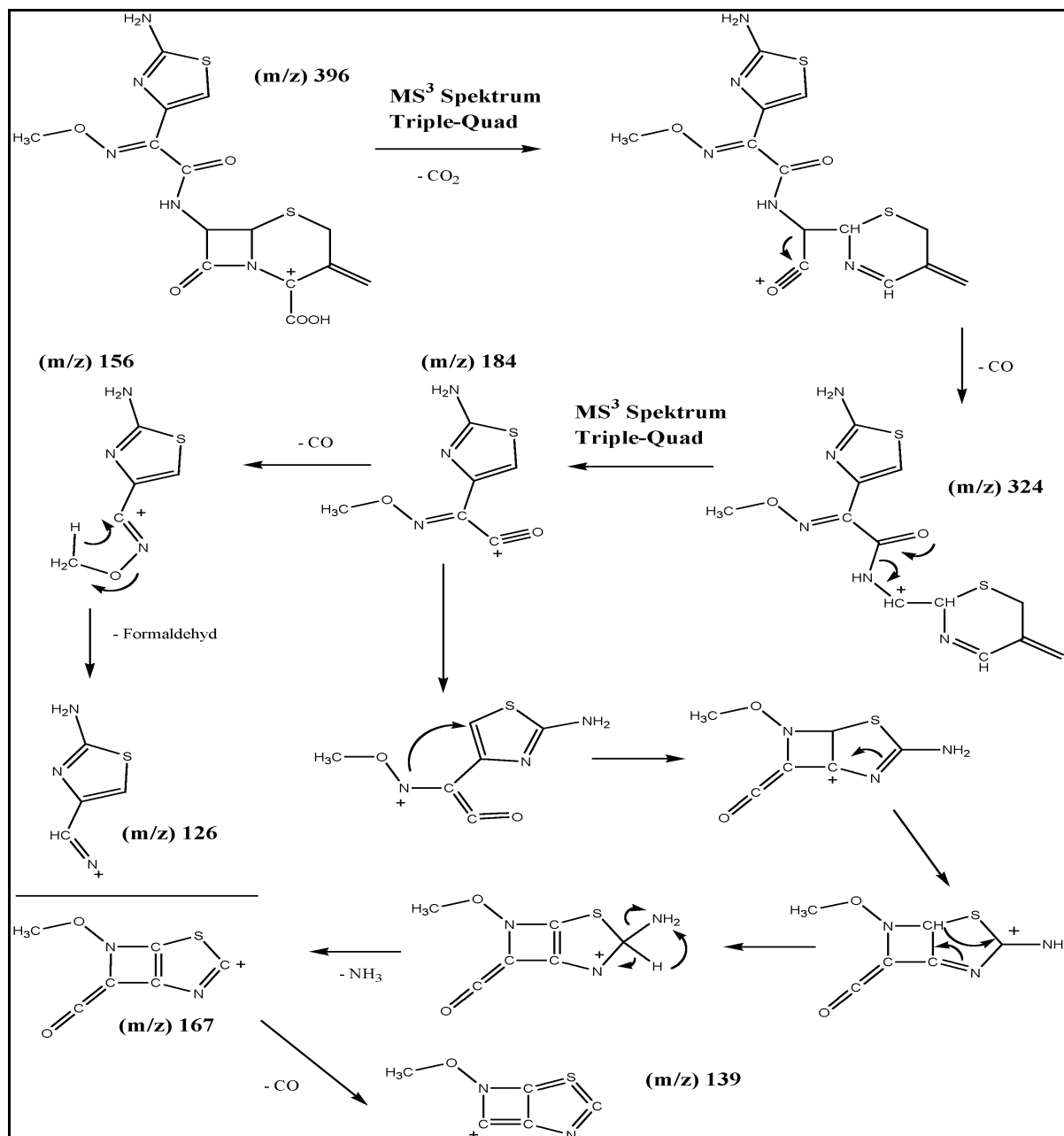


Abb. 53: Vorgeschlagene Fragmentierung von (m/z) 396 zu (m/z) 324, 184, 167, 156, 139, 126

In Abb. 51 ist die Abspaltung der unterschiedlichen Reste R aus den protonierten Molekülonen unter Bildung von (m/z) 396 dargestellt. Im Anschluss daran findet die klassenspezifische β -Lactamsplattung (2+2 Cycloreversion) unter Bildung von (m/z) 241 statt. Weitere Tochterionen dieser Fragmentierung von (m/z) 241, MS^3 -Spektrum, sind (m/z) 209 (Verlust von Methanol) und 197 (Verlust von CO_2). Aus (m/z) 197, MS^4 -Spektrum, geht vermutlich unter Abspaltung eines Methoxy-Radikals (m/z) 166 hervor (s. Abb. 52).

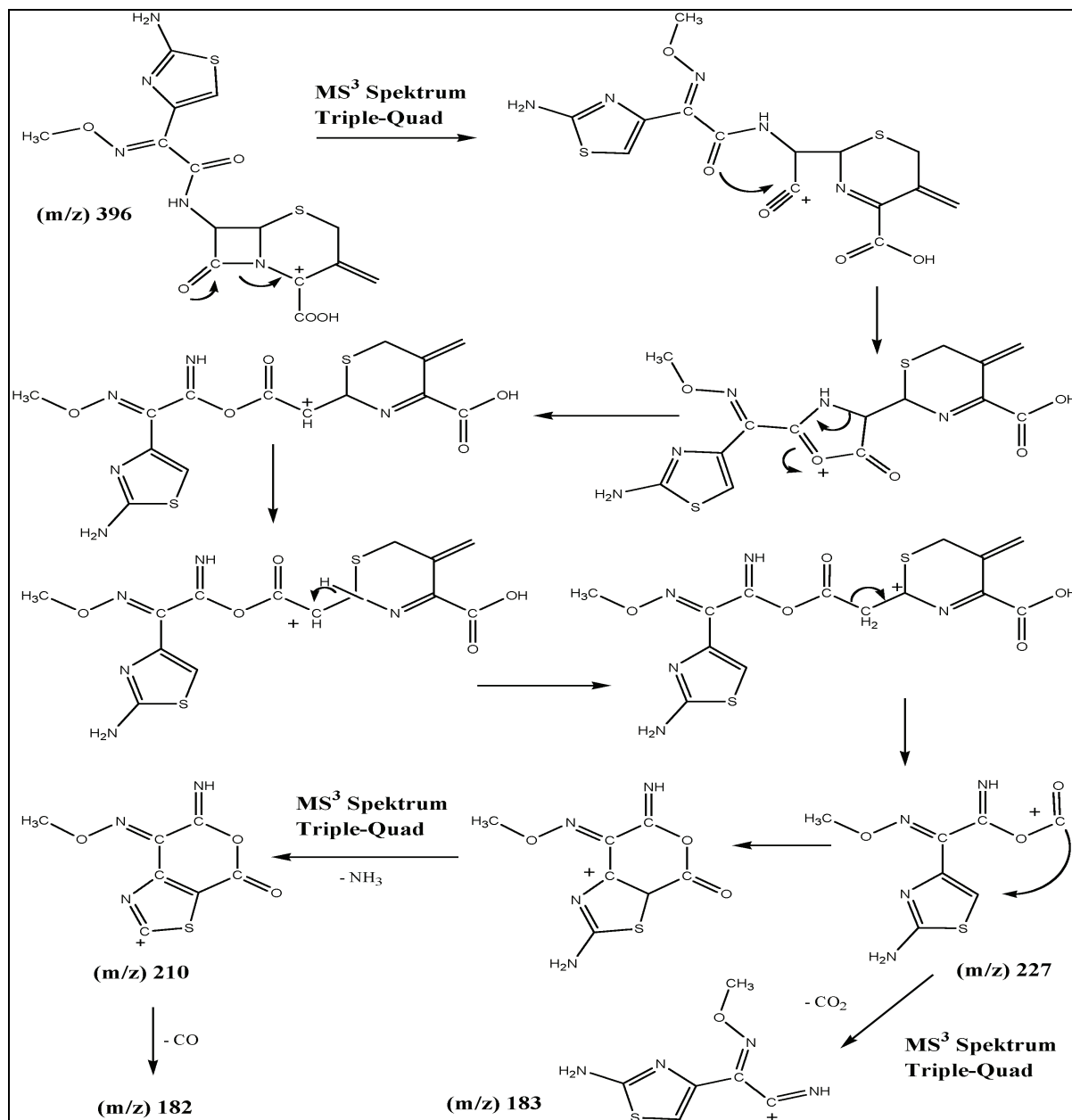


Abb. 54: Vorgeschlagene Fragmentierung von (m/z) 396 zu (m/z) 227, 210, 182, 183

Neben der klassenspezifischen β -Lactamspaltung ist in Abb. 53 die molekül-spezifische Fragmentierung von (m/z) 396, MS³-Spektrum, unter Bildung der Tochterionen (m/z) 324 (Verlust von CO aus dem β -Lactamring), (m/z) 184 (Verlust des Thiazinringes), (m/z) 156 (Verlust von CO), (m/z) 126 (Verlust von Formaldehyd), dargestellt. Das Fragmention (m/z) 184 zerfällt dabei weiter unter Verlust von NH_3 und CO zu (m/z) 167 und (m/z) 139. Das Fragmention (m/z) 227 geht ebenfalls aus (m/z) 396 hervor (s. Abb. 54). Durch die weitere Fragmentierung von (m/z) 227 konnte die Bildung von (m/z) 210 (Verlust von NH_3) und (m/z) 183 (Verlust von CO_2)

aus diesem Ion bestätigt werden. Unter Verlust von CO entsteht aus (m/z) 210 das Ion (m/z) 182.

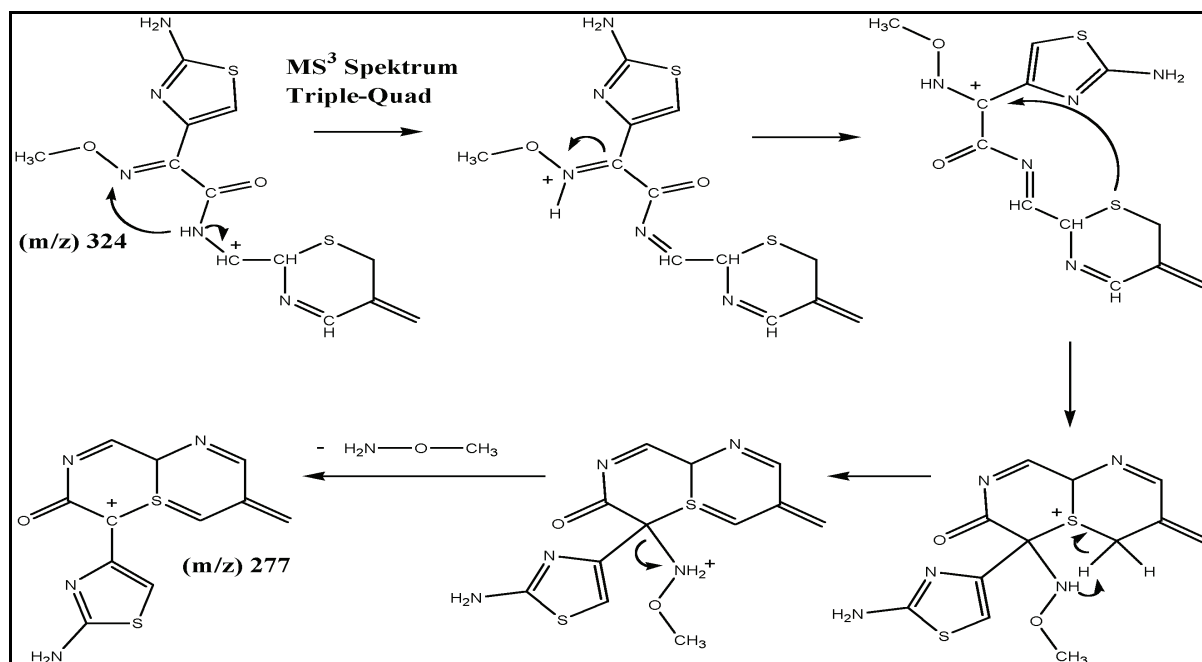


Abb. 55: Vorgeschlagene Fragmentierung von (m/z) 324 zu (m/z) 277

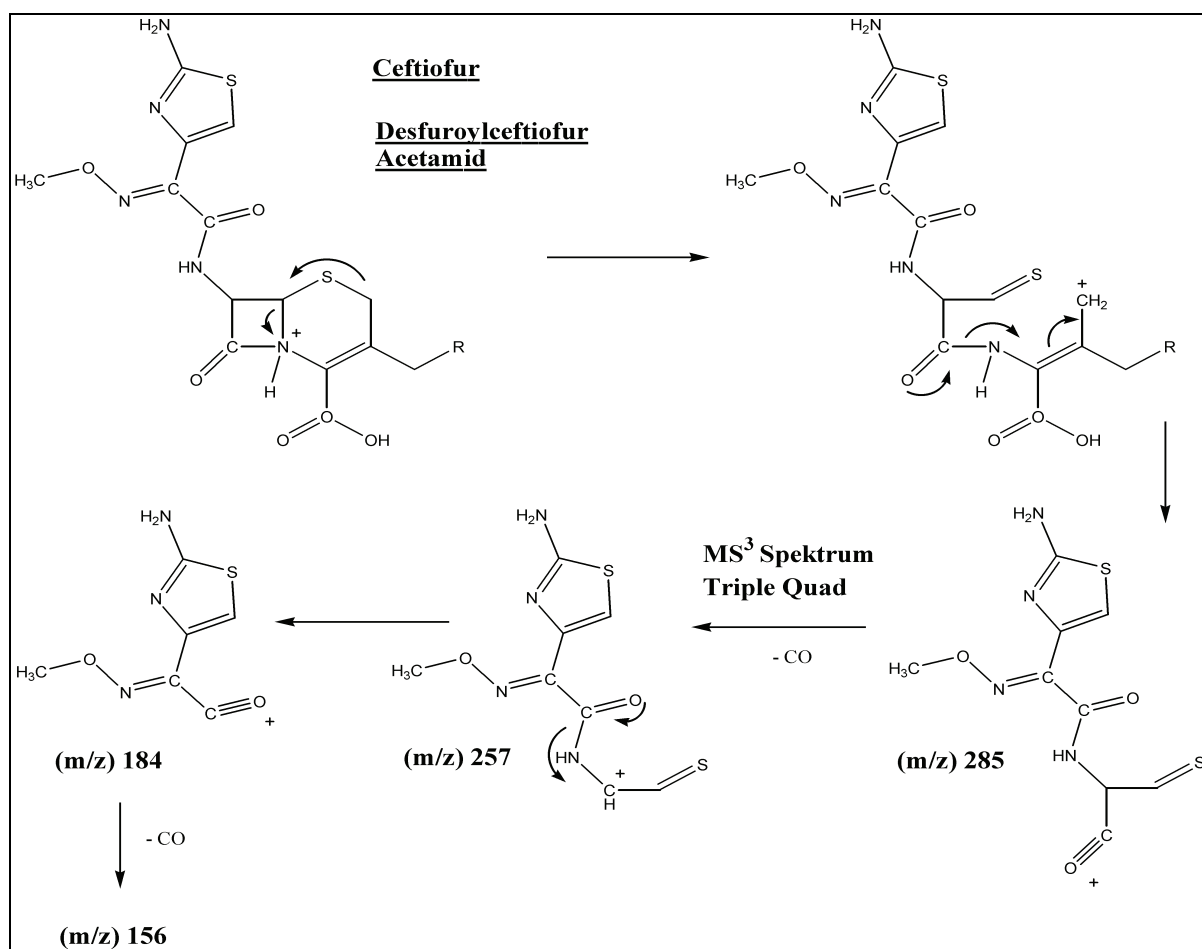


Abb. 56: Vorgeschlagene Bildung von (m/z) 285 aus den protonierten Molekülonen (m/z) 524, 487. Fragmentierung von (m/z) 285 zu (m/z) 257, 184, 156

In Abb. 55 ist ein weiterer Fragmentierungsweg von (m/z) 324 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass, wahrscheinlich nach einer primären Cyclisierung und der Abspaltung von Methoxyamin, (m/z) 277 hervorgeht.

In Abb. 56 ist die Entstehung von (m/z) 285, 257 aus den protonierten Molekülonen von Ceftiofur und DCA beschrieben. Dieser Mechanismus wurde bereits für Isobutan CI Spektren von Penicillinmethylestern postuliert [183].

2.3.4 Optimierung der Extraktion/Aufreinigung

Bei den konventionellen HPLC-UV-Verfahren sind aufgrund der unselektiven UV-Detektion insgesamt drei zeit- und materialintensive SPE-Aufreinigungsschritte notwendig, um DCA störungsfrei detektieren zu können [179]. Das komplette Analysenschema, welches sich in sechs Schritte unterteilen lässt, ist in Abb. 57 als Übersicht aufgeführt.

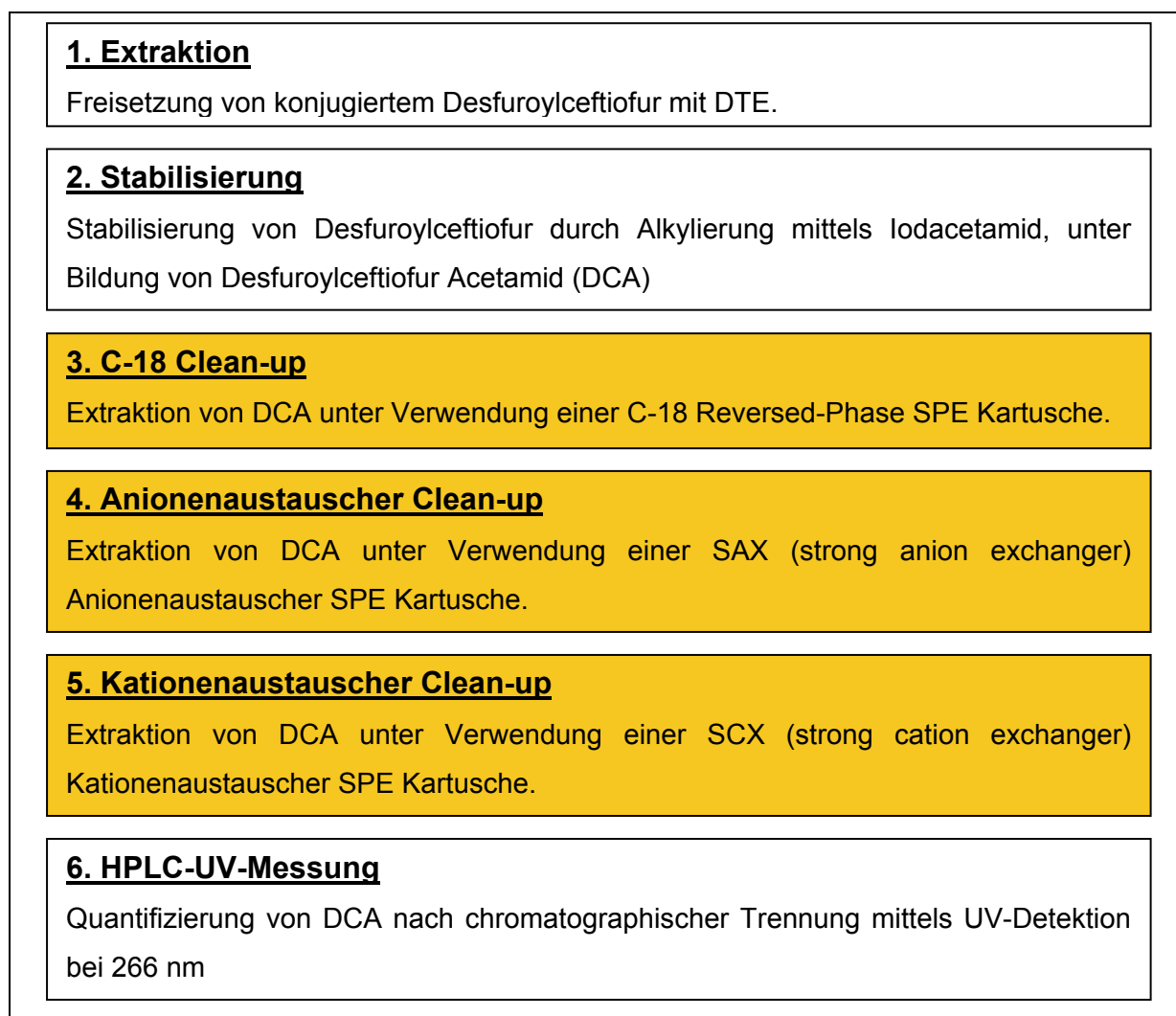


Abb. 57: Analysenschema zur Probenaufarbeitung von Milch mittels der konventionellen HPLC-UV-Methode [179]

Insbesondere die beiden Ionenaustauscherschritte sind für die analytische Praxis als ungünstig zu beurteilen, da diese zum einen die Dauer der Probenaufarbeitung erhöhen und zum anderen zusätzliche Fehlerquellen darstellen. Es war deshalb das Ziel dieser Arbeit, unter Verwendung der hochselektiven LC-MS/MS-Technik eine Probenaufarbeitung zu entwickeln, bei welcher die beiden Ionenaustauscherschritte nicht benötigt werden.

Entsprechend der von Beconi-Barker et al. publizierten HPLV-UV-Methode [179] erfolgte die Extraktion mit DTE und die anschließende Stabilisierung des freien Desfuroylceftiofurs mittels Iodacetamid. Das genaue Analysenschema der entwickelten LC-MS/MS-Methode ist unter Punkt 3.2.5 beschrieben.

Für die Probenaufreinigung wurde die bereits bei der β -Lactam-Multimethode verwendete SPE-Kartusche (Waters Oasis HLB) mit dem Polymerharzsorbent verwendet, da diese besonders für die Extraktion der amphoteren β -Lactame geeignet ist, wozu auch Desfuroylceftiofur Acetamid gehört. Die Herstellung des analytischen Standards fand parallel zum beschriebenen Analysenschema statt, da dieser kommerziell nicht erwerblich ist.

Durch den Einsatz der hochselektiven LC-MS/MS-Technik war es möglich, gegenüber der unselektiveren HPLC-UV-Technik, auf zwei der insgesamt drei SPE-Aufreinigungsschritte zu verzichten (s. Abb. 58). Insgesamt konnte dadurch der Zeitaufwand für die Probenaufarbeitung sowie die anfallenden Materialkosten für die SPE-Kartuschen deutlich minimiert werden.

HPLC-UV-Methode nach [179]	Entwickelte LC-MS/MS-Methode
1. Extraktion mit Dithioerythritol (DTE)	1. Extraktion mit Dithioerythritol (DTE)
2. Stabilisierung mit Iodacetamid	2. Stabilisierung mit Iodacetamid
3. C-18 SPE-clean-up	3. Polymerphasen SPE-clean-up
4. Anionenaustauscher SPE-clean-up	
5. Kationenaustauscher SPE-clean-up	
6. HPLC-UV-Messung	4. LC-MS/MS-Messung

Abb. 58: Gegenüberstellung der benötigten Probenaufarbeitungsschritte der HPLC-UV-Methode nach Beconi-Barker et al. [179] und der in dieser Arbeit entwickelten LC-MS/MS-Methode

Ein LC-MS/MS-Chromatogramm einer dotierten Milch am halben MRL (entsprechend 50 µg/kg Desfuoylceftiofur) ist in Abb. 59 dargestellt. Trotz der stark reduzierten Probenaufreinigung war es möglich, Desfuoylceftiofur Acetamid (DCA) störungsfrei zu messen.

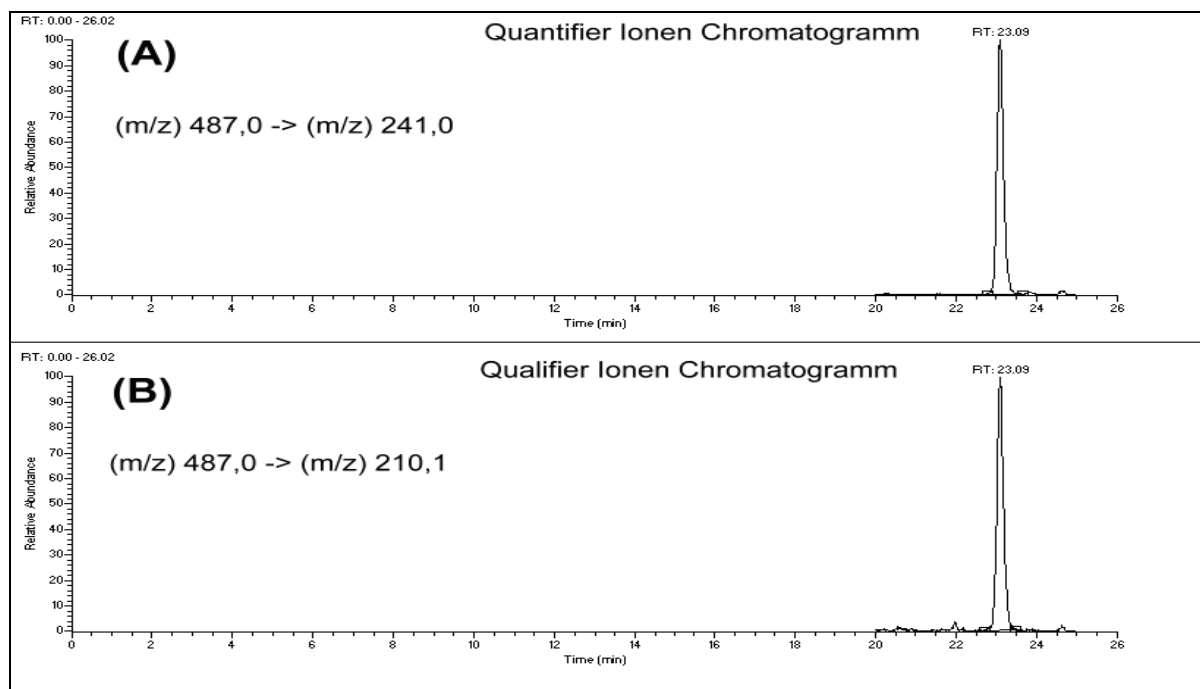


Abb. 59: LC-MS/MS-Chromatogramm einer dotierten Milchprobe am halben MRL (entsprechend 50 µg/kg Desfuoylceftiofur)

2.3.5 Auswirkungen der Matrixkoextraktive auf die Elektrosprayionisation

Um mögliche Matrixeffekte aufgrund von koeluiierenden Matrixkoextraktiven identifizieren zu können, wurden Milchblindextrakte von 5 unterschiedlichen Milchkühen mit Desfuoylceftiofur Acetamid (entsprechend 100 µg/kg Desfuoylceftiofur) dotiert.

Alle 5 untersuchten Blindrohmilchextrakte zeigten keine signifikanten Signalsuppressions- oder Signalerhöhungseffekte auf Seiten der ESI. Der berechnete Mittelwert betrug 97% bei einer Standardabweichung von $\pm 4,4\%$ und einem Variationskoeffizient von 5%. Die Wiederfindungen sind in Abb. 60 für jede einzelne Milchprobe dargestellt.

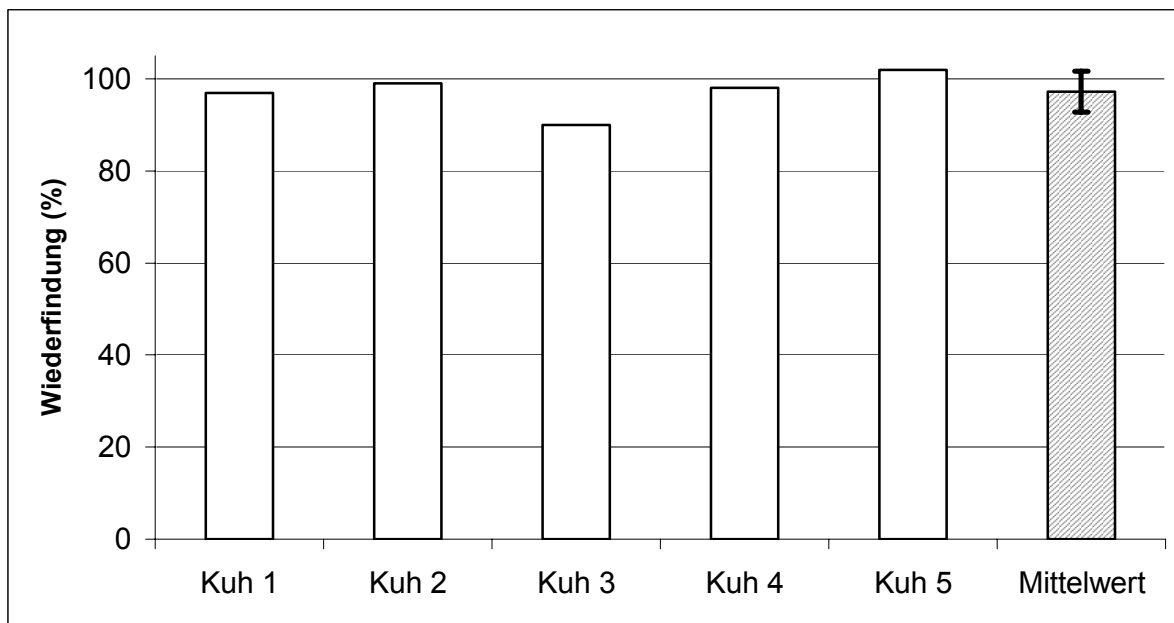


Abb. 60: Einfluss der Matrixkoextraktive auf die ESI von Desfuroylceftiofur Acetamid in 5 verschiedenen Rohmilchextrakten.

Es war deshalb nicht wie bei der LC-MS/MS-Multimethode für die β -Lactame notwendig, Matrixeffekt Faktoren für eine Korrektur zu verwenden.

2.3.6 Vergleich von LC-MS/MS- und Screening-Ergebnissen für die Bestimmung von Ceftiofurrückständen in Milch von einer mit Ceftiofur behandelten Kuh

Um die Praxistauglichkeit der entwickelten LC-MS/MS-Methode zu überprüfen, wurden Rohmilchproben von einer mit Ceftiofurhydrochlorid (Excenel[®] RTU) behandelten und an postpartaler Metritis erkrankten Kuh untersucht.

Hierzu wurde eine laktierende Kuh mit 650 kg Gewicht für 3 Tage im Abstand von 24 h nach Herstellerangaben mit 1 mg Ceftiofur je kg Körpergewicht behandelt. Das Tier bekam jeweils morgens nach dem ersten Melken eine subkutane Injektion. Am Abend des gleichen Tages wurde die Milch für die Untersuchung entnommen.

Diese Milch wurde mit der entwickelten LC-MS/MS-Methode sowie mit einem schnell durchzuführenden Screening-Test (kompetitiver Rezeptor-Bindungs-Test: Charm II-Test) untersucht. Dabei sollten die Ergebnisse aus beiden Verfahren miteinander verglichen werden. Die Ergebnisse werden im folgenden beschrieben.

2.3.6.1 LC-MS/MS-Ergebnisse

In allen während der Behandlung genommenen und untersuchten Milchproben konnten mit der entwickelten LC-MS/MS-Methode, unter Einhaltung der EU Leistungsanforderungen, Cefuroximrückstände bestätigt und quantifiziert werden. Das relative Peakflächenverhältnis von Quantifier zu Qualifier der gemessenen Proben entsprach exakt dem des analytischen Standards. Eine Zusammenfassung der gemessenen Gehalte sowie ein LC-MS/MS-Chromatogramm der Milch am dritten Behandlungstag ist in der Tab. 21 und in der Abb. 61 dargestellt.

Tab. 21: Gemessene Desfuroylcefuroxim Konzentrationen in der Milch einer behandelten Kuh

Behandlungstag	Gemessene Desfuroylcefuroxim Konzentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Relatives Peakflächenverhältnis (%)	
		Proben	Analytischer Standard
0	n.d.	-	35
1	6.8	34	
2	21.8	35	
3	21.2	35	

n.d. = nicht nachweisbar

Die höchsten Desfuroylcefuroximgehalte konnten am zweiten und dritten Behandlungstag gemessen werden. Diese lagen bei ca. 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und um ca. den Faktor 5 deutlich unter dem MRL von 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

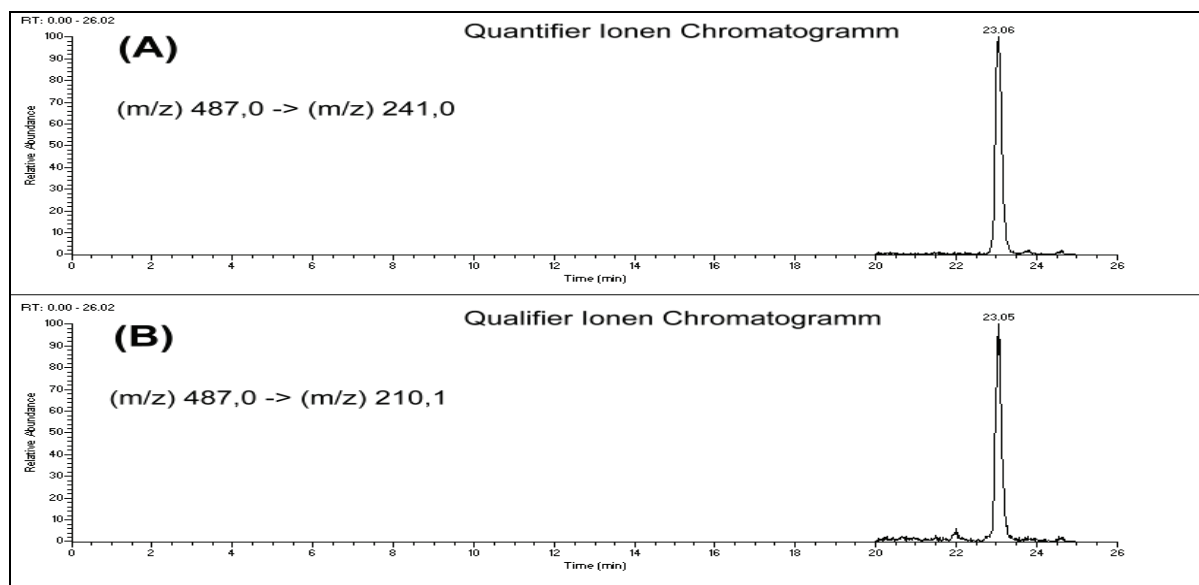


Abb. 61: LC-MS/MS-Chromatogramm einer Milchprobe am dritten Behandlungstag.

Abschließend wurden die gemessenen Gehalte mit einer bereits publizierten Studie zum Ausscheidungsverhalten von Ceftiofur in Milch [182] auf ihre Plausibilität geprüft. Bei dieser Publikation wurde milchgebenden Kühen die 2,2-fache der in der EU zugelassenen Dosis (2,2 mg Ceftiofur je Kg Körpergewicht) verabreicht und die Gesamtceftiofurrückstände, berechnet als Desfuroylceftiofur, mittels einer nicht näher beschriebenen HPLC-UV-Methode bestimmt.

Die quantifizierten Gehalte lagen im Mittel zwischen 57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 89 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Da zwischen der verabreichten Dosis und den Rückständen eine annähernde Proportionalität besteht, können diese Werte nach der Division mit dem Faktor 2,2 direkt mit den in dieser Arbeit erhaltenen Werte verglichen werden [182]. Nach der Korrektur dieser Werte lagen die Gehalte somit zwischen 25,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 40,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Diese Werte korrelieren sehr gut mit den mittels der LC-MS/MS-Methode quantifizierten Gehalten von ca. 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in der Milch des zweiten und dritten Behandlungstages.

2.3.6.2 Charm II-Test Ergebnisse

Alle mittels der LC-MS/MS-Methode untersuchten Milchproben wurden mit dem Charm II-Test (β -Lactam Test for Maximum Residue Limits (MRL), Sequential Assay) nachuntersucht.

Im ersten Schritt des Charm II-Tests wird der Matrixblindwert durch das Messen der Zählimpulse (cpm = counts per minute) von 6 Milchproben ermittelt. Entsprechend der Herstellerangabe wird aus diesen Einzelwerten der Mittelwert gebildet und daraus abzüglich 20 % der Kontrollpunkt errechnet.

Der Kontrollpunkt stellt die Entscheidungsgrenze für die Anwesenheit von β -Lactam Rückständen dar. Eine Probe gilt als positiv, wenn die gemessenen Zählimpulse gleich oder kleiner als der Kontrollpunkt sind. Für die Matrixblindwerte und die 4 während der Medikamentierung genommenen Milchproben wurden folgende Zählimpulse ermittelt (Tab. 22).

Tab. 22: Zählimpulse für die sechs Matrixblindwerte sowie für die gewachsenen Milchproben.

Blindproben	Zählimpulse (cpm)	Kontrollpunkt (CP)
Milchblindwert 1	1327	MW = 1231
Milchblindwert 2	1263	20% MW = 246
Milchblindwert 3	1150	CP = 1231-246
Milchblindwert 4	1135	
Milchblindwert 5	1250	
Milchblindwert 6	1262	
<u>CP = 985</u>		
Gewachsene Milchproben	Zählimpulse (cpm) (n=2)	Ergebnis
Behandlungstag 0	1049	negativ (> CP)
Behandlungstag 1	908	positiv (< CP)
Behandlungstag 2	800	positiv (< CP)
Behandlungstag 3	780	positiv (< CP)

Die erhaltenen Charm II-Testergebnisse stimmen mit den quantitativen LC-MS/MS-Ergebnissen vollständig überein. Es wurden mit dem Screening-Test für die gewachsenen Milchproben weder falsch positive noch falsch negative Ergebnisse erhalten.

Ferner besitzt der Charm II-Test für gewachsene Ceftiofurrückstände eine sehr hohe Empfindlichkeit. Obwohl die vom Hersteller angegebene Nachweisgrenze des Tests 40 µg/kg beträgt, konnte mit diesem eine Desfuroylceftiofurkonzentration von 6,8 µg/kg (s. 2.3.6.1) in der Milch des ersten Behandlungstages nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass der Charm II-Test für alle Milchproben positive Ergebnisse lieferte, die teilweise um den Faktor 15 unterhalb des MRL lagen, verdeutlicht die Notwendigkeit, eine präzise und richtige Quantifizierung von Desfuroylceftiofurrückständen mittels einer leistungsfähigen physikalisch-chemischen Methode durchzuführen.

Nur so können möglicherweise falsche Interpretationen der Screening-Ergebnisse vermieden werden.

2.4 LC-MS/MS-Methodenentwicklung für die Bestimmung von vier Aminoglycosiden in Rinderniere

Aminoglycoside sind hochpolare, polykationische Verbindungen, die auf unpolaren Reversed-Phase HPLC-Säulen nicht retardiert werden. Die Ionenpaarchromatographie (IP) ist deshalb das in der Literatur am häufigsten beschriebene Verfahren, um eine Retention und Chromatographie der Aminoglycoside zu erreichen.

Bei den konventionellen HPLC-Verfahren werden dabei nichtflüchtige Alkansulfonsäuren als Gegenionen eingesetzt (Pentan-, Hexan- und Heptan- und Octansulfonate) [20], während bei den LC-MS-Verfahren flüchtige fluoridierte Carbonsäuren (Pentafluorpropionsäure, Heptafluorbuttersäure) verwendet werden [76, 77, 78, 34, 80]. Die Verwendung der flüchtigen Ionenpaarreagentien ermöglicht zwar bei den LC-MS-Verfahren eine Chromatographie der Aminoglycoside, jedoch führt dieser Einsatz zu einer Verringerung der Sensitivität [78, 184].

Ursächlich für diesen Sensitivitätsverlust sind starke Ionenpaarwechselwirkungen zwischen den protonierten Analyten und den negativ geladenen fluoridierten Carbonsäuren in der Gasphase, wodurch es letztlich zu einer Ladungsneutralisierung kommt [185]. Darüber hinaus führt die Ionenpaarbindung in Lösung vermutlich zu einer schlechteren elektrophoretischen Ladungstrennung an der Elektrospraynadel [186].

Weitere Probleme, die mit dem Einsatz von Ionenpaarreagentien verbunden sind, stellen Verschleppungen dar. In Vorversuchen zeigte sich, dass Heptafluorbuttersäure mehrere Tage nach der letzten Verwendung im Massenspektrometer detektiert werden konnte und dass die Empfindlichkeit des LC-MS-Systems bei nachfolgenden Messungen stark verringert war.

Aufgrund der oben beschriebenen Probleme sollte es das Ziel sein, eine chromatographische Trennung der zu messenden Aminoglycoside (Spectinomycin, Strepto-, Dihydrostreptomycin und Gentamicin C1) ohne die Verwendung von Ionenpaarreagentien zu entwickeln.

2.4.1 Optimierung der chromatographischen Trennung (HPLC) mittels Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)

Als Alternative zur Ionenaarchromatographie wurde die Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) für die Chromatographie der Aminoglycoside als am besten geeignet angesehen. HILIC stellt ein chromatographisches Verfahren dar, welches zum ersten Mal von Alpert [187] für die Trennung von Proteinen, Peptiden, Aminosäuren, Oligonucleotiden und Kohlenhydraten näher beschrieben wurde und mittlerweile eine breite Anwendung für die Trennung von hochpolaren Verbindungen hat [188, 189, 190, 191, 192].

Im Gegensatz zur Umkehrphasen-Chromatographie ist bei der HILIC der organische Anteil in der mobilen Phase das Lösungsmittel mit der geringsten und der wässrige Anteil das Lösungsmittel mit der stärksten Elutionskraft. Üblicherweise wird bei der HILIC eine Gradientenelution verwendet, die mit einem hohen organischen Lösungsmittelanteil mit ca. 80 % Acetonitril beginnt und bei einem hohen wässrigen Lösungsmittelanteil endet. Dabei eluieren die weniger polaren Verbindungen zuerst und die polarsten Verbindungen zuletzt.

Wegen dieser Elutionsreihenfolge wird diese Art der Chromatographie auch als „Reversed Reverse-Phase“ Chromatographie bezeichnet. Für die HILIC werden hydrophile Packungsmaterialien verwendet, an deren Oberfläche sich eine mit Wasser angereicherte immobilisierte Schicht ausbildet. Zwischen dieser polaren Phase und der (unpolaren) mobilen Phase findet die Verteilung der zu chromatographierenden Verbindungen statt [187].

Die HILIC wurde für die Trennung von Aminoglycosid-Standards bis jetzt nur einmal an einer mit Poly(2-hydroxyethyl-aspartamid)-modifizierten Silikaphase (Polyhydroxyethyl A) beschrieben [193]. Die Chromatographie war jedoch aufgrund des Auftretens von Doppelpeaks unzureichend. Zur Unterdrückung dieser Doppelpeaks war eine sehr hohe Pufferkonzentration im Eluenten von bis zu 200 mM (Ammoniumacetat) notwendig, die in dieser Größenordnung jedoch problematisch für die ESI ist.

Es sollte deshalb in dieser Arbeit die Möglichkeit untersucht werden, eine HILIC mit kommerziell erhältlichen HPLC-Phasen zu entwickeln, die analog zur β -Lactam

Multimethode mit minimalen Additivkonzentrationen in der mobilen Phase auskommen.

2.4.1.1 Effekt des Acetonitrilgehaltes in der mobilen Phase auf die Retention

Insgesamt wurden drei verschiedene kommerziell erhältliche HPLC-Phasen getestet, welche für die HILIC theoretisch geeignet sind. Es handelte sich dabei um die bereits für die β -Lactam Multimethode verwendete hydrophil desaktivierte „polar endcapped“ Phenyletherphase sowie um eine Nitril- und Aminophase.

In Vorversuchen zeigte sich, dass ausschließlich mit der Phenyletherphase eine gute Chromatographie der Aminoglycoside zu erzielen war. Die Nitril- sowie die Aminophase zeigten ein extrem ausgeprägtes Tailing für diese basischen Substanzen. Wahrscheinlich ist dieses Tailing auf sekundäre Wechselwirkungen zwischen den Restsilanolgruppen der HPLC-Phase zurückzuführen. Alle weiteren Untersuchungen wurden deshalb mit der Phenyletherphase durchgeführt.

Für die zu entwickelnde HILIC wurde als Eluent HPLC-Wasser, dem eine minimale Konzentration von 0,005% (v/v) Ameisensäure zugesetzt wurde (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B), verwendet.

Unter isokratischen Bedingungen konnte ab einer Acetonitrilkonzentration von ca. 40% eine signifikante Retentionssteigerung der Aminoglycoside erreicht werden. In Übereinstimmung mit der Theorie von HILIC nahm die Retention mit steigendem Acetonitrilgehalt weiter zu.

Die ermittelten Retentionsfaktoren in Abhängigkeit des Acetonitrilgehaltes (%) sind für die 4 untersuchten Aminoglycoside in Abb. 62 grafisch dargestellt.

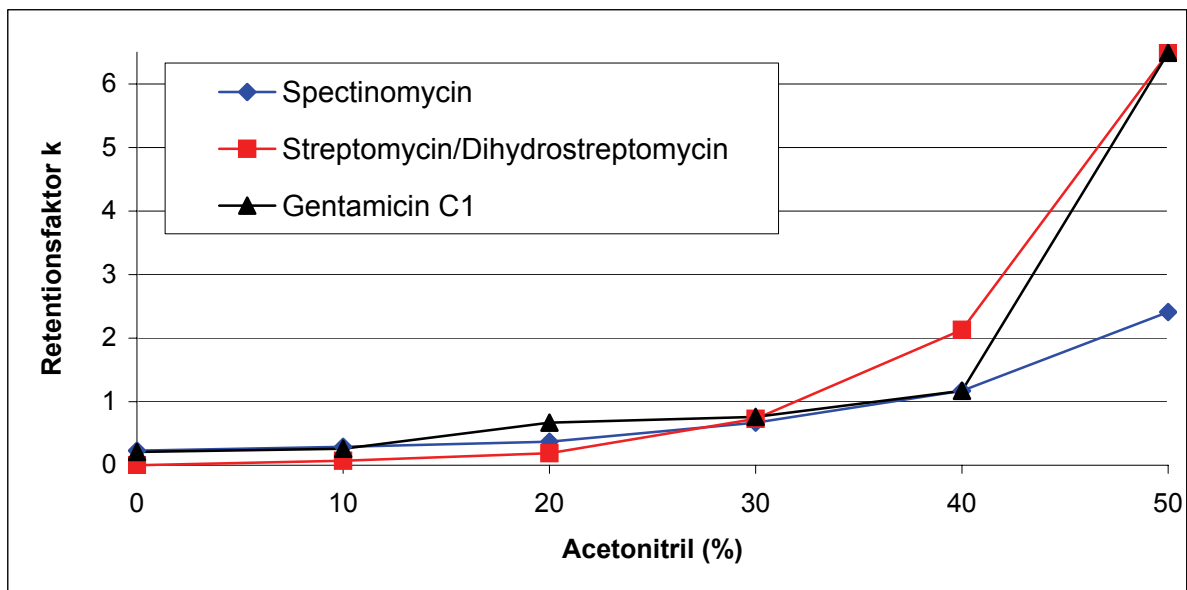


Abb. 62: Abhängigkeit des Retentionsfaktors k für die untersuchten Aminoglycoside vom Acetonitrilgehalt (%) in der mobilen Phase.

Durch die ermittelten Retentionsfaktoren war es möglich, die Aminoglycoside nach ihrer Polarität einzuteilen. Spectinomycin ist aufgrund der niedrigeren k -Faktoren bei hohen Acetonitrilkonzentrationen im Vergleich zu Gentamicin, Strepto- und Dihydrostreptomycin, deutlich unpolarer.

Unter isokratischen Eluentenbedingungen (50% Eluent A und Eluent B) war die Basisbreite der Substanzpeaks sehr hoch (ca. 3 Minuten). Um eine Chromatographie der Substanzen mit einer geringen Basisbreite zu erreichen, war es notwendig, eine Gradientenelution durchzuführen.

Eine optimale Trennung der Aminoglycoside wurde bei einer Säulentemperatur von 37°C und dem in Tab. 23 dargestellten Gradientenprogramm erreicht.

Tab. 23: Entwickeltes Gradientenprogramm für die Chromatographie der Aminoglycoside.

Zeiten (min)	Flussrate (ml/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0 - 5	0,25	20	80
5 - 10	0,25	80	20
10 - 20	0,25	80	20
20 - 30 (Äquilibrieren)	0,25	20	80

Ein typisches Chromatogramm aller 4 Aminoglycoside unter Verwendung der hydrophil desaktivierten Phenyletherphase ist in Abb. 63 dargestellt.

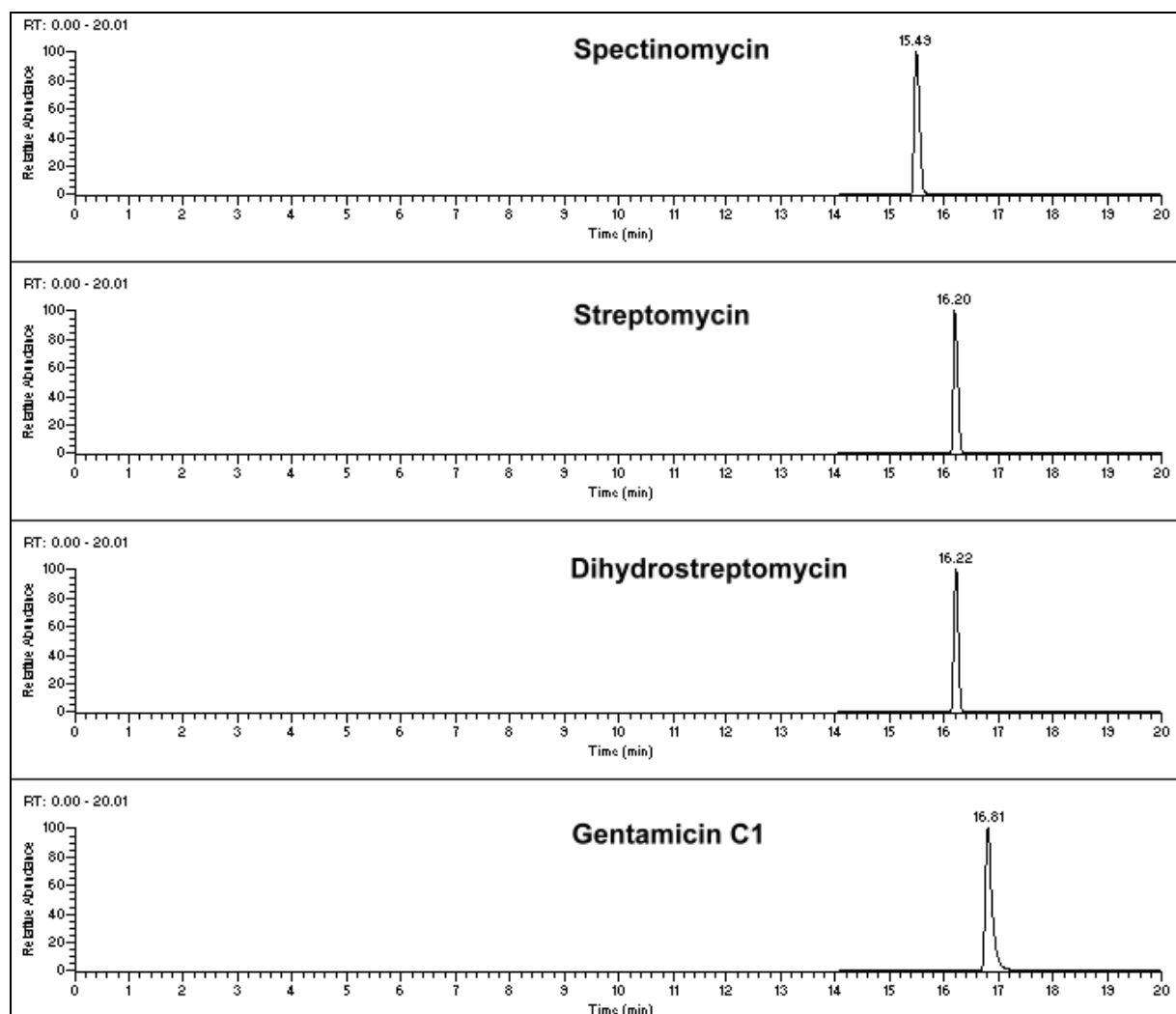


Abb. 63: Multiple Reaction Monitoring (MRM) Chromatogramm von 4 Aminoglycosiden (1000 ng/ml, 10 μ l Injektionsvolumen).

Aus der Abbildung lässt sich erkennen, dass alle Aminoglycoside ohne das Auftreten eines nennenswerten Tailings chromatographiert werden konnten. Es war jedoch nicht möglich, Strepto- und Dihydrostreptomycin voneinander zu trennen. Ebenso konnten die einzelnen Gentamicinkomponenten nicht getrennt werden.

Aufgrund der massenspektrometrischen Selektivität stellt dies jedoch in Bezug auf die Quantifizierung kein Problem dar.

2.4.2 Optimierung des ESI-Triple-Quadrupol-Systems und des Elektrospray-Modus (+/-)

Zur Optimierung des ESI-Triple-Quadrupol-Gerätes auf die zu messenden Aminoglycoside war es notwendig, die bereits unter Punkt 2.2.2 beschriebenen variablen Parameter zu optimieren. Eine Zusammenfassung der erhaltenen Optimierungswerte ist in Tab. 24 dargestellt.

Tab. 24: Optimierungswerte für das ESI-Triple-Quadrupol-System.

Substanz	Kapillar-Temperatur (°C)	Nadelspannung (kV)	Sheatgasdruck (psi)
Spec	380	5	70
Str	390	5	70
Dhs	390	5	70
Gent C1	360	5	70

Bis auf die Kapillartemperaturen besitzen alle Aminoglycoside identische Optimierungswerte. Da die individuelle Anpassung der Kapillartemperatur für jedes Aminoglycosid während des chromatographischen Laufes zu träge wäre, war es notwendig, für die LC-MS/MS-Methode als Kompromiss eine gemeinsame Temperatur zu verwenden. Prinzipiell sollte sich die Wahl der Kapillartemperatur an dem Aminoglycosid orientieren, das die geringste Messempfindlichkeit zeigt, d.h. dem Gentamicin C1. Jedoch war die hauptsächliche Zielrichtung eine LC-MS/MS-Methode zu entwickeln, die in der Lage ist, gewachsene Dhs- sowie Str-Rückstände zu messen. Die Kapillartemperatur wurde deshalb auf 390°C festgesetzt.

Unter den verwendeten sauren Eluentenbedingungen liegen die untersuchten Aminoglycoside vollständig protoniert in Lösung vor. Alle Aminoglycoside waren deshalb mit maximaler Empfindlichkeit im positiven ESI-Modus als protonierte Spezies messbar. Obwohl bei den Verbindungen wegen ihrer polybasischen Eigenschaften eine Mehrfachprotonierung theoretisch möglich ist, konnte dies in dieser Arbeit im Gegensatz zu anderen Publikationen nicht beobachtet werden. Es kam zur intensiven Bildung von einfach protonierten Quasimolekülonen.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Aminoglycosiden konnte Spectinomycin ausschließlich als ein protoniertes Wasser-Adduktion $[M+H_2O+H]^+$ gemessen werden, da Spectinomycin in wässriger Lösung als Keto-Hydrat vorliegt [34, 76].

2.4.3 Linearität der Messung

Im Anschluss an die Optimierungen wurde die Linearität der Messung mit Kalibrierlösungen überprüft. Die Kalibrierungen wurden für 20, 50, 100, 150 und 200 ng/ml durchgeführt.

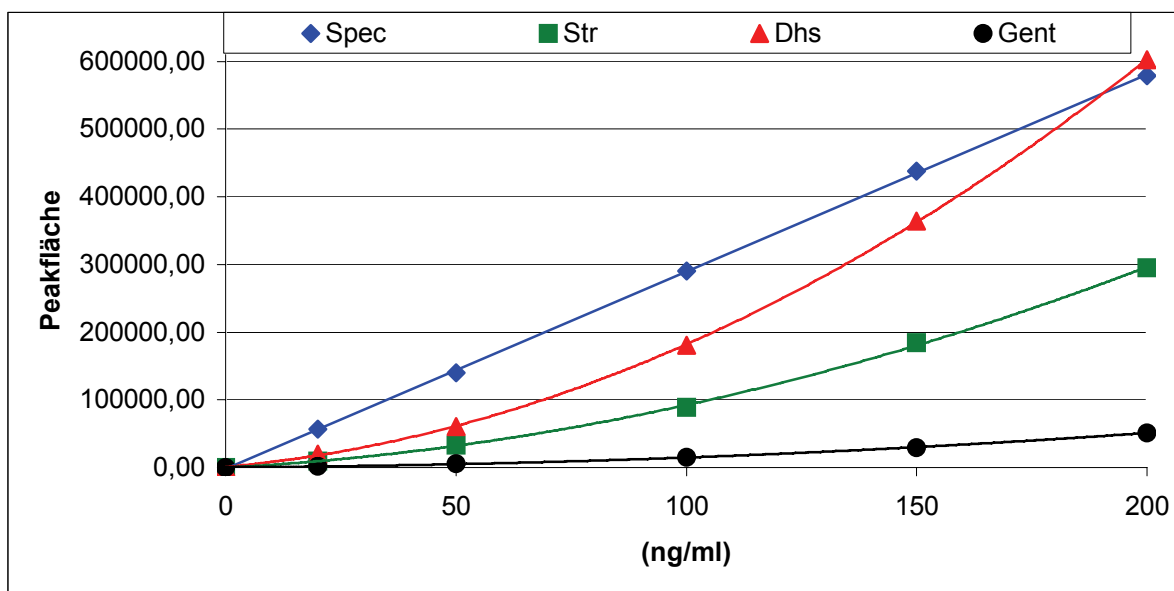


Abb. 64: Ermittelte Ausgleichsgeraden für Spectinomycin, Streptomycin, Dihydrostreptomycin und Gentamicin C1 (20, 50, 150, 200 ng/ml). Lineare Anpassung für SPC und quadratische Anpassung für Str, Dhs und Gent.

Die gemessenen Peakflächen (Quantifier-Ion) in Abhängigkeit der Konzentration sowie die dazugehörigen Kalibrierfunktionen (Ausgleichsgeraden) sind für Spec, Str, Dhs und Gent in Abb. 64 dargestellt.

Aus der Abbildung kann man erkennen, dass nur für Spectinomycin eine Proportionalität zwischen der gemessenen Peakfläche und der Konzentration vorhanden ist. Alle anderen Aminoglycoside zeigen einen quadratischen Zusammenhang. Dieser Zusammenhang wurde mit dem F-Test nach Mandel bestätigt.

Für die Ermittlung der Ausgleichsgeraden war es deshalb notwendig, für Spec eine lineare Regression und für Str, Dhs und Gent eine quadratische Anpassung durchzuführen. Die ermittelten Kalibrierfunktionen und das Bestimmtheitsmaß R^2 sind für alle Aminoglycoside in Tab. 25 aufgeführt.

Tab. 25: Optimale Regressionsmodelle für die zu messenden Aminoglycoside

Substanz	Regressionsmodell	Kalibrierfunktion	R ²
Spec	linear	$y = 2912,4x - 1748,8$	0,9999
Str	quadratisch	$y = 5,5763x^2 + 367,54x - 175,14$	0,9996
Dhs	quadratisch	$y = 12,01x^2 + 609,09x + 966,32$	1,0000
Gent C1	quadratisch	$y = 1,0986x^2 + 32,821x + 546,4$	0,9992

Die Ergebnisse der Linearitätsuntersuchungen lassen erkennen, dass bei den polaren Aminoglycosiden eine quadratische Anpassung notwendig ist. Das unpolare Spec zeigt dagegen einen linearen Verlauf. Da durch Flow-Injection-Versuche adsorptive Effekte z.B. an der HPLC-Säule und dem Injektor des Autosamplers ausgeschlossen werden konnten, ist die Ursache dafür mit großer Wahrscheinlichkeit auf Seiten der ESI oder dem Elektrospray-Interface zu suchen.

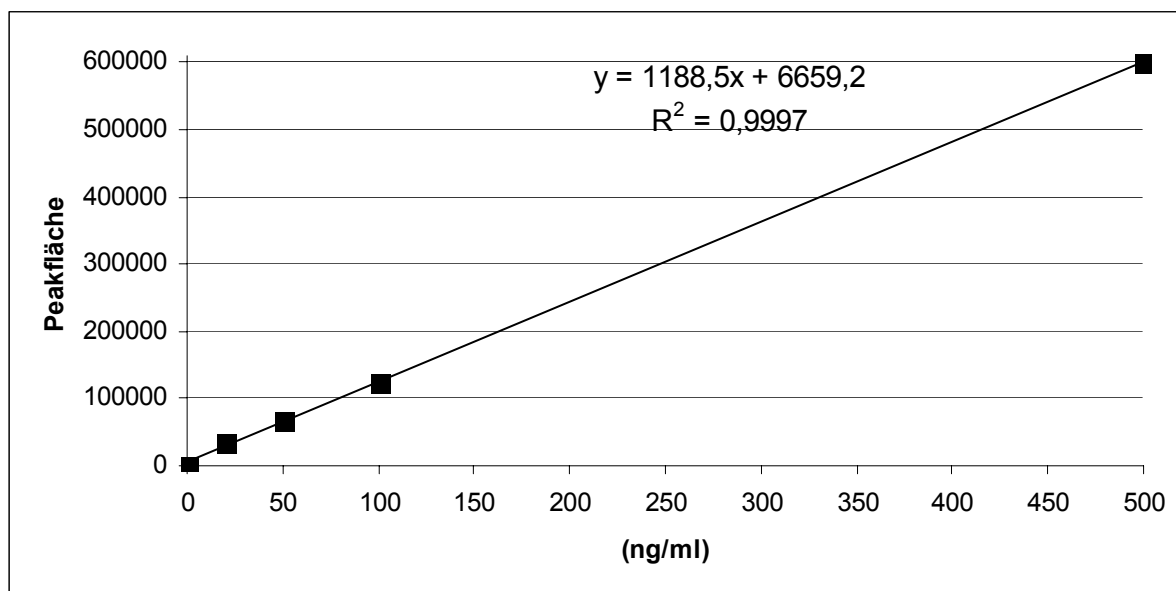


Abb. 65: Ermittelte Ausgleichsgeraden für Gentamicin C1 (20, 50, 100, 500 ng/ml) unter Verwendung eines anderen LC-MS/MS-Systems (Finnigan TSQ Quantum)

Durch weitergehende Untersuchungen an einem anderen LC-MS/MS-System (Finnigan TSQ Quantum), konnte am Beispiel von Gentamicin C1 gezeigt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Peakfläche zu erreichen war (s. Abb. 65).

Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit benutzten LC-MS/MS-System besitzt dieses Gerät ein anderes Elektrospray-Interface. Es handelt sich dabei um ein orthogonales Interface, welches nicht direkt auf die beheizte Kapillare sprüht. Vermutlich hat dieses andere Design einen positiven Einfluss auf den Elektrosprayprozess.

2.4.4 Optimierung der Extraktion/Aufreinigung für die Matrix Rinderniere

Die Bestimmung von Aminoglycosiden in tierischen Geweben, insbesondere in der Niere, ist äußerst schwierig. Nur wenige LC-MS-Verfahren wurden deshalb für tierische Matrices publiziert. Infolge der hohen Bindungseigenschaften der Aminoglycoside an Glasgeräte und an die Gewebematrix ist generell mit Problemen in Bezug auf die erreichbare Extraktionsausbeute und Präzision zu rechnen [19].

Die Möglichkeit der Entwicklung einer schnellen und möglichst einfachen Probenaufarbeitung in Verbindung mit der LC-MS/MS-Messtechnik soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

2.4.4.1 Wahl der Extraktions- und Deproteinierungsbedingungen

Wegen der sehr hohen Hydrophilie der Aminoglycoside und der damit verbundenen Unlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln wird die Extraktion in der Regel mit sauren oder alkalischen Puffern durchgeführt [79, 80, 194, 195, 196, 197]. Trichloressigsäure oder Perchlorsäure werden dabei für die Acidifizierung und Natronlauge für die Alkalisierung verwendet. Die hohen oder niedrigen pH-Werte der Puffer sind deshalb notwendig, um die aufgrund von ionischen Wechselwirkungen (Bindung an negativ geladene Phospholipidmembranen) proteingebundenen Aminoglycoside aus dem Nierengewebe freizusetzen.

Die nachfolgende Extraktreinigung findet mit Kationenaustauscher SPE-Kartuschen statt. Schwache Kationenaustauscher (WCX) werden dabei bevorzugt verwendet, da die Retention der polykationischen Aminoglycoside auf starken Kationenaustauschern (SCX) zu hoch ist und somit eine quantitative Elution der Aminoglycoside erschwert wird [18].

Prinzipiell stellt der Kationenaustauschschritt den kritischsten Schritt bei der Probenaufarbeitung dar, da die erreichbaren Wiederfindungen stark vom Hersteller der Materialien und den verwendeten Chargen abhängen [196].

2.4.4.1.1 Extraktion und Deproteinierung mittels Ultrafiltration (UF)

Um den Kationenaustauscherschritt zu umgehen und dadurch die Gefahr von Analytverlusten bei der Probenaufarbeitung möglichst klein zu halten, sollte in dieser Arbeit die Möglichkeit untersucht werden, die mittels einer wässrigen Extraktion erhaltenen Probenextrakte lediglich durch einen einfach und schnell

durchzuführenden Ultrafiltrationsschritt (Deproteinierung) aufzureinigen. Die Ultrafiltration stellt einen druckabhängigen Prozess dar, bei dem niedermolekulare, gelöste Stoffe, von Makromolekülen an einer semipermeablen Membran mit einem bestimmten Molekulargewichts cut-off abgetrennt werden. Bis jetzt wurde eine analoge Vorgehensweise für die Probenaufarbeitung von Nierenextrakten noch nicht beschrieben.

Die wässrige Extraktion fand bei einem alkalischen pH-Wert von 8,5 statt, um die Proteinbindung der Aminoglycoside an das Nierengewebe zu minimieren [197]. Da die zu untersuchenden Aminoglycoside eine sehr starke Bindung an Glasoberflächen zeigten, war es für die gesamte Probenaufarbeitung zwingend notwendig, auf Glasgefäße zu verzichten. Um dies zu realisieren, wurden für die Extraktion Polypropylenzentrifugenröhrchen verwendet. Ferner wurden gezielt Ultrafiltrationseinheiten mit einem Plastikgehäuse und einer Polyethersulfon-Plastikmembran verwendet. Diese Membran mit einem cut-off von 100 kDa besitzt sehr geringe Adsorptionseigenschaften, weshalb die Möglichkeit einer adsorptiven Bindung der Aminoglycoside an die Membran sehr niedrig sein sollte.

Durch das entwickelte Ultrafiltrationsverfahren (s. 3.3.5) wurden klare Extrakte erhalten, die direkt in das LC-MS/MS-System injiziert werden konnten. Obwohl insgesamt 500 µl Nierenextrakt zur Ultrafiltration eingesetzt wurden, lag die Filtratausbeute (Zentrifugation bei 3000g für 30 min) bei ca. 50 µl, da die Membran schnell verstopfte.

Jedoch war diese Filtratmenge bei einem Injektionsvolumen von 10 µl ausreichend.

2.4.5 Auswirkungen der Matrixkoextraktive auf die Elektrosprayionisation

Um mögliche Matrixeffekte aufgrund von koeluierenden Matrixkoextraktiven identifizieren zu können, wurden 3 Nierenblindextrakte von 3 unterschiedlichen Rindern mit Spec, Str und Dhs (entsprechend 1000 µg/kg) dotiert. Die Effekte für Gent wurden mit einer Doppelbestimmung ermittelt. In Abb. 66 sind die Wiederfindungen für jedes einzelne Aminoglycosid dargestellt.

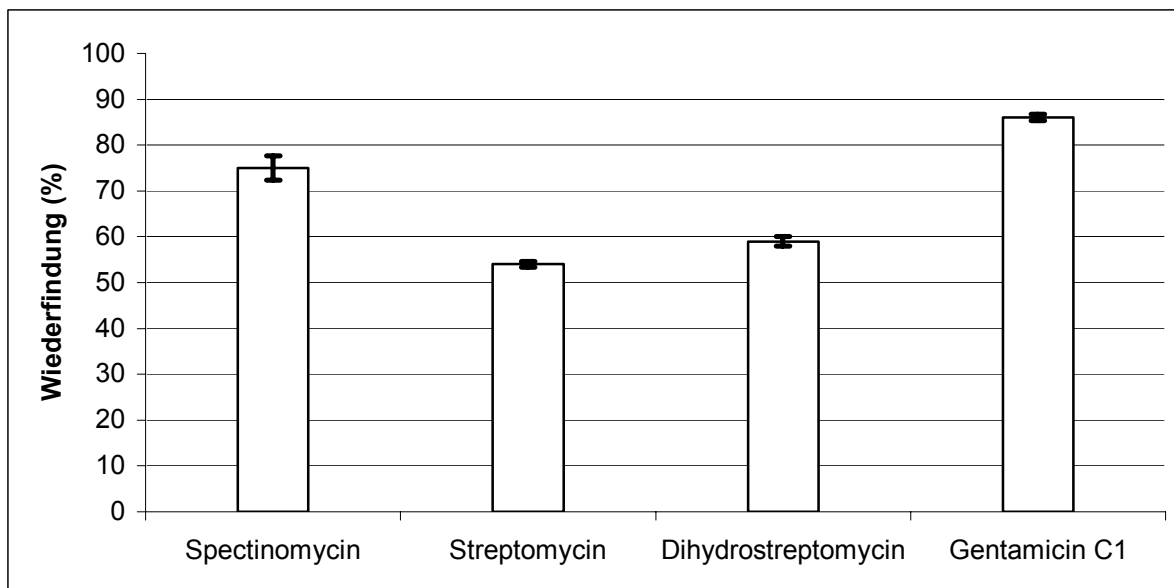


Abb. 66: Einfluss der Matrixkoextraktive auf die ESI von Spec, Str, Dhs und Gent C1 in Nierenblindextrakten

Alle untersuchten Blindnierenextrakte zeigten signifikante Signalsuppressionseffekte auf Seiten der ESI. Der berechnete Mittelwert betrug für Spec 75% mit einer Standardabweichung von $\pm 2,4\%$, für Str 54% mit einer Standardabweichung von $\pm 0,6\%$, für Dhs 59% mit einer Standardabweichung von $\pm 1,0\%$ und für Gent 86% mit einer Standardabweichung von $\pm 0,7\%$. Wie sich aus den Standardabweichungen erkennen lässt, schwanken die Matrixeffekte zwischen den verschiedenen Proben nicht stark.

Es war deshalb möglich, Matrixeffekt Faktoren zu berechnen. Diese Faktoren wurden bei den Wiederfindungsbestimmungen (siehe 2.4.6), die mittels externer Kalibriergeraden durchgeführt wurden, verwendet. Eine Zusammenfassung der Matrixeffekte ist in Tab. 26 dargestellt.

Tab. 26: Einfluss der Matrixkoextraktive auf die ESI der Aminoglycoside für die Matrix Rinderniere in Prozent (n=3, Nieren unterschiedlicher Herkunft).

Aminoglycosid	Matrixeffekt Rinderniere (%)	CV (%)
Spec	- 25	3,5
Str	- 46	1,1
Dhs	- 41	1,7
Gent C1	- 14	0,8

2.4.6 Wiederfindungen und Untersuchung der Verluststellen

Bei dem beschriebenen Verfahren zur Probenaufarbeitung lagen die Wiederfindungen aller Aminoglycoside in Rinderniere deutlich unter 100 %. Die in Tab. 27 dargestellten Wiederfindungen sind die Wiederfindungen des Gesamtverfahrens, welche unter Verwendung der Matrixeffekt Faktoren erhalten wurden. Alle Aminoglycoside wurden mit einer Konzentration von 1000 µg/kg dotiert

Tab. 27: Wiederfindungen für die in der Methode erfassten Aminoglycoside in Rinderniere mit einer dotierten Konzentration von 1000 µg/kg (über Matrixeffekt Faktoren korrigierte Werte)

Aminoglycosid	WDF (%) (n=4)	
	MW	CV (%)
Spec	67	4
Str	30	5
Dhs	37	6
Gent C1	4	29

Aus den hier durchgeführten Wiederfindungsversuchen wird die Problematik in Bezug auf die erreichbaren Wiederfindungen bei der Analytik der Aminoglycoside deutlich.

Die mit dieser Methode erzielten Wiederfindungen sind bis auf Spectinomycin sehr niedrig. Gentamicin erleidet bei der Aufarbeitung einen nahezu vollständigen Verlust. Prinzipiell sind jedoch die erzielten Präzisionen bis auf Gentamicin ausreichend hoch, weshalb eine Quantifizierung mit Wiederfindungsfaktoren für Spectinomycin sowie Strepto- und Dihydrostreptomycin möglich ist.

Aufgrund der sehr einfachen Probenaufarbeitung, die aus lediglich einem Ultrafiltrationsschritt besteht, können die Ursachen für eine unvollständige Wiederfindung entweder eine Bindung der Aminoglycoside an die Nierenproteine oder eine unspezifische Bindung an die Ultrafiltrationsmembran oder beides sein.

Um die unspezifische Bindung an die UF-Membran zu untersuchen, wurden wässrige Standardlösungen der Aminoglycoside (200 ng/ml) ultrafiltriert und die Gehalte im Filtrat gemessen. Es zeigte sich, dass die Verbindungen an die verwendete UF-Membran sehr stark gebunden werden. Spectinomycin bindet mit 24% am

geringsten, Strepto- und Dihydrostreptomycin sowie Gentamicin mit je 48% am stärksten unspezifisch.

Unter der Annahme, dass bei der Ultrafiltration mit Matrix durch diese keine signifikante Desaktivierung der Membran stattfindet, wurde die Verteilung der jeweiligen Aminoglycoside in freie, protein- und membrangebundene anteilig berechnet (s. Abb. 67).

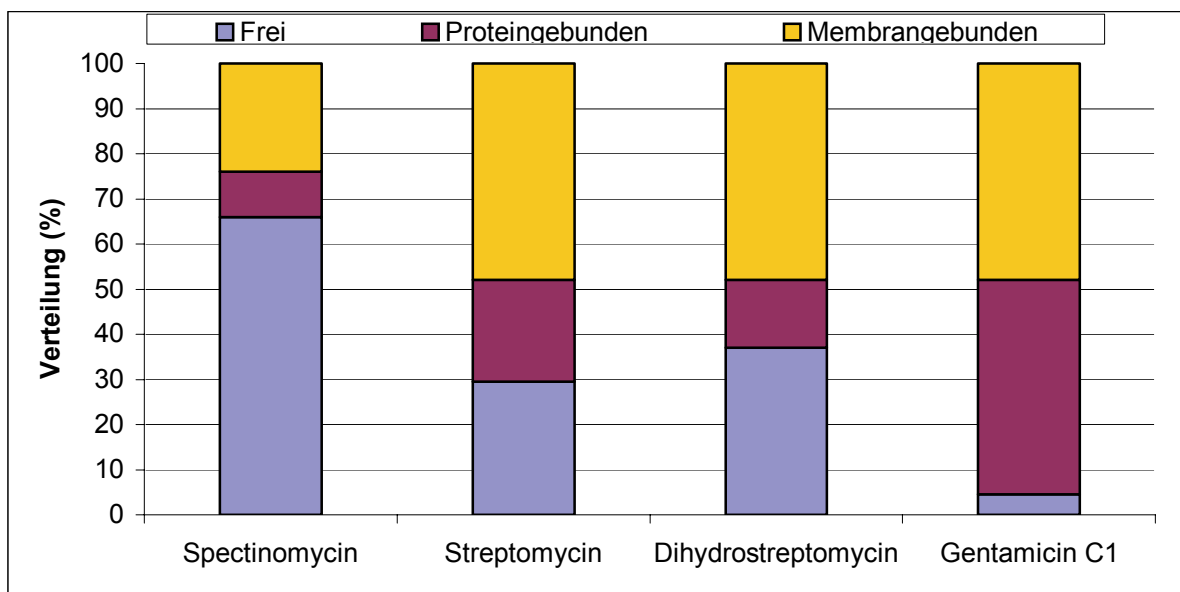


Abb. 67: Verteilung der jeweiligen Aminoglycoside in freie, proteingebundene und membrangebundene.

In Bezug auf die Proteinbindung lässt sich erkennen, dass diese von der Polarität der Aminoglycoside abhängt. Das weniger polare Spectinomycin bindet zu 10%, das polarere Streptomycin zu 23% und Dihydrostreptomycin zu 15%. Gentamicin, das polarste in dieser Methode erfasste Aminoglycosid, bindet am stärksten mit 48%.

2.5 Methodenvalidierung

Das Inverkehrbringen von tierischen Lebensmitteln, die PWS in Konzentrationen oberhalb des gesetzlich festgesetzten MRL enthalten, kann für den Inverkehrbringer zu erheblichen strafrechtlichen Konsequenzen führen.

Es ist deshalb von hoher Wichtigkeit, dass für die zuverlässige Ermittlung der Rückstandsgehalte geeignete Prüfmethode verwendet werden. Diese Eignung ist im Rahmen einer Methodenvalidierung zu verifizieren und zu dokumentieren.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war es deshalb, die entwickelte LC-MS/MS-Multimethode für 15 β -Lactame in Milch, Muskulatur und Niere von Rindern sowie die LC-MS/MS-Monomethode für Ceftiofurrückstände in Milch zu validieren. Eine vollständige Validierung der LC-MS/MS-Methode für Aminoglycoside wurde zum jetzigen Zeitpunkt, aufgrund der Problematik mit der unspezifischen Bindung an die Ultrafiltrationsmembran, noch nicht durchgeführt.

Für die Validierung sollten die EU-weit geltenden Anforderungen (s. 1.6) im Sinne der Kommissionsentscheidung 2002/657/EG umgesetzt werden. Entsprechend der Entscheidung kann die Validierung entweder nach dem konventionellen Validierungsansatz oder nach alternativen Validierungsmodellen erfolgen. In dieser Arbeit sollte die Validierung nach dem herkömmlichen Validierungsansatz durchgeführt werden.

Im folgenden wird das Vorgehen bei der Bestimmung aller relevanten Validierungsparameter (s. 2.5.1 – 2.5.5) beschrieben.

2.5.1 Wiederholbarkeit SD_R

Für die Bestimmung der Wiederholbarkeit wurden drei Serien bei verschiedenen Matrixbedingungen (unterschiedliche Tiere) mit jeweils vier Paralleluntersuchungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde für die drei relevanten Konzentrationsniveaus (0,5 x MRL, 1 x MRL, 1,5 MRL) ermittelt, indem analytfreies Probenmaterial zuvor entsprechend dotiert wurde. Die Substanzen Pen V, Cephalonium, Cefazolin und Cefoperazon, für die momentan kein MRL in den Geweben des Rindes festgesetzt ist, wurden mit 25, 50 und 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dotiert. Pen V für das ebenfalls kein MRL in Milch festgesetzt ist, wurde mit 2, 4 und 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dotiert. Innerhalb einer Serie wurden Wiederholbedingungen eingehalten, d.h. identisches Probenmaterial. Die Berechnung der Wiederholbarkeit erfolgte durch die Anwendung einfaktorieller Varianzanalyse unter Verwendung der

Messwerte aller drei Serien pro Konzentrationsniveau. Hinsichtlich der Anzahl an Paralleluntersuchungen ist zu bemerken, dass entsprechend der Kommissionsentscheidung mindestens sechs notwendig sind. Es war jedoch aus Durchführbarkeitsgründen nicht möglich, mehr als vier Paralleluntersuchungen je Konzentrationsniveau durchzuführen. Bezüglich der Paralleluntersuchungen gilt das Gleiche für die laborinterne Reproduzierbarkeit (s. 2.5.2).

2.5.2 Laborinterne Reproduzierbarkeit SD_{wIR}

Die Bestimmung der laborinternen Reproduzierbarkeit muss unter Reproduzierbarkeitsbedingungen erfolgen, d. h. die Serien sind mit unterschiedlichem Probenmaterial (verschiedene Tiere), wenn möglich mit unterschiedlichem Personal und an unterschiedlichen Tagen, durchzuführen.

Es wurden drei Serien mit jeweils vier Paralleluntersuchungen pro Konzentrationsniveau vorgenommen. Zwischen den Serien wurden die genannten Reproduzierbarkeitsbedingungen eingehalten. Es war jedoch nicht möglich, diese mit unterschiedlichem Personal durchzuführen. Die Berechnung der laborinternen Reproduzierbarkeit erfolgte durch die Anwendung einfaktorieller Varianzanalyse unter Verwendung der Messwerte aller drei Serien pro Konzentrationsniveau.

Die Entscheidung 2002/657/EG stellt exakte Anforderungen an die Präzision von quantitativen Methoden. Der Variationskoeffizient in Prozent CV (%) sollte bei Arbeiten unter Wiederholbedingungen typischerweise zwischen der Hälfte und zwei Dritteln des über der Horwitz-Gleichung berechneten Variationskoeffizienten liegen. Bei Analysen unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen darf der laborinterne Variationskoeffizient nicht größer als der Reproduzierbarkeits-CV (%) sein.

2.5.3 CC_{α} , CC_{β}

Die Bestimmung des CC_{α} sowie des CC_{β} erfolgte nach dem Kalibrierkurvenverfahren in Analogie zur ISO 11843. Es wurden dabei die erhaltenen Wiederfindungsgeraden aus den drei Serien mit den drei relevanten Konzentrationsniveaus (0,5 x MRL, 1 x MRL, 1,5 MRL) inklusive dem Nullniveau verwendet.

Bei Substanzen mit festgesetztem MRL entspricht der CC_{α} dem MRL-Wert zuzüglich der 1,64-fachen Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit. Der CC_{α} wurde aus jeder Wiederfindungsgeraden pro Serie berechnet und aus den Einzelwerten der Mittelwert gebildet.

Der CC_{β} entspricht sowohl bei Substanzen mit festgelegtem MRL sowie bei verbotenen Substanzen dem CC_{α} zuzüglich der 1,64-fachen Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit am CC_{α} . Im allgemeinen ist es nicht notwendig, den SD_{WIR} am CC_{α} zu bestimmen. Es ist ausreichend, den ermittelten SD_{WIR} am MRL zu verwenden. Die grafische Auswertung des CC_{α} und des CC_{β} nach dem Kalibrierkurvenverfahren ist in Abb. 68 u. 69 für Ampicillin in Milch beispielhaft dargestellt. Die abgebildete Wiederfindungsgerade (0 x MRL, 0,5 x MRL, 1 x MRL, 1,5 MRL) entstammt der Serie zwei bei der Validierung.

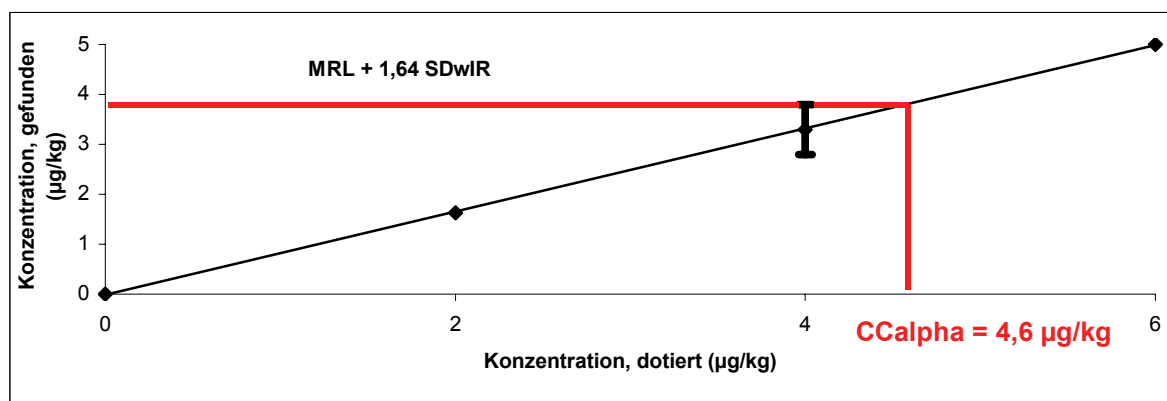


Abb. 68: Ermittlung des CC_{α} am Beispiel von Ampicillin in Milch. Die verwendete Kalibrierfunktion entspricht der Wiederfindungsgeraden der zweiten Validierungs-Serie. Der MRL von Ampicillin ist in Milch $4 \mu\text{g/kg}$.

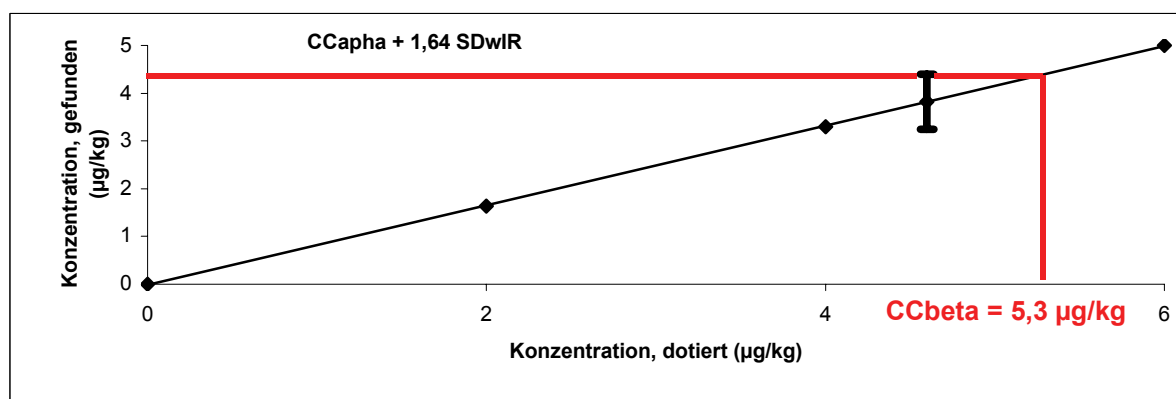


Abb. 69: Ermittlung des CC_{β} am Beispiel von Ampicillin in Milch. Die verwendete Kalibrierfunktion entspricht der Wiederfindungsgeraden der zweiten Validierungs-Serie.

2.5.4 Richtigkeit

Da in der Regel keine zertifizierten Referenzmaterialien zur Verfügung stehen, wird

Tab. 28: Mindestwerte der Richtigkeit von quantitativen Methoden

Massenanteil	Bereich
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	- 50 % bis + 20 %
$> 1 \mu\text{g/kg}$ bis $10 \mu\text{g/kg}$	- 30 % bis + 10 %
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$	- 20 % bis + 10 %

die Richtigkeit bei quantitativen Bestätigungsverfahren aus den bei der Validierung berechneten Wiederfindungen abgeleitet. Die wiederfindungskorrigierten Daten sind nur dann akzeptabel, wenn

sie innerhalb der Bereiche in Tab. 28 liegen.

Die Validierung der β -Lactam-Multimethode fand in dieser Arbeit unter Verwendung von extern erstellten Standard-Kalibriergeraden statt. Da bei der Methoden-etablierung sowohl signifikante Substanzverluste (t-Test 95%) sowie signifikante Matrixeffekte (t-Test 95%) beobachtet werden konnten, war es für die Berechnung der Gehalte und der Richtigkeit (s. 3.1.7) zwingend notwendig, diese zu korrigieren. Dabei basierte die Ermittlung der Wiederfindungsfaktoren auf den typischen Wiederfindungen des Gesamtverfahrens (s. 2.2.9). Auf Basis der Matrixeffektuntersuchungen wurden die Matrixfaktoren ermittelt (s. 2.2.7).

Für die Validierung der LC-MS/MS-Methode für Ceftiofurrückstände in Milch war die Verwendung von Korrekturfaktoren aufgrund der ausreichend hohen Wiederfindung (> 80 %) und dem Fehlen von Matrixeffekten auf Seiten der ESI nicht nötig.

2.5.5 Quantifizierung und massenspektrometrische Bestätigung

Damit eine Quantifizierung der Substanzen und gleichzeitig eine massenspektrometrische Bestätigung dieser unter Einhaltung des Identifizierungspunktekonzeptes (s. 1.6) durchgeführt werden konnte, wurden Quantifier-Kalibriergeraden über die Peakfläche des Quantifier-Ions sowie Qualifier-Kalibriergeraden über die Peakfläche des Qualifier-Ions für alle relevanten Verbindungen erstellt.

Durch diese Vorgehensweise ist es möglich, eine Quantifizierung über die Quantifier-Kalibriergerade sowie eine massenspektrometrische Bestätigung über die Qualifier-Kalibriergerade durch den Vergleich der relativen Peakflächen (relative Intensitäten

der Ionen) durchzuführen. Insgesamt werden somit 4 Identifizierungspunkte erreicht (s. 2.2.3).

Eine typische Quantifier- und Qualifier-Kalibriergerade, die bei der Methodvalidierung von Amoxicillin in Milch verwendet wurde, ist in Abb. 70 beispielhaft dargestellt.

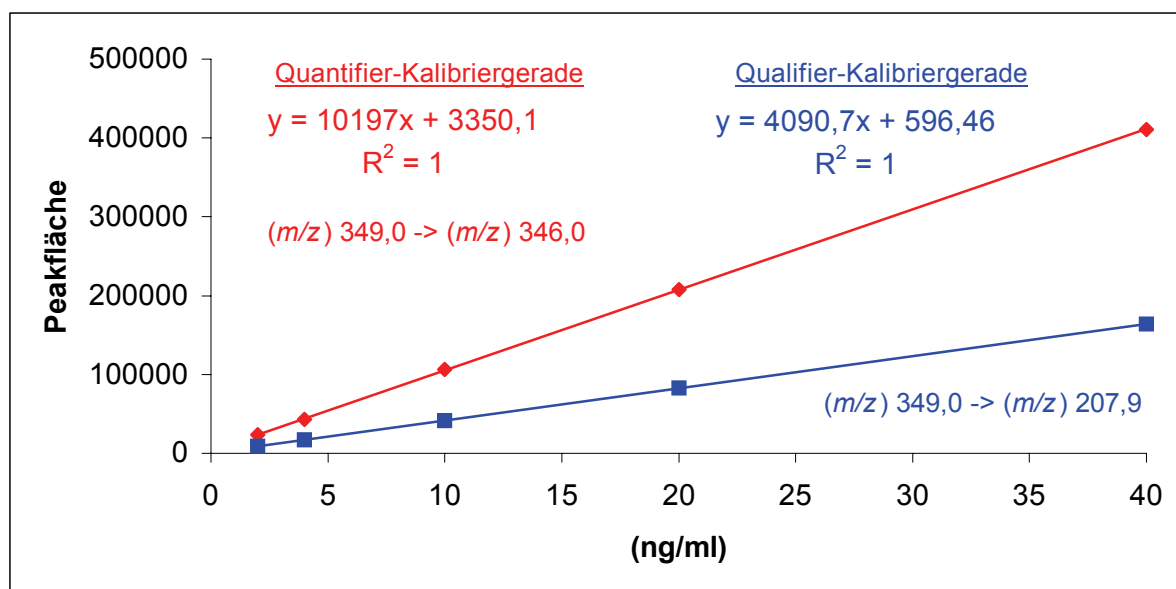


Abb. 70: Quantifier- Qualifierkalibriergerade, welche für die Quantifizierung von Amoxicillin in Milch verwendet wurde. Fünf Konzentrationen: 2, 4, 5, 10, 20, 40 ng/ml

Bei der LC-MS/MS-Methodenvalidierung ist zu beachten, dass die relativen Ionenintensitäten des Quantifier-Ions, welches das Basision mit 100 % Intensität darstellt, zum Qualifier-Ion nur in bestimmten Grenzen schwanken darf (s. Tab. 29).

Tab. 29: Zulässige Höchsttoleranzen für relative Ionenintensitäten (LC-MS/MS)

Relative Intensität (% des Basispeaks)	Relative Schwankungen (%)
> 50	± 20
> 20 - 50	± 25
> 10 - 20	± 30
≤ 10	± 50

In den Tab. 30 - 33 sind die bei der Validierung erhaltenen Richtig-

keiten und Präzisionen für die entwickelte LC-MS/MS-Multimethode für 15 β -Lactame sowie der LC-MS/MS-Monomethode für Ceftiofurrückstände in Milch, aufgeführt.

Tab. 30: LC-MS/MS-Multimethode für 15 β -Lactame. Validierungsdaten für Rindermilch (n = 4 für jedes Konzentrationsniveau bei jeder der drei Serien; bei jeder Serie wurde eine unterschiedliche Milchmatrix verwendet)

β -Lactam	Konzentration dotiert ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Richtigkeit (%)		CV _r (%) (max. 2/3 CV Horwitz (%))		CV _{wiR} (%) (max. CV Horwitz (%))		CC α	CC β	Matrix-Faktor	Wiederfindungs-Faktor						
	2	4	6	89,6	94,0	87,9	4,5	7,2					5,1	19,1	10,8	13,2		
Amoxicillin	2	4	6	89,6	94,0	87,9	(27,2)	(24,5)	(23,1)	(40,8)	(36,7)	(34,6)	-	5,6	4,7	5,6	-	1,75
Ampicillin	2	4	6	107,0	102,1	97,9	(27,2)	(24,5)	(23,1)	(40,8)	(36,7)	(34,6)	1,11	5,4	4,6	5,4	1,11	1,23
Cephalexin	50	100	150	83,0	81,9	79,1	(16,7)	(15,1)	(14,2)	(25,1)	(22,6)	(21,3)	1,09	124,3	113,8	124,3	1,09	1,20
Desacetyl-cephapirin	30	60	90	94,4	103,9	101,7	(18,1)	(16,3)	(15,3)	(27,1)	(24,4)	(23,0)	1,12	69,9	64,8	69,9	1,12	1,20
Cephapirin	30	60	90	100,6	99,3	98,3	(18,1)	(16,3)	(15,3)	(27,1)	(24,4)	(23,0)	1,03	80,5	69,5	80,5	1,03	-
Cephalonium	10	20	30	91,8	86,6	83,4	(21,3)	(19,2)	(18,1)	(32,0)	(28,8)	(27,1)	0,74	25,4	22,5	25,4	0,74	1,05
Cefquinome	10	20	30	92,2	84,4	84,1	(21,3)	(19,2)	(18,1)	(32,0)	(28,8)	(27,1)	0,78	31,4	25,1	31,4	0,78	1,08
Cefazolin	25	50	75	98,2	91,4	92,9	(18,6)	(16,7)	(15,7)	(27,9)	(25,1)	(23,6)	0,84	65,2	57,1	65,2	0,84	1,18
Cefoperazon	25	50	75	93,2	84,8	77,0	(18,6)	(16,7)	(15,7)	(27,9)	(25,1)	(23,6)	-	84,1	65,0	84,1	-	-
Penicillin G	2	4	6	96,7	90,2	86,6	(27,2)	(24,5)	(23,1)	(40,8)	(36,7)	(34,6)	0,84	5,4	4,7	5,4	0,84	-
Penicillin V	2	4	6	116,1	99,9	89,1	(27,2)	(24,5)	(23,1)	(40,8)	(36,7)	(34,6)	0,80	Keine MRL Substanz	Keine MRL Substanz	Keine MRL Substanz	0,80	-
Oxacillin	15	30	45	93,2	84,4	79,0	(20,1)	(18,1)	(17,0)	(30,1)	(27,1)	(25,5)	0,77	34,9	32,4	34,9	0,77	0,87
Cloxacillin	15	30	45	101,8	88,9	81,0	(20,1)	(18,1)	(17,0)	(30,1)	(27,1)	(25,5)	0,80	35,1	32,3	35,1	0,80	0,88
Dicloxacillin	15	30	45	96,2	83,2	75,5	(20,1)	(18,1)	(17,0)	(30,1)	(27,1)	(25,5)	0,76	38,9	34,2	38,9	0,76	0,89
Nafcillin	15	30	45	99,1	84,8	77,6	(20,1)	(18,1)	(17,0)	(30,1)	(27,1)	(25,5)	0,81	38,1	33,8	38,1	0,81	0,88

Tab. 31: LC-MS/MS-Multimethode für 15 β -Lactame. Validierungsdaten für Rindermuskel (n = 4 für jedes Konzentrationsniveau bei jeder der drei Serien; bei jeder Serie wurde ein Rindermuskel von einem anderen Tier verwendet: Serie 1 = Kalb1, Serie 2 = Kalb 2, Serie 3 = Färsen)

β -Lactam	Konzentration dotiert ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Richtigkeit (%)		CV_r (%) (max. 2/3 CV Horwitz (%))		CV_{wIR} (%) (max. CV Horwitz (%))		$\text{CC}\alpha$	$\text{CC}\beta$	Matrix-Faktor	Wiederfindungs-Faktor				
Amoxicillin	25	50	75	82,6	82,5	80,8	5,1 (18,6)	4,5 (16,7)	4,3 (15,7)	8,5 (27,9)	4,5 (25,1)	11,7 (23,6)	53,7	57,7	-	1,54
Ampicillin	25	50	75	96,4	93,5	91,0	2,3 (18,6)	3,1 (16,7)	2,4 (15,7)	6,1 (27,9)	7,1 (25,1)	2,5 (23,6)	55,8	62,5	1,06	1,14
Cephalexin	100	200	300	85,2	84,0	82,9	4,1 (15,1)	4,3 (13,6)	3,2 (12,8)	8,1 (22,6)	10,1 (20,4)	3,2 (19,2)	233,4	272,2	1,05	1,23
Quantitative Umsetzung zu Desacetyl-Cephapirin																
Desacetyl-Cephapirin	25	50	75	95,9	101,6	103,9	5,0 (18,6)	4,0 (16,7)	3,9 (15,7)	12,1 (28,3)	9,7 (25,5)	3,9 (24,0)	57,8	66,4	1,10	1,22
Cephalonium	25	50	75	96,8	88,8	83,9	1,8 (18,6)	3,2 (16,7)	4,6 (15,7)	7,6 (27,9)	4,7 (25,1)	5,5 (23,6)	Keine MRL Substanz		0,78	-
Cefquinome	25	50	75	97,8	90,9	85,3	2,0 (18,6)	3,0 (16,7)	3,4 (15,7)	2,6 (27,9)	3,0 (25,1)	6,1 (23,6)	52,6	55,2	0,87	-
Cefazolin	25	50	75	90,3	85,9	81,3	4,4 (18,6)	3,2 (16,7)	2,7 (15,7)	16,5 (27,9)	8,1 (25,1)	6,7 (23,6)	Keine MRL Substanz		0,84	-
Cefoperazon	25	50	75	105,1	99,6	91,3	8,7 (18,6)	6,5 (16,7)	6,9 (15,7)	27,7 (27,9)	15,3 (25,1)	15,3 (23,6)	Keine MRL substance		-	-
Penicillin G	25	50	75	102,3	99,1	94,5	2,3 (18,6)	3,6 (16,7)	2,7 (15,7)	14,9 (27,9)	8,3 (25,1)	3,8 (23,6)	57,0	64,9	0,91	-
Penicillin V	25	50	75	94,1	88,1	84,4	1,9 (18,6)	2,7 (16,7)	5,1 (15,7)	8,8 (27,9)	4,0 (25,1)	6,2 (23,6)	Keine MRL Substanz		0,86	-
Oxacillin	150	300	450	110,9	106,2	97,5	3,5 (14,2)	2,5 (12,8)	3,1 (12,0)	11,1 (21,3)	6,3 (19,2)	9,2 (18,0)	322,2	367,6	-	-
Cloxacillin	150	300	450	96,3	96,4	94,4	3,9 (14,2)	4,4 (12,8)	3,5 (12,0)	15,4 (21,3)	8,3 (19,2)	10,9 (18,0)	341,1	389,9	-	-
Dicloxacillin	150	300	450	90,0	88,1	81,1	8,9 (14,2)	6,1 (12,8)	3,2 (12,0)	16,9 (21,3)	6,1 (19,2)	10,8 (18,0)	331,1	365,2	-	-
Nafcillin	150	300	450	91,0	86,8	86,7	4,3 (14,2)	8,9 (12,8)	6,9 (12,0)	14,6 (21,3)	10,0 (19,2)	9,7 (18,0)	349,7	407,5	1,14	-

Tab. 32: LC-MS/MS-Multimethode für 15 β -Lactame. Validierungsdaten für Rinderniere (n = 4 für jedes Konzentrationsniveau bei jeder der drei Serien; bei jeder Serie wurde eine Rinderniere von einem anderen Tier verwendet: Serie 1 = Kalb1, Serie 2 = Kalb 2, Serie 3 = Färsen)

β -Lactam	Konzentration dotiert ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Richtigkeit (%)		CV_r (%) (max. 2/3 CV Horwitz (%))	CV_{wIR} (%) (max. CV Horwitz (%))	CC α	CC β	Matrix-Faktor	Wiederfindungs-Faktor			
	25	75	82,0	89,4							83,5		
Amoxicillin	25	75	82,0	89,4	8,8 (16,7)	10,2 (18,6)	7,1 (15,7)	15,4 (27,9)	10,5 (23,6)	69,3	1,26	2,19	
Ampicillin	25	75	91,2	85,4	4,5 (16,7)	9,5 (18,6)	4,3 (15,7)	14,8 (27,9)	14,3 (23,6)	65,6	1,23	1,28	
Cephalexin	500	1500	96,0	98,0	4,7 (10,7)	7,2 (11,9)	3,5 (10,1)	11,1 (17,8)	5,3 (15,1)	1167,8	1,12	1,33	
Quantitative Umsetzung zu Desacetyl-Cephapirin													
Desacetyl-Cephapirin	50	150	100,2	100,7	4,3 (16,7)	4,3 (16,7)	5,7 (15,1)	6,5 (25,1)	7,3 (22,6)	112,1	126,6	1,20	1,15
Cephalonium	25	75	90,9	88,5	8,0 (16,7)	12,9 (18,6)	12,0 (15,7)	22,9 (27,9)	33,6 (23,6)	Keine MRL Substanz	0,78	1,14	
Cefquinome	100	300	106,1	106,0	10,5 (15,0)	6,8 (15,0)	8,7 (12,8)	10,8 (22,6)	17,2 (19,2)	264,8	350,2	0,78	1,17
Cefazolin	25	75	96,0	88,1	6,7 (18,6)	6,4 (18,6)	3,9 (15,7)	10,2 (27,9)	10,3 (23,6)	Keine MRL Substanz	0,92	1,15	
Cefoperazon	25	75	106,7	91,8	12,3 (16,7)	11,4 (18,6)	13,0 (15,7)	27,9 (27,9)	29,4 (23,6)	Keine MRL Substanz	1,50	1,18	
Penicillin G	25	75	110,4	105,1	4,7 (18,6)	6,7 (18,6)	5,2 (15,7)	12,5 (27,9)	12,4 (23,6)	54,6	59,6	1,13	1,18
Penicillin V	25	75	98,6	85,6	5,4 (16,7)	9,4 (18,6)	5,6 (15,7)	14,3 (27,9)	18,3 (23,6)	Keine MRL Substanz	1,15	1,34	
Oxacillin	150	300	96,1	88,2	5,9 (14,2)	9,1 (14,2)	6,7 (12,0)	16,1 (21,3)	18,0 (18,0)	345,8	398,0	-	1,13
Cloxacillin	150	300	85,8	78,0	5,0 (14,2)	9,0 (14,2)	6,9 (12,0)	17,8 (21,3)	15,5 (18,0)	328,2	358,8	-	1,11
Dicloxacillin	150	300	98,5	89,7	5,0 (14,2)	11,8 (14,2)	6,9 (12,0)	32,4 (21,3)	13,6 (18,0)	358,7	428,1	1,25	1,31
Nafcillin	150	300	94,5	85,4	6,2 (14,2)	7,8 (14,2)	6,4 (12,0)	22,8 (21,3)	13,4 (18,0)	357,1	424,5	-	1,16

Tab. 33: LC-MS/MS-Monomethode für Cefitiofur. Validierungsdaten für Rindermilch (n = 4 für jedes Konzentrationsniveau bei jeder der drei Serien; bei jeder Serie wurde eine unterschiedliche Milchmatrix verwendet)

β-Lactam	Konzentration Dotiert (µg/kg)		Richtigkeit (%)	CV _r (%) (max. 2/3 CV Horwitz (%))			CV _{wIR} (%) (max. CV Horwitz (%))		CCα	CCβ	Matrix-Faktor	Wiederfindungs-Faktor				
	50	100		200 (*)	3,7 (16,7)	3,2 (15,1)	3,0 (13,6)	3,7 (25,1)					3,4 (22,6)	3,9 (20,4)		
Cefitiofur	50	100	200 (*)	86,9	91,0	95,1	3,7 (16,7)	3,2 (15,1)	3,0 (13,6)	3,7 (25,1)	3,4 (22,6)	3,9 (20,4)	106,7	116,8	-	-

(*) das höchste Dotierungsniveau bei der Validierung von Cefitiofur entsprach dem doppelten MRL.

In Abb. 71 sind die bei der Validierung von Cefitiofur ermittelten Wiederfindungsfunktionen der einzelnen Serien (1 – 3) zur Veranschaulichung der Linearität dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der einfachen Standardabweichung.

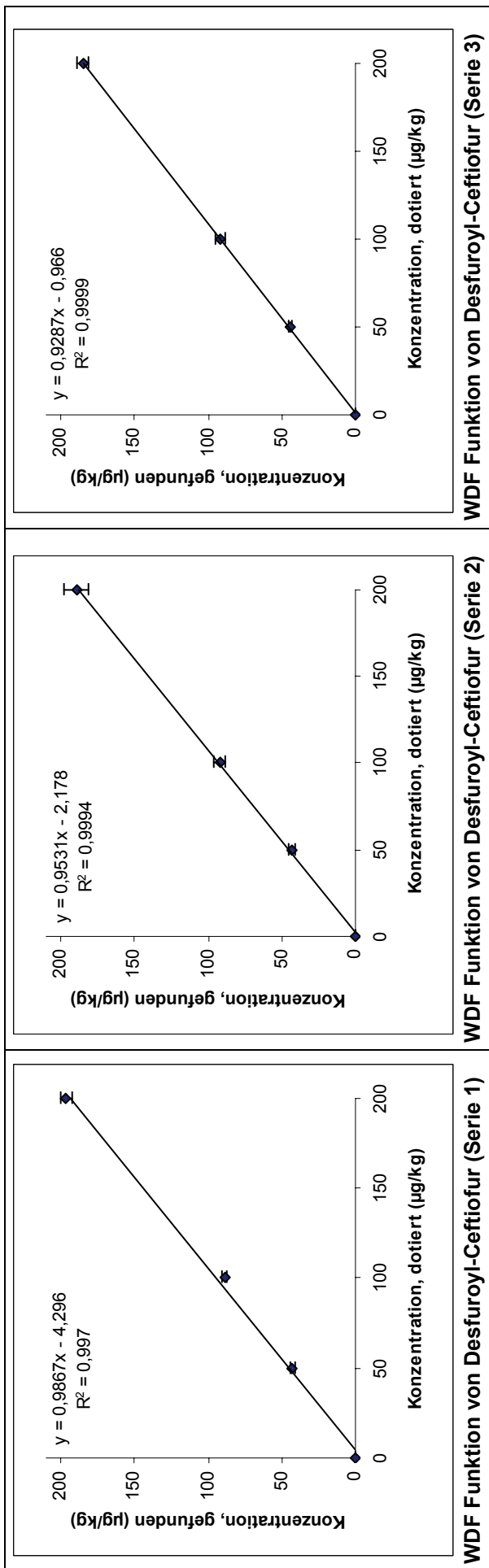


Abb. 71: Wiederfindungsgeraden von Desferoyl-Cefitiofur für die einzelnen Serien (n=4 je Konzentrationsniveau).

Bei der Validierung der LC-MS/MS-Multimethode für 15 β -Lactame lagen die ermittelten Richtigkeiten, unter Verwendung der Matrixfaktoren und der Wiederfindungsfaktoren, zwischen 76 – 116 % für Milch, 81 – 111 % für Muskel und 71 % - 110 % für Niere.

Allerdings fällt bei genauer Betrachtung der erhaltenen Richtigkeiten auf, dass die Mindestwerte der Richtigkeit (70 – 110% für Gehalte > 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bis 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 80 – 110% für Gehalte \geq 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) am besten für das niedrigste Dotierungsniveau erzielt werden.

Insbesondere bei der Validierung der monobasischen Penicilline sowie Cefoperazon in Milch und Rinderniere lagen die Richtigkeiten beim höchsten Dotierungsniveau (1,5 facher MRL) teilweise um ca. 20% niedriger als beim niedrigsten Dotierungsniveau (0,5 facher MRL). Unter Punkt 2.5.6 wurden weitergehende Untersuchungen für die Matrix Rinderniere durchgeführt, um die Ursache für diese Nichtlinearität zu identifizieren.

Die erhaltenen Präzisionen, ausgedrückt als Variationskoeffizienten der laborinternen Reproduzierbarkeit CV_{WIR} (%), entsprachen, mit Ausnahme von Cefoperazon und Cephalonium für das höchste Dotierungsniveau sowie Dicloxacillin und Nafcillin für das niedrigste Konzentrationsniveau in Rinderniere, den Anforderungen der Kommissionsentscheidung (s. 2.5.2).

Bei der Validierung der LC-MS/MS-Monomethode für Ceftiofur lagen die ermittelten Richtigkeiten zwischen 87 und 95%. Die Variationskoeffizienten der laborinternen Reproduzierbarkeit CV_{WIR} (%) mit 3,7% beim 0,5 fachen MRL, mit 3,4% beim MRL und mit 3,9% beim doppelten MRL, unterschritten die maximal zulässigen Werte deutlich, was die sehr hohe Präzision dieser Methode verdeutlicht.

Die zulässigen Höchsttoleranzen für die relativen Ionenintensitäten wurden in allen Fällen bei der Validierung eingehalten. Ebenso lagen die gemessenen Retentionszeiten der Substanzen in Matrix innerhalb der zulässigen Schwankungsbreite von $\pm 2,5$ %.

2.5.6 Stabilität des LC-MS/MS-Systems (Linearität)

Bei genauer Betrachtung der in den Tab. 30 - 32 dargestellten Validierungsdaten kann man erkennen, dass insbesondere für die Matrix Rinderniere die Richtigkeit bei der höchsten Dotierungskonzentration, für einige β -Lactame, deutlich niedriger ist als bei der niedrigsten Dotierungskonzentration. Von diesem Phänomen sind die monobasischen Penicilline sowie Cefoperazon am stärksten betroffen.

Im folgenden werden die möglichen Ursachen am Beispiel von Pen G näher diskutiert. In Abb. 72 sind für Pen G zwei bei der Methodvalidierung erhaltene Wiederfindungsgeraden grafisch dargestellt. Aus diesen lässt sich erkennen, dass die Wiederfindungsgerade für die Serie 1 (dotierte Rinderniere 1) linear ist, jedoch nicht für die Serie 2 (dotierte Kalbsniere 1).

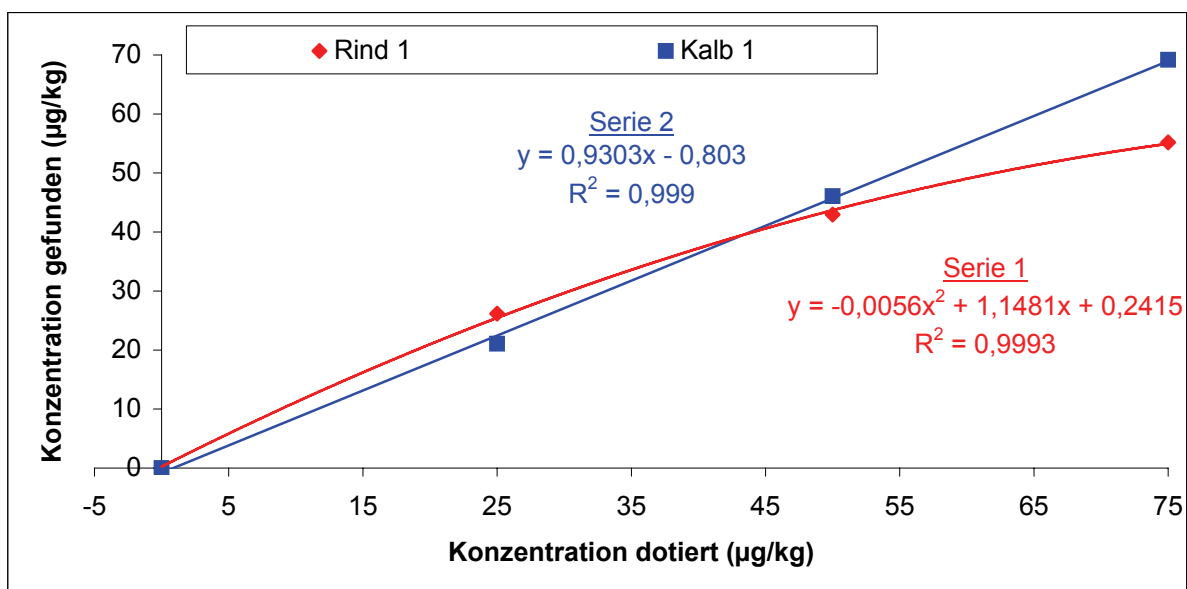


Abb. 72: Wiederfindungsgerade von Pen G für die Serie 1 (Rinderniere 1) und die Serie 2 (Kalbsniere 1)

Insgesamt sind vier Ursachen für das nichtlineare Verhalten theoretisch denkbar. Ein Stabilitätsproblem des LC-MS/MS-Systems (Ursache 1) kann jedoch ausgeschlossen werden, da die Peakflächen der externen Standards bei der Validierung vor und nach einer gemessenen Probenserie identisch waren.

Ferner ist ein Abbau der Substanzen in den Probenextrakten (Ursache 2) sowie eine niedrigere Extraktionseffizienz bei höheren Dotierungskonzentrationen (Ursache 3) unwahrscheinlich, da die Wiederfindungsgerade von Pen G für die Serie 2 einen linearen Verlauf zeigte.

Am wahrscheinlichsten sind Signalunterdrückungen (Ursache 4) für das Linearitätsproblem verantwortlich, die mit der Anzahl der durchgeführten Probeninjektionen zusammenhängen.

Ähnliche Beobachtungen wurden von Lagerwerf et al. für die Bestimmung von Acyloguanosin in menschlichem Plasma beschrieben [184]. In dieser Publikation konnte nach der Injektion von ca. 9 Plasmaproben ein plötzlicher Abfall der Messempfindlichkeit beobachtet werden. Als Erklärung für den plötzlichen Sensitivitätsverlust wurde die Anreicherung von niedermolekularen Matrixkoextraktiven auf der HPLC-Säule mit steigender Probeninjektionszahl vorgeschlagen. Nach der Sättigung der HPLC-Säule kommt es letztlich zu einem kontinuierlichen „Bluten“ dieser Matrixkoextraktive von der HPLC-Säule, mit den Folgen einer Signalunterdrückung auf Seiten der ESI.

Um zu prüfen, ob die von Lagerwerf et al. gemachten Beobachtungen auch als Erklärung für die hier gemachten Sensitivitätsverluste herangezogen werden können, wurden sechs monobasische Penicilline als Modellsubstanzen (Pen V, Pen G, Oxa, Clox, Diclox, Naf) zu einem fertigen Blindnierenextrakt von Kalb 1, mit einer Konzentration von 50 µg/kg, zudotiert.

Dieser Extrakt wurde insgesamt 14 mal injiziert (Dauer von 12 Stunden) und für jede Injektion die Peakfläche gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 73 für Nafcillin beispielhaft dargestellt.

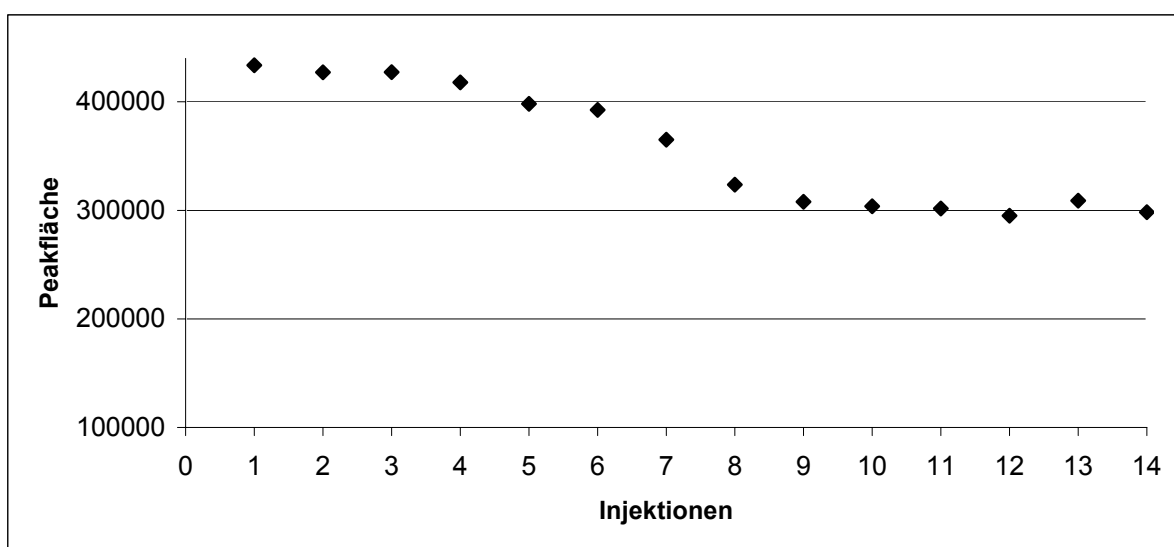


Abb. 73: Ermittelte Peakflächen von Nafcillin in Abhängigkeit der Anzahl der Injektionen (Kalbsniere 1)

Am Verlauf der Peakflächen kann man erkennen, dass eine nahezu konstante Sensitivität des LC-MS/MS-Systems nur für die ersten fünf Injektionen gewährleistet war. Zwischen der sechsten und neunten Injektion nahm die Sensitivität nahezu linear ab. Im Anschluss daran war, zwischen der neunten und 14. Injektion, die Sensitivität erneut konstant.

Insgesamt verringerte sich die Sensitivität für Nafcillin zwischen der ersten und der letzten Injektion um 31 %. Alle anderen untersuchten monobasischen Penicilline zeigten einen nahezu identischen Sensitivitätsverlust (Pen G 35%, Pen V 34%, Oxa 33%, Clox 26%, Diclox 35%). Aufgrund der Tatsache, dass sowohl die stabilen als auch das instabile Pen G einen identischen Sensitivitätsverlust zeigen, kann ein Abbau als Grund für den Sensitivitätsverlust sicher ausgeschlossen werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die von Lagerwerf et al. geschilderten Probleme bezüglich eines Sensitivitätsverlustes, die mit der Anzahl der Probeninjektionen zusammenhängen, auch in dieser Dissertation bei der Validierung der β -Lactam Multimethode beobachtet wurde.

Für die analytische Praxis hat dies Folgen. Letztlich sollten in einer Sequenz nicht mehr als fünf Proben gemessen werden, um Quantifizierungsfehler ausschließen zu können. Ferner sollten zusätzlich zwischen den Proben Kontrollproben gemessen werden, mit denen auftretende Signalunterdrückungen identifiziert werden können.

2.5.7 Stabilität der β -Lactame in Lösung

Die Quantifizierung von pharmakologisch wirksamen Verbindungen findet über Kalibriergeraden der entsprechenden Standardsubstanzen statt. Hierzu werden die zuvor hergestellten Stammlösungen verdünnt und gemessen. Aus Gründen der Praktikabilität werden diese unter geeigneten Bedingungen gelagert und erst bei Bedarf verwendet. Während der Zeit des Lagerns ist jedoch sicherzustellen, dass die Substanzen in Lösung stabil sind und kein Abbau stattfindet.

Ein Abbau würde zwangsläufig zu falschen Ergebnissen führen. Bei der Methodvalidierung ist es deshalb wichtig, die Lagerstabilität der hergestellten Stammlösungen zu prüfen. Um die Haltbarkeit der wässrigen β -Lactam-Stammlösungen zu überprüfen, wurden drei Serien von diesen untersucht:

- Serie 1: Wässrige Lösungen der β -Lactame mit der Konzentration 1 mg/ml (Cephalonium gelöst in Wasser/Acetonitril (1:1, v/v)). Diese Lösungen wurden an dem Tag, an welchem der Stabilitätstest stattfand, frisch hergestellt;

Tab. 34: Erhaltene Stabilitätsdaten aus den Lagerversuchen

β-Lactam	Serie 1	Serie 2	Serie 3
	(%)	(%)	(%)
Amoxicillin	100	92	94
Ampicillin	100	23	18
Cephalexin	100	96	99
Cephapirin	100	98	97
Cephalonium	100	112	108
Cefquinome	100	112	112
Cefazolin	100	100	93
Cefoperazon	100	110	108
Pen G	100	100	101
Pen V	100	104	102
Oxacillin	100	99	102
Cloxacillin	100	95	98
Dicloxacillin	100	97	100
Nafcillin	100	98	98
Ceftiofur	100	-	108

- Serie 2: Wässrige Lösungen der β -Lactame mit der Konzentration 1 mg/ml. Diese Lösungen wurden fünf Monate bei -24°C gelagert;
- Serie 3: Wässrige Lösungen der β -Lactame mit der Konzentration 1 mg/ml. Diese Lösungen wurden fünf Monate bei -24°C gelagert und ca. 12 mal aufgetaut, um aus ihnen Verdünnungen herzustellen.

Die erhaltenen Stabilitätswerte (s. Tab. 34) ließen bei allen β -Lactamen, bis auf das Ampicillin, keinen nennenswerten Abbau während des Lagerns bei -24°C erkennen. Auch das 12-fache Auftauen und Wiedereingefrieren zum Herstellen von Verdünnungen hatte keinen Einfluss auf die Stabilität. Um eine Erklärung für die schlechte Lagerstabilität von Ampicillin zu erhalten, wurden weitergehende, unter Punkt. 2.5.7.1 beschriebene, Untersuchungen durchgeführt.

2.5.7.1 Dimerisierung von Ampicillin in wässriger Lösung

Um eine Erklärung für diese schlechte Lagerstabilität zu erhalten, wurden die ESI-Massenspektren einer frisch hergestellten Ampicillin-Stammlösung mit einer bereits 5 Monate bei -24°C gelagerten Stammlösung verglichen. Hierzu wurden die beiden Lösungen ($10\ \mu\text{g/ml}$) mittels einer Spritzenpumpe zum LC-Fluß zugegeben und die Massenspektren über einen Massenbereich von 100 bis 1000 m/z im positiven Elektrospraymodus aufgenommen. Durch den Vergleich der beiden Massenspektren sollte es möglich sein, eventuell entstandene Abbauprodukte erkennen zu können. Die beiden Massenspektren sind in den Abb. 74 u. 75 dargestellt.

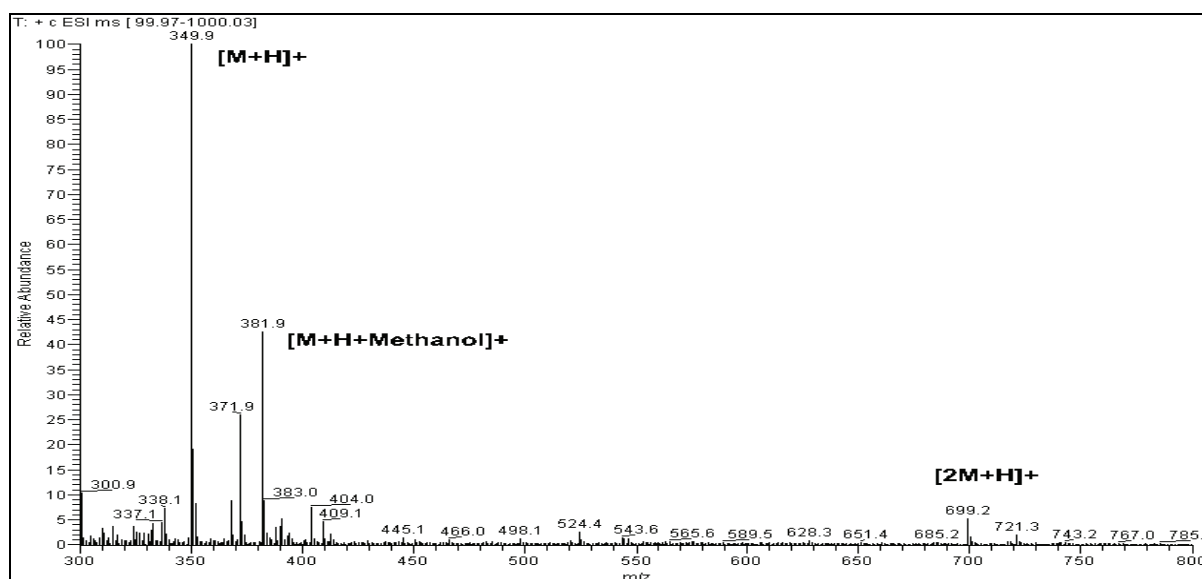


Abb. 74: Massenspektrum einer frisch hergestellten wässrigen Ampicillin Lösung (1 mg/ml, freie Säure)

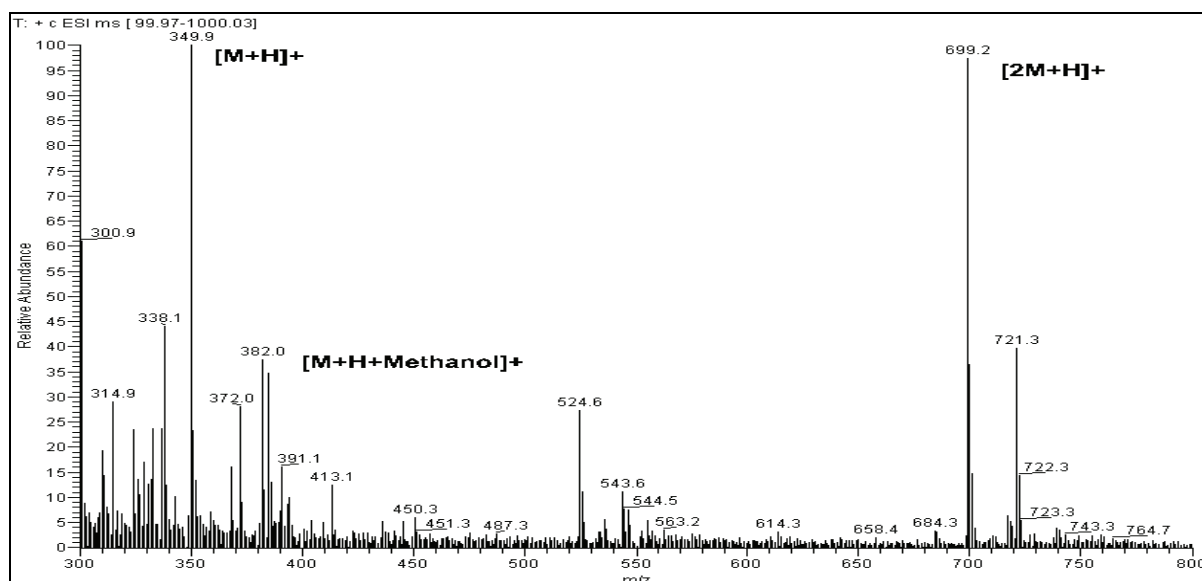


Abb. 75: Massenspektrum einer über 5 Monate, bei -24°C , gelagerten wässrigen Ampicillin Lösung (1 mg/ml, freie Säure)

Aus dem Massenspektrum der gelagerten Ampicillin-Stammlösung im Vergleich zur frisch hergestellten Lösung lässt sich erkennen, dass zwei intensive Peaks mit den Massen 699.2 und 721.3 auftreten. Diese Peaks entsprechen hinsichtlich der Massen dem Ampicillin-Dimer $[2M+H]^+$ sowie dem Ampicillin-Dimer-Natriumaddukt.

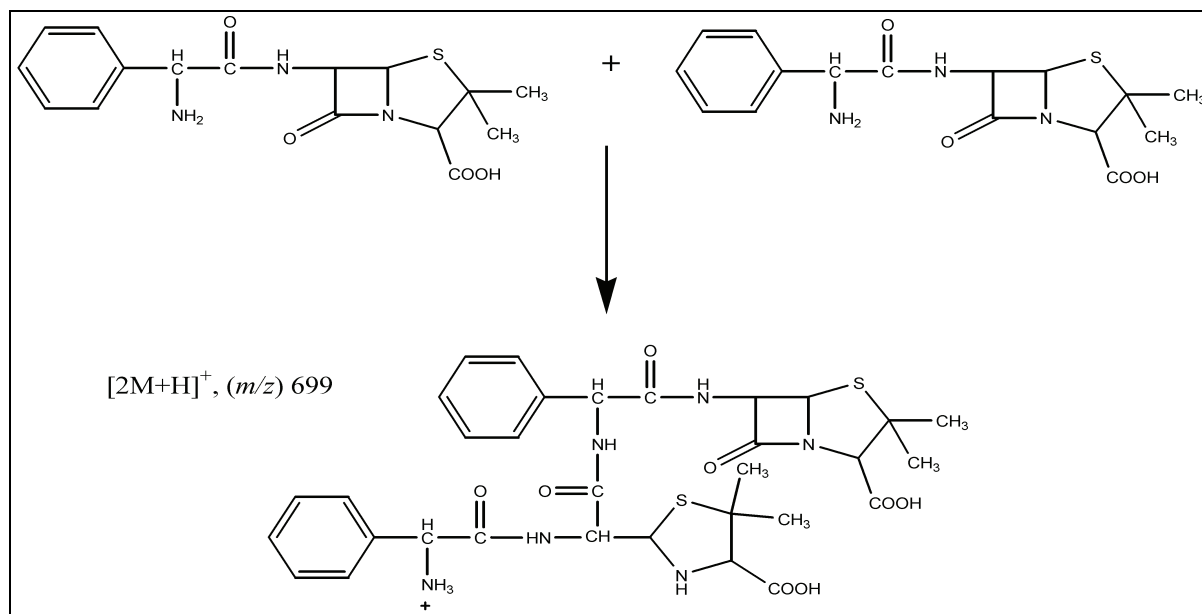


Abb. 76: Mechanismus der Dimerisierung von Ampicillin in wässriger Lösung.

Es ist bekannt, dass Ampicillin unter wässrigen Bedingungen leicht zur Dimerisierung neigt [198]. Dimeres Ampicillin kommt unter anderem als Verunreinigung in Ampicillin-Präparaten vor, dessen Gehalt unter anderem zur Qualitätsbestimmung herangezogen wird. Die Bildung des Ampicillin-Dimers aus zwei Ampicillin-Monomeren ist in Abb. 76 dargestellt.

Aufgrund der gemessenen Massenspektren konnte die Dimerisierung von Ampicillin als Ursache für die schlechte Lagerstabilität eindeutig identifiziert werden. Obwohl eine solche Dimerisierung bei Amoxicillin chemisch ebenso möglich ist, konnte ein vergleichbarer Abbau der Amoxicillin-Stammlösung durch Dimerisierung nicht festgestellt werden.

Es muss dabei allerdings berücksichtigt werden, dass zur Herstellung der Amoxicillin-Stammlösung kein Natriumsalz verwendet wurde, sondern die freie Säure. Möglicherweise findet dadurch eine Erniedrigung des pH-Wertes der wässrigen Lösung statt, weshalb die Aminogruppen von Amoxicillin vollständig protoniert vorliegen.

Hierdurch wird deren Nukleophilie erniedrigt und ein Angriff des Carbonyl-Kohlenstoffes im β -Lactamring verhindert. Eine Untersuchung der Lagerstabilität in Abhängigkeit des pH-Wertes wurde in dieser Untersuchung jedoch nicht durchgeführt. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es unumgänglich, wässrige Ampicillin-Stammlösungen vor jeder Analyse frisch herzustellen.

2.6 Untersuchung von Charm II-Test positiven Proben mit den entwickelten LC-MS/MS-Bestätigungsverfahren

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war es, die Praxistauglichkeit der entwickelten LC-MS/MS-Methoden an realen Proben mit gewachsenen Rückständen zu testen. Auf Basis der dabei erhaltenen quantitativen Ergebnisse sollte es möglich sein, Erkenntnisse in Bezug auf die aktuelle Rückstandssituation von β -Lactamen sowie Aminoglycosiden zu erhalten.

Insgesamt standen für diese Untersuchung 24 Proben, die im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung am CVUA Karlsruhe untersucht wurden, zur Verfügung. Diese Proben wurden zuvor mittels des Charm II-Test positiv auf β -Lactame oder Aminoglycoside (Streptomycin, Dihydrostreptomycin, Gentamicin) getestet.

Eine Übersicht der massenspektrometrisch bestätigten Rückstände in 12 Rindernierenproben, 10 Milchproben, einem Rindermuskel sowie einem Schafmuskel sind in der Abb. 77 grafisch dargestellt.

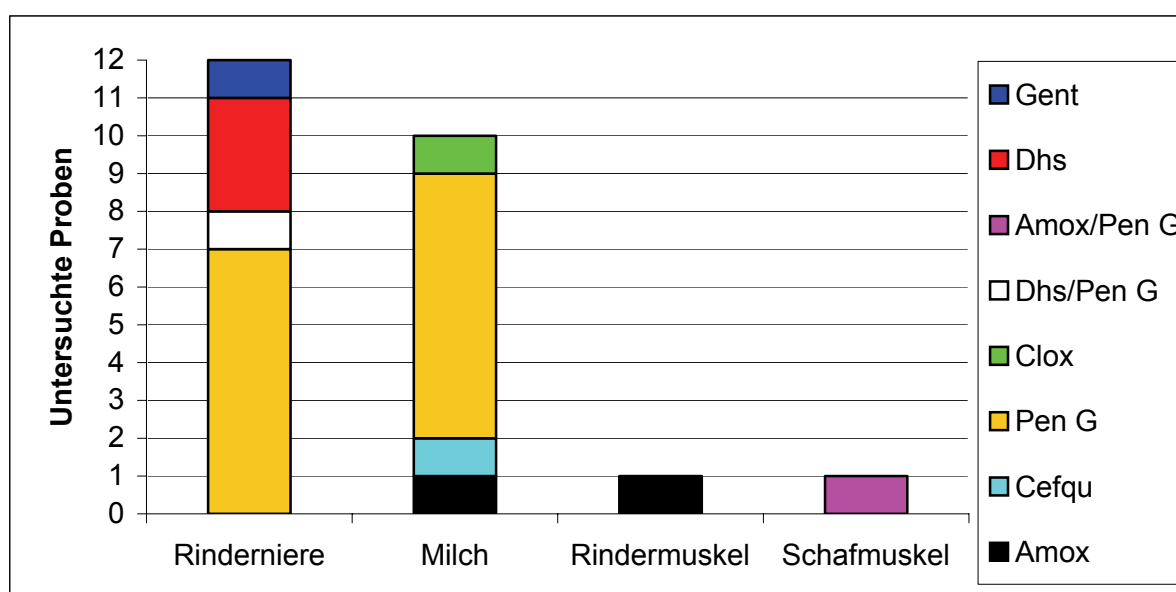


Abb. 77: Verteilung der massenspektrometrisch bestätigten Rückstände in den mittels Charm II-Test positiv getesteten Matrices.

Von den insgesamt 12 im Screening-Test positiven Rindernieren enthielten sieben Pen G, drei Dhs, eine Gent und eine Pen G in Kombination mit Dhs. Wie bei den Rindernierenproben stellt Pen G mit sieben Positivbefunden bei insgesamt 10 untersuchten Milchproben den am häufigsten gefundenen β -Lactam-Rückstand dar. Die restlichen drei Milchproben enthielten Clox, Amox und das Cephalosporin Cefquinome. In einem Rindermuskel konnte Amox bestätigt werden. Für eine Schafmuskulaturprobe wurde die LC-MS/MS-Multimethode für β -Lactame pilotartig angewendet. In dieser Probe konnte eine Kombination von Amox und Pen G bestätigt werden. Die quantitativen Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 35 zusammengefasst.

Tab. 35: Quantitative LC-MS/MS-Ergebnisse für die Proben, welche zuvor mittels des Charm II-Test positiv getestet wurden.

	Bestätigte Verbindung	Gefundene Konzentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Rindernierenprobe		
1	Pen G	34
2	Pen G	40
3	Pen G	59
4	Pen G	1200
5	Pen G	490
6	Pen G	55
7	Pen G	112
8	Pen G / Dhs	42 / 9130
9	Dhs	21310
10	Dhs	7180
11	Dhs	4900
12	Gent	*
Milchprobe		
1	Pen G	536
2	Pen G	3,2
3	Pen G	5,7
4	Pen G	16,4
5	Pen G	22,7
6	Pen G	6,6
7	Pen G	22,6
8	Amox	1,3
9	Clox	5,0
10	Cefqu	272
Rindermuskelprobe		
1	Amox	38
Schafmuskulaturprobe		
1	Amox / Pen G	60 / 10

(*) aufgrund der sehr niedrigen Wiederfindungen und der geringen Präzision wurde auf die quantitative Bestimmung von Gentamicin verzichtet

Bei insgesamt fünf Rindernierenproben und sieben Milchproben sowie einer Schafmuskulaturprobe lagen die β -Lactam-Konzentrationen oberhalb der für die Substanzen festgesetzten MRLs (\geq des ermittelten $CC\alpha$).

Extreme Höchstmengenüberschreitungen lagen jedoch lediglich in zwei Rindernierenproben mit 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Pen G (24 facher MRL) und 490 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Pen G (ca. 10 facher MRL) sowie in zwei Milchproben mit 536 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Pen G (134 facher MRL) und 272 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Cefquinome (ca. 14 facher MRL) vor.

In allen vier Rindernierenproben, welche Dhs-Rückstände enthielten, konnten sehr hohe Rückstandsgehalte gemessen werden, die zwischen 4900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 21310 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lagen. Der an sich relativ hohe MRL von 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wird von allen Proben deutlich überschritten.

Der Grund für diese hohen Rückstandsgehalte liegt vor allem in der Fähigkeit der Aminoglycoside begründet, sich sehr stark im Nierengewebe anzureichern. Ferner ist davon auszugehen, dass die Wartezeiten vor der Schlachtung der Tiere, die bei Dhs Medikamenten bis zu 4 Wochen betragen, mit großer Wahrscheinlichkeit nicht ordnungsgemäß eingehalten wurden.

Für die Nichteinhaltung der Wartezeiten sprechen unter anderem bereits ermittelte Rückstandsgehalte, die in Studien zum Ausscheidungsverhalten von Dhs in Rindern ermittelt wurden [199]. Die Rinder, welche in dieser Studie 10 mg Dhs je kg Körpergewicht durch intramuskuläre Injektion an drei aufeinanderfolgenden Tagen erhielten, wiesen im Mittel zwei Tage nach der letzten Verabreichung einen Rückstandsgehalt von 6608 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Dhs in der Niere auf.

Dieser Wert korreliert sehr gut mit den in den 4 Rindernieren gemessenen Rückstandsgehalten und bestätigt die Annahme, dass diese Tiere erst kurz nach der letzten Medikation ohne Einhaltung der geforderten Wartezeiten geschlachtet wurden.

3. Experimenteller Teil

3.1 Experimenteller Teil zu Kapitel 2.2

3.1.1 Chemikalien

Reinstwasser (Reinstwasseranlage Milli-Q-Gradient, Fa. Millipore)

Methanol (Lichrosolv, Fa. Merck)

Acetonitril (Lichrosolv, Fa. Merck)

Dichlordimethylsilan (Fa. Macherey-Nagel)

Toluol (Lichrosolv, Fa. Merck)

Ameisensäure (pro analysi, Fa. Merck)

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Fa. Roth)

Natriumchlorid (Fa. Fluka)

Natriumhydroxid (pro analysi, Fa. Merck)

Subtilisin Carlsberg (Fa. Sigma)

Standardsubstanzen:

Amoxicillin Hydrat (Fa. Sigma)

Ampicillin, Natrium-Salz (Fa. Sigma)

Cephalexin Hydrat (Fa. Sigma)

Cephapirin, Natrium-Salz (Fa. Sigma)

Desacetyl-Cephapirin (von der Fa. Intervet zur Verfügung gestellt)

Cefquinome Sulfat (von der Fa. Intervet zur Verfügung gestellt)

Cefazolin, Natrium-Salz (Fa. Sigma)

Cephalonium (Fa. Promochem)

Cefoperazon, Natrium-Salz (Fa. Sigma)

Ceftiofur, Natrium-Salz (von der Fa. Pharmacia Animal Health zur Verfügung gestellt)

Penicillin G, Natrium-Salz (Fa. Fluka)

Penicillin V, Kalium-Salz (Fa. Riedel-de Haen)

Oxacillin, Natrium-Salz Monohydrat (Fa. Sigma)

Cloxacillin, Natrium-Salz Monohydrat (Fa. Sigma)

Dicloxacillin, Natrium-Salz Monohydrat (Fa. Sigma)

Nafcillin, Natrium-Salz (Fa. ICN-Pharmaceuticals)

3.1.2 Lösungen

Natronlauge, c = 5 mol/l

20 g Natriumhydroxid in 100 ml Wasser lösen

Natronlauge, c = 0,2 mol/l

1 ml Natronlauge auf 25 ml mit Wasser verdünnen

Gesättigte Natriumchlorid-Lösung

Unter Rühren werden zu 1000 ml Wasser so viel Natriumchlorid zugefügt, bis diese gesättigt ist und keine weitere Lösung mehr stattfindet.

Phosphatpuffer-Lösung (pH 8,5), c = 0,05 mol/l (50 mM)

6,9 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat in ca. 850 ml Wasser lösen und mit 5 M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 8,5 einstellen. Mit Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Elutionslösung für die Reversed-Phase SPE-Kartusche (Waters Oasis HLB, 60 mg Polymersorbens)

Wasser wird mit Acetonitril im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt

HPLC-Eluent A (wässrige mobile Phase)

0,005 % (v/v) wässrige Ameisensäure. 50 µl Ameisensäure in 1000 ml Wasser verdünnen.

HPLC-Eluent B (organische mobile Phase)

Methanol

Stammlösungen

Von jeder Standardsubstanz wird unter Berücksichtigung des Wassergehaltes und der Reinheit (Analysezertifikat des Herstellers) soviel in einen 20 ml Messkolben eingewogen, dass nach dem Auffüllen bis zur Eichmarke die Lösung eine Konzentration von 1 mg/ml, bezogen auf die freie Säure, besitzt. Alle Substanzen werden bis auf Cephalonium (Wasser/Acetonitril, 1:1, v/v) in Wasser gelöst. Die eingefrorenen Stammlösungen (-24°C) sind mindestens sechs Monate stabil.

Lediglich Ampicillin baut aufgrund einer Dimerisierung (s. 2.5.7.1) sehr schnell ab. Ampicillin Stammlösungen sind bei jeder Messung frisch herzustellen.

Arbeitsstandard-Lösungen

Geeignete Arbeitsstandard-Lösungen für die Dotierungen der Matrices sowie zur Erstellung der Standard-Kalibriergeraden werden durch eine entsprechende Verdünnung der Stammlösungen mit Wasser täglich frisch hergestellt.

3.1.3 Geräte /Hilfsmittel

Alle Glasgeräte werden mit Dimethyldichlorsilan (DMCS) in Toluol silyliert:

Hierzu werden diese mit einer Lösung aus 10 ml DMCS in 100 ml Toluol gefüllt und nach einer Standzeit von 30 Min. nacheinander mit Toluol, Methanol und Wasser gespült.

- 50 ml Spitzkölbchen
- HPLC-Vials aus Polypropylen, 1 ml (Fa. Agilent)
- Reversed-Phase SPE-Kartusche, Oasis HLB, 60 mg Polymerharzsorbens (Fa. Waters). Die SPE-Kartusche nacheinander mit 2 ml Methanol, 2 ml Wasser und 2 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH 8,5) konditionieren.
- Variable Kolbenhubpipetten in verschiedenen Größen, Finnpiette (Fa. Thermo Life Sciences)
- Graduierte Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel, 50 ml (Fa. Roth)
- Graduierte Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel, 15 ml (Fa. Roth)
- Kühlzentrifuge, Variofuge RF Inert (Fa. Heraeus)
- Homogenisierstab, T25 basic (Fa. IKA Labortechnik)
- Messermühle, Grindomix GM 200 (Fa. Retsch)
- Schüttelwasserbad, SW 20 (Fa. Julabo)
- Reagenzglasschüttler, REAX top (Fa. Heidolph)
- Festphasen-Extraktionseinheit, mit üblichem Zubehör
- Heizblock mit Abblasvorrichtung, Reacti-Therm Heating Module (Fa. Pierce)
- Rotationsverdampfer, Laborota 4000 mit Rotavac control für die Druckkontrolle (Fa. Heidolph)

3.1.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit MS/MS-Detektion

3.1.4.1 LC-MS/MS-System

HPLC:

Binäre Pumpe, Vakuum Entgaser, Autosampller, 1100 Series (Fa. Agilent)

Massenspektrometer:

Triple-Quadrupol-Gerät, TSQ 7000 (Fa. Thermo Finnigan)

Spritzenpumpe:

Syringe Pump Series 11 (Fa. Harvard Apparatus)

HPLC-Säule 1 (verwendet für die Multimethode)

Hydrophil desaktivierte Phenyletherphase, Synergie Polar RP 250 X 2 mm, 4 µm Säule (Fa. Phenomenex)

HPLC-Säule 2 (verwendete Vergleichssäule zur HPLC-Säule 1, s. 2.2.1)

Unpolare alkylgebundene C-12-Phase, Synergie Max RP 250 X 2 mm, 4 µm Säule (Fa. Phenomenex)

Chromatographische Bedingungen:

Bei Verwendung der angegebenen Trennsäule und der angegebenen Elutionsmittel (HPLC-Eluent A, HPLC-Eluent B) hat sich eine Säulentemperatur von 37°C und folgendes Gradientenprogramm als geeignet erwiesen.

Gradientenprogramm:

Zeiten (min)	Flussrate (ml/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0 - 3	0,2	100	0
3 - 22	0,2	10	90
22 - 37	0,2	10	90
37 – 52 (Äquilibrieren)	0,2	100	0

Interface: Elektrosprayionisation (ESI)

Nadelspannung: 5 kV

Sheatgasdruck: 70 psi (483 kPa)

Auxiliarygas: Wurde nicht verwendet

Kapillartemperatur: 330°C

Kollisionsgasdruck (Argon): 2,5 mT

MS-Modus: Multiple reaction monitoring (MRM), entsprechend der unter 3.1.4.2 aufgeführten Parameter

Injektionsvolumen: 20 µ

3.1.4.2 MS/MS-Parameter

In Tab. 36 ist eine Zusammenfassung über die in sechs Zeitsegmente unterteilten MS/MS Parameter, ESI-Modus (+/-), in Q1 fixiertes Vorläuferion, Offset-Spannung (V) für Q2, gemessene Quantifier- u. Qualifierionen, Messzeit des Q2 für jedes Produktion, dargestellt.

Die Reihenfolge der β -Lactame in der Tabelle entspricht ihrer Elutionsreihenfolge bei der chromatographischen Trennung.

Tab. 36: Zusammenfassung der in den sechs unterschiedlichen Zeitsegmenten verwendeten MS/MS-Parameter.

β -Lactam	ESI (+/-)	Vorläuferion (m/z)	Offset-Spannung (V)	Quantifier/ Qualifier-Ion (% rel. Intensität)	Zeit-Segmente (min)	Messzeit Produkt-Ion (ms)
Amoxicillin	+	366.2	15	349.0 (100) / 207.9 (41)	0 - 15	1000
Desacetyl-Cephapirin	+	382.2	26	225.9 (100) / 151.9 (62)	15.0 – 20.2	300
Ampicillin	+	350.2	22	106.0 (100) / 192.0 (98)		
Cephalexin	+	348.1	16	157.9 (100) / 174.1 (53)		
Cephapirin	+	424.1	23	292.0 (100) / 151.9 (44)	20.2 – 22.2	150
Cephalonium	+	459.2	17	336.9 (100) / 152.0 (32)		
Cefquinome	+	529.2	21	133.9 (100) / 324.0 (42)	22.2 – 25.0	250
Cefazolin	+	455.1	16	322.9 (100) / 155.9 (22)		
Cefoperazone	-	644.2	14	527.9 (100) / 187.9 (36)	25.0 – 28.0	250
Penicillin G	-	333.0	14	191.8 (100) / 289.0 (14)		
Penicillin V	-	349.1	14	208.0 (100) / 305.0 (18)	28.0 – 32.0	120
Oxacillin	-	400.1	14	258.8 (100) / 356.0 (37)		
Cloxacillin	-	434.1	15	292.9 (100) / 389.9 (35)		
Dicloxacillin	-	468.1	15	326.7 (100) / 424.0 (31)		
Nafcillin	-	413.2	15	272.0 (100) / 369.0 (20)		

Um das Massenspektrometer vor Verschmutzungen zu schützen, wird während der ersten 9,5 Minuten, zwischen 12,5 und 15,5 Minuten sowie ab 32 Minuten, für die Zeit des Äquilibrierens, der HPLC-Fluss mittels der Abfallschaltung nicht in das ESI-Interface geleitet.

3.1.5 Probenaufarbeitung für die Matrices Milch, Muskel und Niere von Rindern

Vorbereitende Schritte:

Gewebe: Rindermuskel und Rinderniere mit einem Messer grob zerteilen und in einer Messermühle fein zerhacken. Davon jeweils genau 4 g in ein 50 ml Polypropylenzentrifugenröhrchen einwiegen und bis zur Analyse bei -25°C einfrieren. Für die Analyse (s. 3.1.5.1) werden die Gewebeproben aus dem Gefrierschrank entnommen und in einem Wasserbad bei 25°C aufgetaut. Nach dem Auftauen evtl. dotieren.

Milch: 30 g evtl. dotierte Rohmilch für 10 Min. bei 1500 g und 10°C zentrifugieren. Die obere Rahmschicht mit einem Spatel entfernen und genau 10 g der entfetteten Milch (S. 3.1.5.1) in ein graduiertes Polypropylenzentrifugenröhrchen einwiegen.

Zum Dotieren der Gewebe- und der Milchproben am halben MRL, am MRL sowie dem 1,5 fachen MRL diesen 100, 200 sowie 300 μl einer entsprechend konzentrierten Arbeitsstandard-Lösung zudotieren. Nach dem Dotieren die Proben mittels eines Reagenzglasschüttlers mischen und bei Raumtemperatur für 10 Minuten stehen lassen.

3.1.5.1 Extraktion und Deproteinierung mit Acetonitril

Zu den Gewebeproben 2 ml Wasser und so viel Acetonitril zugeben, bis ein Endvolumen von 20 ml erreicht wird. Bei der Milch wird das Endvolumen mit Acetonitril auf 30 ml eingestellt.

Die Gewebeproben mit einem Homogenisierstab für 60 Sekunden homogenisieren, die Milchproben für 15 Sekunden intensiv mittels eines Reagenzglasschüttlers mischen und die ausgefällten Proteine durch Zentrifugation bei 1500 g und 25°C abtrennen.

3.1.5.2 Acetonitril- und Fettentfernung, pH-Einstellung

15 ml des klaren Überstandes (entsprechend 3 g Gewebe oder 5 g Milch) in ein silyliertes 50 ml Glaskölbchen überführen und mit 4 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung versetzen. Nach mehrmaligem Umschwenken, das Acetonitril mittels eines Rotationsverdampfers bei 37°C entfernen (Startvakuum 280 mbar, Endvakuum 80 mbar). Der Vorgang ist beendet, wenn die obere organische Phase nicht mehr sichtbar ist. Anschließend kurz entlüften und das Endvakuum nochmals anlegen. Anmerkung: Es ist wichtig, das Vakuum zwei mal anzulegen, da nur so eine vollständige Acetonitrilentfernung erreicht werden kann.

Gewebe:

Die nach der Acetonitrilentfernung erhaltenen Extrakte von Muskulatur und Niere in einem graduierten Polypropylenzentrifugenröhrchen mit Phosphatpuffer (50 mM) auf genau 30 ml verdünnen und nach dem Mischen (Reagenzglasschüttler) bei 3500 g für 30 Min. bei 25°C zentrifugieren. Die entstandene obere Fettphase sowie größere Partikel mit einer Pasteurpipette, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist, absaugen. Genau 20 ml des Endextraktes mit Natronlauge (0,2 M) auf pH 8,5 einstellen.

Milch:

Die nach der Acetonitrilentfernung erhaltenen Extrakte von Milch mit 15 ml Phosphatpuffer (50 mM) verdünnen, in ein graduiertes Polypropylenzentrifugenröhrchen überführen und den pH-Wert auf 8,5 einstellen. Für Milch ist keine Fettentfernung notwendig.

3.1.5.3 SPE-Aufreinigung

Die unter Punkt 3.1.5.2 erhaltenen wässrigen Probenextrakte mit einem Fluss von 0,5 ml/min in die SPE-Kartusche einsaugen. Anschließend die SPE-Kartusche nacheinander mit 3 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH 8,5) und 1 ml Wasser waschen. Nach kurzem Trockensaugen für 15 Sek. die β -Lactame mit 3 ml Elutionslösung für die Reversed-Phase SPE-Kartusche in ein graduiertes 15 ml Polypropylenzentrifugenröhrchen eluieren. Das Acetonitril mittels eines Heizblocks mit Abblasvorrichtung bei 45°C unter einem Stickstoffstrom entfernen. Das Endvolumen mit Wasser auf genau 2 ml einstellen. Nach dem Mischen am Reagenzglasschüttler

bei 3500 g für 15 Minuten bei 10°C zentrifugieren, 500 µl des Probenextraktes in ein HPLC-Vial abfüllen und 20 µl in das LC-MS/MS-System injizieren.

3.1.6 Durchführung der Endopeptidasebehandlung für die Matrix Rinderniere

Genau 3 g Nierenhomogenat in ein graduiertes 50 ml Polypropylenzentrifugenröhrchen einwiegen. So viel 50 mM Phosphatpuffer (pH 8,5) zugeben, bis ein Endvolumen von 20 ml erreicht wird. Mit einem Homogenisierstab für 60 Sekunden homogenisieren. Anschließend 10 mg Subtilisin Carlsberg einrühren. Das Zentrifugenröhrchen für 2 Stunden in ein 55°C heißes Schüttelwasserbad stellen und anschließend bei 3500 g für 15 Minuten bei 25°C zentrifugieren. 10 ml des Überstandes nach dem unter 3.1.5.3 beschriebenen SPE-Verfahren aufreinigen und aufkonzentrieren.

3.1.7 Quantitative Auswertung

Die Quantifizierung der β-Lactame erfolgt über extern erstellte Standard-Kalibriergeraden mit mindestens 4 Kalibrierpunkten. Hierzu werden für jedes β-Lactam die Peakflächen der Quantifizier-Ionen gegen die Konzentrationen (ng/ml) der Standard-Lösungen, in dem für die Quantifizierung benötigten Konzentrationsbereich, aufgetragen. Die Kalibrierfunktion wird durch lineare Regression ermittelt.

Aus der ermittelten Kalibrierfunktion ($y = m \cdot x + b$) wird unter Berücksichtigung der Wiederfindung (Wiederfindungsfaktoren) und der Matrixeffekte (Matrixfaktoren) der Gehalt (µg/kg) in der Probe berechnet. Bei den Milchproben ist eine Aufkonzentrierung um den Faktor 2,5 zu berücksichtigen.

Gewebe:

$$C = \frac{y - a}{b} \cdot (\text{Matrixfaktor}) \cdot (\text{Wiederfindungsfaktor})$$

Milch:

$$C = \frac{y - a}{b \cdot 2,5} \cdot (\text{Matrixfaktor}) \cdot (\text{Wiederfindungsfaktor})$$

C = Gehalt des betreffenden β-Lactams in µg/kg, a = Achsenabschnitt der Kalibriergeraden, b = Steigung der Kalibriergeraden, Y = Gemessene Peakfläche der untersuchten Probe.

3.1.7.1 Quantitative Auswertung über das Standardadditions-Verfahren

Zur Durchführung die fertigen Probenextrakte (2 ml) in zwei Aliquote mit je 475 μl (Aliquot 1 und Aliquot 2) unterteilen. Aliquot 1 mit 25 μl Wasser und Aliquot 2 mit 25 μl der entsprechenden Standardlösung dotieren. Die resultierende Substanzkonzentration in Aliquot 2 sollte dabei doppelt so hoch sein wie in Aliquot 1. Beide Proben messen und die erhaltenen Peakflächen gegen die zudotierte Konzentration auftragen. Nach der Extrapolation der experimentellen 2 Punktgeraden durch die Konzentrationsachse (negative x-Achse) und der Korrektur des Verdünnungseffektes von 5 %, lässt sich der von Matrixeffekten korrigierte Gehalt bestimmen.

Beispielrechnung für die Bestimmung von Ampicillin in Milch, die am MRL (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) dotiert wurde:

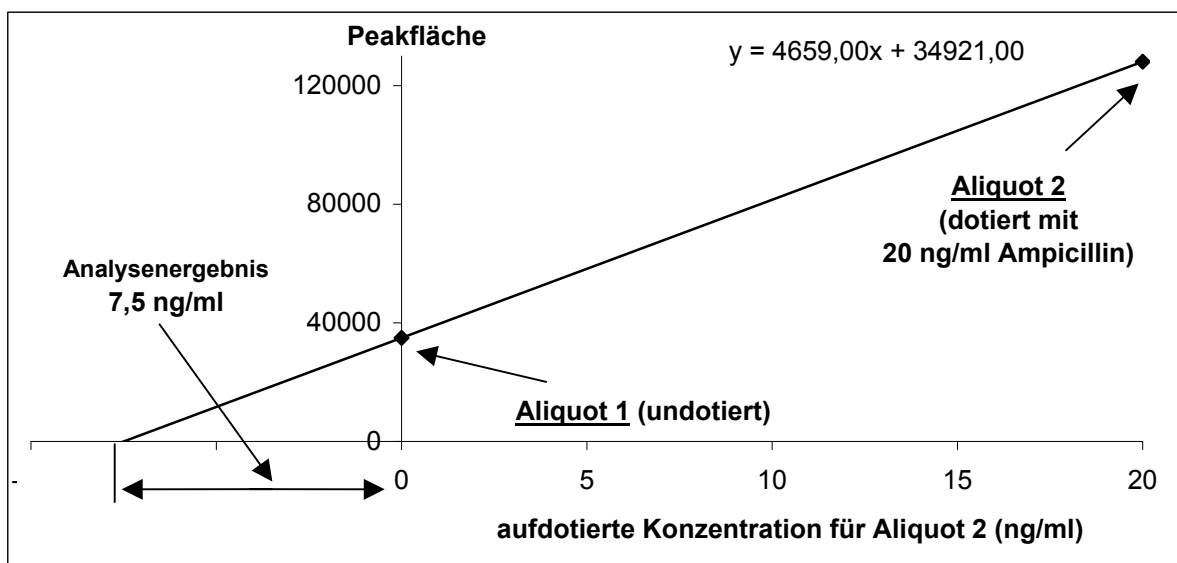


Abb. 78: Ermittlung der Ampicillinkonzentration mittels des beschriebenen Standardadditions-Verfahrens

Die erhaltene Aufstockfunktion lautet: $y = 4659,00 \cdot x + 34921,00$. Die Aufstockfunktion wird nach x aufgelöst und der erhaltene Wert (- 7,5 ng/ml) positiviert. Nach der Berücksichtigung des Verdünnungseffektes von 5 % und des Aufkonzentrierungsfaktors von 2,5 (nur für die Aufarbeitung von Milch) errechnet sich die Konzentration in der analysierte Milchprobe zu 3,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

3.2 Experimenteller Teil zu Kapitel 2.3

3.2.1 Chemikalien

Reinstwasser (Reinstwasseranlage Milli-Q-Gradient, Fa. Millipore)

Methanol (Lichrosolv, Fa. Merck)

Acetonitril (Lichrosolv, Fa. Merck)

Ameisensäure (pro analysi, Fa. Merck)

Dithioerythritol (DTE) (Fa. Sigma)

Iodacetamid (Fa. Sigma)

Borsäure (Fa. Roth)

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Fa. Roth)

Kaliumchlorid (Fa. Fluka)

Natriumhydroxid (pro analysi, Fa. Merck)

o-Phosphorsäure 85 % (pro analysi, Fa. Merck)

Standardsubstanzen:

Ceftiofur, Natrium-Salz (von der Fa. Pharmacia Animal Health zur Verfügung gestellt)

3.2.2 Lösungen

Natronlauge, $c = 5 \text{ mol/l}$

20 g Natriumhydroxid in 100 ml Wasser lösen

o-Phosphorsäurelösung (5%, w/v)

5,9 ml o-Phosphorsäure (85%) in 100 Wasser verdünnen

Boratpuffer-Lösung (pH 9), $0,2 \text{ mol/l}$

12,4 g Borsäure und 3,7 g Kaliumchlorid in ca. 850 ml Wasser lösen, mit 5 M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 9 einstellen. Mit Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Phosphatpuffer-Lösung (pH 7), c = 0,025 mol/l (25 mM)

3,5 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat in ca. 850 ml Wasser lösen und mit 5 M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 8,5 einstellen. Mit Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Extraktions-Lösung: DTE (0,4 %, w/v) in Boratpuffer

0,4 g Dithioerythritol in 100 ml Boratpuffer lösen.

Derivatisierungs-Lösung: Iodacetamid (14 %, w/v) in Phosphatpuffer

7 g Iodacetamid in 50 ml 25 mM Phosphatpuffer (pH 7) lösen.

Elutionslösung für die Reversed-Phase SPE-Kartusche (Waters Oasis HLB, 60 mg Polymersorbens)

Wasser wird mit Acetonitril im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt

HPLC-Eluent A (wässrige mobile Phase)

0,005 % (v/v) wässrige Ameisensäure. 50 µl Ameisensäure in 1000 ml Wasser verdünnen.

HPLC-Eluent B (organische mobile Phase)

Methanol

Stammlösungen

Von der Standardsubstanz wird unter Berücksichtigung des Wassergehaltes und der Reinheit (Analysezertifikat des Herstellers) soviel in einen 20 ml Messkolben eingewogen, dass nach dem Auffüllen bis zur Eichmarke die Lösung eine Konzentration von 1 mg/ml Desfuroylceftiofur, bezogen auf die freie Säure, besitzt. Die Substanz wird in Wasser gelöst. Die bei -24°C eingefrorene Stammlösung ist mindestens sechs Monate stabil.

Arbeitsstandard-Lösungen

Geeignete Arbeitsstandard-Lösungen für die Dotierungen der Milch sowie zur Erstellung der Standard-Kalibriergeraden werden durch eine entsprechende Verdünnung der Stammlösungen mit Wasser täglich frisch hergestellt.

3.2.3 Geräte /Hilfsmittel

- HPLC-Vials aus Polypropylen, 1ml (Fa. Agilent)
- Reversed-Phase SPE-Kartusche, Oasis HLB, 60 mg Polymerharzsorbens (Fa. Waters). Die SPE-Kartusche nacheinander mit 2 ml Methanol und 3 ml Wasser konditionieren.
- Festphasen-Extraktionseinheit, mit üblichen Zubehör
- Variable Kolbenhubpipetten in verschiedenen Größen, Finnpipette (Fa. Thermo Life Sciences)
- Graduierte Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel, 50 ml (Fa. Roth)
- Graduierte Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel, 15 ml (Fa. Roth)
- Kühlzentrifuge, Variofuge RF Inert (Fa. Heraeus)
- Schüttelwasserbad, SW 20 (Fa. Julabo)
- Reagenzglasschüttler, REAX top (Fa. Heidolph)
- Heizblock mit Abblasvorrichtung, Reacti-Therm Heating Module (Fa. Pierce)

3.2.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit MS/MS-Detektion

3.2.4.1 LC-MS/MS-Systeme

System 1: Für die quantitative Bestimmung der Ceftiofurrückstände wird dasselbe LC-MS/MS-System, wie unter Punkt 3.1.4.1 beschrieben, verwendet. Die chromatographischen Bedingungen sind ebenfalls analog.

System 2: Für die Postulierung des Fragmentierungsmechanismus von Ceftiofur und Desfuroylceftiofur-Acetamid war es notwendig, MS/MS/MS/MS (MS^4) Spektren zu erzeugen. Die Fragmentierungsexperimente wurden mit dem unten beschriebenen Ion-Trap Massenspektrometer (Seite 155) durchgeführt, indem mittels der Spritzenpumpe eine wässrige Ceftiofur-Lösung (10 $\mu\text{g/ml}$) dem HPLC-Eluenten (0,2 ml/min) zudosiert wurde.

HPLC:

Niederdruck-Pumpe, Vakuum Entgaser, Autosampler, SpectraSYSTEM P2000 (Fa. Thermo Separation Products)

Massenspektrometer:

Ion-Trap-Gerät, LCQ (Fa. Thermo Finnigan)

HPLC-Eluent

50 % Eluent A und 50 % Eluent B

Spritzenpumpe:

In das LC-MS-System integrierte Spritzenpumpe

3.2.4.2 MS/MS Parameter

In Tab. 37 ist eine Zusammenfassung der über ein Zeitsegment unterteilten MS/MS Parameter, ESI-Modus (+/-), in Q1 fixiertes Vorläuferion, Offset-Spannung (V) für Q2, gemessene Quantifier- u. Qualifierionen und Messzeit des Q2 für jedes Produktion, dargestellt.

Tab. 37: Zusammenfassung der verwendeten MS/MS Parameter

β -Lactam	ESI (+/-)	Vorläufer ion (m/z)	Offset- Spannung (V)	Quantifier/ Qualifier-Ion (% rel. Intensität)	Zeit- Segmente (min)	Messzeit Produkt-Ion (ms)
DCA	+	487.0	28	241.0 (100) / 210.1 (35)	20 - 25	400

Um das Massenspektrometer vor Verschmutzungen zu schützen, wird während der ersten 22 Minuten sowie ab 25 Minuten, für die Zeit des Äquilibrierens, der HPLC-Fluss mittels der Abfallschaltung nicht in das ESI-Interface geleitet.

3.2.5 Probenaufarbeitung

Vorbereitende Schritte:

30 g evtl. dotierte Rohmilch für 10 Min. bei 1500 g und 10°C zentrifugieren. Die obere Rahmschicht mit einem Spatel entfernen und genau 2 g der entfetteten Milch in ein graduiertes Polypropylenzentrifugenröhrchen einwiegen.

Zum Dotieren der Milchproben am halben MRL, am MRL sowie dem doppelten MRL diesen 75, 150 sowie 300 µl einer entsprechend konzentrierten Arbeitsstandard-Lösung zudotieren. Nach dem Dotieren die Proben mittels eines Reagenzglasschüttlers mischen und bei Raumtemperatur für 10 Minuten stehen lassen.

3.2.5.1 Durchführung der Extraktion

Zu den 2 g Milch 15 ml Extraktions-Lösung zugeben. Nach dem Mischen (Reagenzglasschüttler) für 15 Sek. den Ansatz für 15 Min. in ein 50°C heißes Schüttelwasserbad stellen.

Anmerkung: Der Kalibrierstandard (1000 ng Desfuroylceftiofur absolut) wird simultan zu den Proben aufgearbeitet.

3.2.5.2 Derivatisierung und Deproteinierung

Im Anschluss an die Extraktion 3 ml Derivatisierungs-Lösung ohne vorherige Abkühlung zugeben. Nach dem Mischen (Reagenzglasschüttler) für 15 Sek. und einer Reaktionszeit von 30 Min. im Dunkeln, den pH-Wert mit o-Phosphorsäure-Lösung (5 %, w/v) auf 3,5 erniedrigen. Dies dient zum Ausfällen der Caseine (Deproteinierung). Nach dem Mischen für 15 Sek. und dem Zentrifugieren bei 3000 g für 15 Min. bei 10°C den klaren, wässrigen Überstand in ein neues 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen überführen.

3.2.5.3 SPE Aufreinigung

Den unter Punkt 3.2.5.2 erhaltenen Probenextrakt mit einem Fluss von 1 ml/min in die SPE-Kartusche einsaugen. Anschließend die SPE-Kartusche nacheinander mit 2 ml und 1 ml Wasser waschen. Nach kurzem Trockensaugen für 15 Sek. das Desfuroylceftiofur-Acetamid Derivat mit 3 ml Elutionslösung für die Reversed-Phase

SPE-Kartusche in ein graduiertes 15 ml Polypropylenzentrifugenröhrchen eluieren. Das Acetonitril mittels eines Heizblocks mit Abblasvorrichtung bei 45°C unter einem Stickstoffstrom entfernen. Das Endvolumen mit Wasser auf genau 2 ml einstellen. Nach dem Mischen am Reagenzglasschüttler bei 3500 g für 15 Minuten bei 10°C zentrifugieren, 500 µl des Probenextraktes in ein HPLC-Vial abfüllen und 20 µl in das LC-MS/MS-System injizieren.

Anmerkung: Der Kalibrierstandard (500 ng/ml) wird für die Erstellung der Kalibriergeraden entsprechend mit Wasser verdünnt.

3.2.6 Quantitative Auswertung

Die Quantifizierung von Desfuoylceftiofur erfolgt über extern erstellte Standard-Kalibriergeraden mit mindestens 4 Kalibrierpunkten. Hierzu werden die Peakflächen des Quantifizier-Ions von Desfuoylceftiofur-Acetamid gegen die Konzentrationen (ng/ml) von Desfuoylceftiofur (bezogen auf die freie Säure), in dem für die Quantifizierung benötigten Konzentrationsbereich, aufgetragen. Die Kalibrierfunktion wird durch lineare Regression ermittelt.

Aus der ermittelten Kalibrierfunktion ($y = m \cdot x + b$) wird der Gehalt (µg/kg) in der Probe berechnet.

$$C = \frac{y - a}{b}$$

C = Gehalt von Desfuoylceftiofur in µg/kg, a = Achsenabschnitt der Kalibriergeraden, b = Steigung der Kalibriergeraden, Y = Gemessene Peakfläche der untersuchten Probe

3.3 Experimenteller Teil zu Kapitel 2.4

3.3.1 Chemikalien

Reinstwasser (Reinstwasseranlage Milli-Q-Gradient, Fa. Millipore)

Acetonitril (Lichrosolv, Fa. Merck)

Ameisensäure (pro analysi, Fa. Merck)

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Fa. Roth)

Natriumhydroxid (pro analysi, Fa. Merck)

Standardsubstanzen:

Spectinomycin Dihydrochlorid Pentahydrat (Fa. Riedel de Haen)

Streptomycin Sulfat (Fa. Riedel de Haen)

Dihydrostreptomycin Sulfat (Fa. Sigma)

Gentamicin Sulfat (Fa. Sigma)

3.3.2 LösungenNatronlauge, c = 5 mol/l

20 g Natriumhydroxid in 100 ml Wasser lösen

Natronlauge, c = 0,2 mol/l

1 ml Natronlauge auf 25 ml mit Wasser verdünnen

HPLC-Eluent A (wässrige mobile Phase)

0,005 % (v/v) wässrige Ameisensäure. 50 µl Ameisensäure in 1000 ml Wasser verdünnen.

HPLC-Eluent B (organische mobile Phase)

Acetonitril

Stammlösungen

Von jeder Standardsubstanz wird unter Berücksichtigung des Wassergehaltes und der Reinheit (Analysezertifikat des Herstellers) soviel in einen 20 ml Messkolben eingewogen, dass nach dem Auffüllen bis zur Eichmarke die Lösung eine Konzentration von 1 mg/ml bezogen auf die freie Base besitzt. Alle Substanzen werden in Wasser gelöst. Die bei -24°C eingefrorenen Stammlösungen sind mindestens sechs Monate stabil.

Arbeitsstandard-Lösungen

Geeignete Arbeitsstandard-Lösungen für die Dotierungen der Matrices sowie zur Erstellung der Standard-Kalibriergeraden werden durch eine entsprechende Verdünnung der Stammlösungen mit Wasser täglich frisch hergestellt.

3.3.3 Geräte /Hilfsmittel

- HPLC-Vials aus Polypropylen, 500 µl (Fa. A-Z Analytik-Zubehör)
- Variable Kolbenhubpipetten in verschiedenen Größen, Finnpipette (Fa. Thermo Life Sciences)
- Ultrafiltrationseinheit, Vivaspin 0,5 ml Concentrator, Polyethersulfonmembran 100 kDa (Fa. Viva Science)
- Graduierte Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel, 50 ml (Fa. Roth)
- Homogenisierstab, T25 basic (Fa. IKA Labortechnik)
- Messermühle, Grindomix GM 200 (Fa. Retsch)
- Kühlzentrifuge, Variofuge RF Inert (Fa. Heraeus)
- Reagenzglasschüttler, REAX top (Fa. Heidolph)

3.3.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit MS/MS-Detektion

3.3.4.1 LC-MS/MS-System

Für die quantitative Bestimmung der Aminoglycoside wird dasselbe LC-MS/MS-System, wie unter Punkt 3.1.4.1 beschrieben, verwendet. Änderungen hiervon sind nachfolgend aufgeführt:

Chromatographische Bedingungen:

Bei Verwendung der angegebenen Trennsäule und den angegebenen Elutionsmitteln (HPLC-Eluent A, HPLC-Eluent B) hat sich eine Säulentemperatur von 37°C und folgendes Gradientenprogramm als geeignet erwiesen.

Gradientenprogramm:

Zeiten (min)	Flussrate (ml/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0 - 5	0,25	20	80
5 - 10	0,25	80	20
10 - 20	0,25	80	20
20 – 30 (Äquilibrieren)	0,25	20	80

Kapillartemperatur: 390°C

MS-Modus: Multiple reaction monitoring (MRM), entsprechend der unter 3.1.4.2 aufgeführten Parameter

Injektionsvolumen: 10 µ

3.3.4.2 MS/MS-Parameter

In Tab. 38 ist eine Zusammenfassung der über ein Zeitsegment unterteilten MS/MS Parameter, ESI-Modus, in Q1 fixiertes Vorläuferion, Offset-Spannung (V) für Q2, gemessene Quantifier- u. Qualifierionen und Messzeit des Q2 für jedes Produktion, dargestellt.

Tab. 38: Zusammenfassung der verwendeten MS/MS-Parameter

Amino-glycosid	ESI (+/-)	Vorläufer Ion (m/z)	Offset-Spannung (V)	Quantifier/ Qualifier-Ion (% rel. Intensität)	Zeit-Segmente (min)	Messzeit Produkt-Ion (ms)
Spec	+	351,1	28	333,0 (100) / 207,0 (49)	14 - 18	150
Str	+	582,4	28	263,1 (100) / 246,1 (37)		
Dhs	+	584,3	37	263,1 (100) / 246,1 (32)		
Gent C1	+	478,4	20	322,2 (100) / 156,9 (42)		

Um das Massenspektrometer vor Verschmutzungen zu schützen, wird während der ersten 14 Minuten sowie ab 18 Minuten, für die Zeit des Äquilibrierens, der HPLC-Fluss mittels der Abfallschaltung nicht in das ESI-Interface geleitet.

3.3.5 Probenaufarbeitung

Vorbereitende Schritte:

Rinderniere mit einem Messer grob zerteilen und in einer Messermühle fein zerhacken. Davon jeweils genau 2 g in ein 50 ml Polypropylenzentrifugenröhrchen einwiegen und bis zur Analyse bei -25°C einfrieren. Für die Analyse (s. 3.3.5.1) werden die Gewebeproben aus dem Gefrierschrank genommen und in einem Wasserbad (25°C) aufgetaut. Nach dem Auftauen evtl. dotieren.

Zum Dotieren der Rindernierenproben mit einem Gehalt von $1000\ \mu\text{g}/\text{kg}$ diesen $100\ \mu\text{l}$ einer entsprechend konzentrierten Arbeitsstandard-Lösung zudotieren. Nach dem Dotieren die Proben mittels eines Reagenzglasschüttlers mischen und bei Raumtemperatur für 10 Minuten stehen lassen.

3.3.5.1 Extraktion und Deproteinierung mittels Ultrafiltration (UF)

Zu den Proben 8,3 ml Wasser und 300 µl Natronlauge (0,2 M) zugeben. Mit dem Homogenisierstab (Ultra-Turrax) für 60 Sek. homogenisieren und nach der Zentrifugation bei 3500 g für 20 Min. bei 25°C ein Volumen von 500 µl in die Ultrafiltrationseinheit pipettieren. Die Ultrafiltrationseinheiten bei 4000 g für 30 Min. bei 25°C zentrifugieren und 50 µl des Probenextraktes in ein Polypropylen-Vial (500 µl) abfüllen. 10 µl des klaren Ultrafiltrates in das LC-MS/MS-System injizieren.

3.3.6 Quantitative Auswertung

Die Quantifizierung der Aminoglycoside erfolgt über extern erstellte Standard-Kalibriergeraden mit mindestens 4 Kalibrierpunkten. Hierzu werden für jedes β-Lactam die Peakflächen der Quantifizier-Ionen gegen die Konzentrationen (ng/ml) der Standard-Lösungen, in dem für die Quantifizierung benötigten Konzentrationsbereich, aufgetragen. Die Kalibrierfunktion wird für Spectinomycin durch lineare Regression und für Streptomycin, Dihydrostreptomycin und Gentamicin durch quadratische Regression ermittelt.

Aus der ermittelten Kalibrierfunktion ($y = m \cdot x + b$) für Spectinomycin und ($y = ax^2 + bx + c$) für Streptomycin, Dihydrostreptomycin und Gentamicin wird unter Berücksichtigung der Verdünnung (Faktor 5) der Gehalt (µg/kg) in der Probe berechnet.

Spectinomycin:

$$C = \frac{y - a}{b} \cdot 5$$

C = Gehalt von Spectinomycin in µg/kg, a = Achsenabschnitt der Kalibriergeraden, b = Steigung der Kalibriergeraden, Y = Gemessene Peakfläche der untersuchten Probe

Streptomycin, Dihydrostreptomycin und Gentamicin:

Die Berechnung des Gehaltes von Streptomycin, Dihydrostreptomycin und Gentamicin erfolgt unter Berücksichtigung der Verdünnung (Faktor 5), aufgrund der quadratischen Kalibriergeraden, mit der Auswertungs-Software LCquan. Prinzipiell ist

es auch möglich, die quadratische Regressionsfunktion manuell mit der großen Lösungsformel, „Mitternachtsgleichung“ zu lösen:

Quadratische Gleichung:

$$ax^2 + bx + c = 0$$

Mitternachtsformel:

$$X_{1,2} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

4. Zusammenfassung

Die Gruppe der β -Lactame (Penicilline und Cephalosporine) sowie die Aminoglycoside werden in der Veterinärmedizin zur Behandlung von bakteriellen Infektionen in großem Umfang als Antiinfektiva eingesetzt. Bezogen auf den Jahresverbrauch in der EU liegen die β -Lactame mit 322 t vor den Aminoglycosiden mit 154 t. Zum Schutz des Verbrauchers und zur Vermeidung von technologischen Problemen bei der Herstellung von Lebensmitteln tierischer Herkunft wurden in der VO (EWG) 2377/90 für 17 β -Lactame und sieben Aminoglycoside EU-weit geltende Höchstmengen (MRL's) festgesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für einen Großteil dieser ionischen, hoch- bis mittelpolaren, nichtflüchtigen und thermolabilen Antiinfektiva quantitative LC-MS/MS-Analysenmethoden unter Einsatz eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers entwickelt. Dabei handelt es sich um eine Multimethode für 15 β -Lactame in Milch, Muskel und Niere von Rindern, um eine Multimethode für 4 Aminoglycoside in Rinderniere und um eine Monomethode für das Cephalosporin Ceftiofur in Milch.

Die Elektrosprayionisation (ESI) erwies sich dabei als geeignete Ionisierungstechnik, um die hoch- bis mittelpolaren Verbindungen in Abhängigkeit des optimalen ESI-Modus als protonierte ($[M+H]^+$) oder deprotonierte ($[M-H]^-$) Quasimolekülonen in die Gasphase zu überführen. Dabei war für das Erreichen einer maximalen Sensitivität die Wahl des optimalen ESI-Modus entscheidend. Die Möglichkeit, diesen Modus unter Berücksichtigung der substanzspezifischen pK_s -Werte sowie des pH-Wertes des zur Chromatographie verwendeten Eluenten mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch Gleichung vorherzusagen, wurde für die β -Lactame beschrieben.

Durch die hochselektive MS/MS Detektion war es für alle entwickelten LC-MS/MS-Methoden möglich, den Aufwand für die Probenaufarbeitung gegenüber anderen, weniger selektiven Analysenverfahren, auf ein nötiges Mindestmaß zu beschränken. Bei der entwickelten LC-MS/MS-Multimethode für die quantitative Bestimmung von 15 β -Lactamen in Milch, Muskel und Niere von Rindern erfolgte die Probenaufarbeitung für alle Matrices mit einem einheitlichen und einfach durchführbaren Extraktions- und Aufreinigungsverfahren. Die Extraktion und Deproteinierung wurde beim natürlichen pH-Wert der Proben, mit dem als „drug releasing solvent“ wirkenden Lösungsmittel Acetonitril, durchgeführt. Die weitere

Extraktaufreinigung fand nach der Lösungsmittelentfernung mit einem einfach durchzuführenden Reversed-Phase SPE-Aufreinigungsschritt an einer Polymerharzphase statt. Ein im Rahmen der Methodenetablierung durchgeführter Vergleich unterschiedlicher Reversed-Phase Sorbentien für die SPE der β -Lactame zeigte, dass die SPE-Kartusche mit dem Polymerharzsorbens gegenüber den SPE-Kartuschen mit C-18 oberflächenmodifiziertem Kieselgel, insbesondere für die Extraktion der amphoteren β -Lactame, am geeignetsten waren.

Auf Basis eines beschriebenen Extraktions- und Derivatisierungsverfahrens wurde erstmals eine LC-MS/MS-Methode für die quantitative Bestimmung von Ceftiofurrückständen in Milch entwickelt. Aufgrund der hohen Selektivität des LC-MS/MS-Systems war es möglich, im Gegensatz zu den konventionellen HPLC-UV-Verfahren, auf zwei von insgesamt drei zeit- und materialintensiven SPE-Aufreinigungsschritten, zu verzichten.

Die einfachste Probenaufarbeitung wurde für die Bestimmung von vier Aminoglycosiden in Rinderniere realisiert, indem die wässrigen Probenextrakte lediglich mittels eines Ultrafiltrationsschrittes aufgereinigt, d.h. deproteiniert wurden.

Als HPLC-Säule wurde für alle entwickelten Methoden eine polar desaktivierte Phenyletherphase verwendet. Diese Phase erwies sich sowohl für die Reversed-Phase Chromatographie der β -Lactame als auch für die Hydrophilic-Interaction-Liquid Chromatographie (HILIC) der Aminoglycoside als universell einsetzbar. Durch die HILIC der Aminoglycoside war es möglich, auf flüchtige fluoridierte Carbonsäuren im Eluenten zu verzichten, die bekanntermaßen zu starken Signalunterdrückungen bei der ESI und zu Verschmutzungen des Massenspektrometers führen.

Die Erzeugung von Gasphasenionen mittels ESI wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Am Beispiel der β -Lactame konnte gezeigt werden, dass steigende Ameisensäurekonzentrationen im Eluenten die Messempfindlichkeit im allgemeinen verringerten. Koeluierende, niedermolekulare Matrix-Koextraktive, die im Gegensatz zu den Standardlösungen in den fertigen Messlösungen der Probenextrakte vorhanden waren, führten für die meisten der zu analysierenden Verbindungen entweder zu Signalunterdrückungen oder Signalerhöhungen auf Seiten der ESI. Diese als Matrixeffekte bezeichneten Phänomene hingen dabei stark von der untersuchten Probenmatrix ab. Letztlich erwies sich das

Standardadditionsverfahren, im Gegensatz zur Auswertung über externe Kalibriergeraden, als geeignet, um die durch Matrixeffekte beeinflussten Verbindungen mit ausreichend hoher Richtigkeit und Präzision zu quantifizieren.

Sowohl die LC-MS/MS-Multimethode für 15 β -Lactame als auch die Monomethode für Ceftiofurrückstände wurden auf Basis der EU-weit geltenden Leistungsmerkmale und Leistungskriterien im Sinne der Kommissionsentscheidung 2002/657/EG validiert. Als Leistungsmerkmale wurden die Wiederholbarkeit, die laborinterne Reproduzierbarkeit sowie die Entscheidungsgrenze und das Nachweisvermögen bestimmt. Aufgrund der Tandem-MS-Möglichkeit (MS/MS) des Massenspektrometers war es möglich, alle Verbindungen unzweifelhaft, entsprechend dem Identifizierungspunktekonzept, zu bestätigen, indem die mit der ESI erzeugten Molekülonen in der Kollisionszelle fragmentiert und für jedes Molekülion zwei diagnostische Fragmentationen detektiert wurden.

Im Rahmen der Methodvalidierung wurde die Lagerstabilität der wässrigen β -Lactam-Stammlösungen überprüft. Dabei zeigte sich, dass das amphotere Ampicillin als einzige Standardverbindung, selbst unter Tiefkühlbedingungen bei -24°C , rasch abbaute. Als Abbauprodukt konnte das Ampicillin-Dimer massenspektrometrisch bestätigt werden. Aufgrund der schlechten Lagerstabilität war es deshalb unumgänglich, wässrige Ampicillin-Stammlösungen vor jeder Analyse frisch herzustellen.

Die Praxistauglichkeit der entwickelten LC-MS/MS-Methoden wurde an insgesamt 24 authentischen Proben, die im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung am CVUA Karlsruhe mittels des Charm II-Tests positiv auf β -Lactame oder Aminoglycoside getestet wurden, überprüft. Dabei war Penicillin G unter den 20 β -Lactam-positiven Proben der am häufigste identifizierte Rückstand. Extreme Höchstmengenüberschreitungen wurden bei den β -Lactam-Rückständen in zwei Rindernierenproben mit $1200\ \mu\text{g}/\text{kg}$ Pen G (24 facher MRL) und $490\ \mu\text{g}/\text{kg}$ Pen G (ca. 10 facher MRL) sowie in zwei Milchproben mit $536\ \mu\text{g}/\text{kg}$ Pen G (134 facher MRL) und $272\ \mu\text{g}/\text{kg}$ Cefquinome (ca. 14 facher MRL) festgestellt. In allen vier nachuntersuchten Rindernierenproben, welche Dihydrostreptomycin-Rückstände enthielten, lagen die Rückstandsgehalte mit 4900 , 7180 , 9130 und $21310\ \mu\text{g}/\text{kg}$ deutlich über dem an sich relativ hohen MRL von $1000\ \mu\text{g}/\text{kg}$.

In einer Studie wurden Milchproben einer an postpartaler Metritis erkrankten und mit dem Cephalosporin Ceftiofurhydrochlorid (Excenel[®] RTU) behandelten Kuh (1 mg je kg Körpergewicht im Abstand von 24 h), mittels der entwickelten LC-MS/MS-Monomethode für Ceftiofurrückstände, untersucht. Eine Wartezeit ist für Milch nicht festgesetzt, d.h. die Milch bleibt während der Behandlung verkehrsfähig. In allen Milchproben, die während der drei Behandlungstage untersucht wurden, konnten Desfuroylceftiofurrückstände bestätigt werden. Die höchsten quantifizierten Gehalte lagen bei ca. 20 µg/kg und damit um den Faktor 5 deutlich unterhalb des MRL von 100 µg/kg. Abschließend wurden die so erhaltenen Ergebnisse mit denen aus einer bereits publizierten Studie zum Ausscheidungsverhalten von Ceftiofur in Milch, nach einer Dosierung von 2,2 mg je kg Körpergewicht im Abstand von 24 h, verglichen. Dabei zeigte sich eine gute Korrelation der Messwerte.

Bei der Entwicklung der LC-MS/MS-Monomethode für Ceftiofurrückstände in Milch zeigte sich, dass die CID-Massenspektren von Ceftiofur und Desfuroylceftiofur Acetamid (DCA), über das die Quantifizierung erfolgt, identisch waren. Da sich die strukturanalogen Verbindungen in nur einem Substituenten des Cephalosporin-grundkörpers unterscheiden, war dies ein Beweis dafür, dass die Fragmentierung nicht durch diesen beeinflusst wird. Bereits publizierte Fragmentierungsmechanismen für Ceftiofur, die den Substituenten mit einbezogen, müssen deshalb in Frage gestellt werden.

Deshalb wurde in dieser Arbeit unter Verwendung eines Triple-Quadrupol- sowie eines Ion-Trap Massenspektrometers, für die intensivsten der beim Kollisionsprozess gebildeten Fragmentationen von Ceftiofur, ein plausibler Fragmentierungsmechanismus postuliert.

5. Abkürzungsverzeichnis

Amox	Amoxicillin
Amp	Ampicillin
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API	Atmospheric Pressure Ionization
APPI	Atmospheric Pressure Photo Ionization
ca.	circa
CC α	Entscheidungsgrenze
CC β	Nachweisvermögen
CE	Kapillarelektrophorese
Cfzn	Cefazolin
Cefo	Cefoperazon
Cefqu	Cefquinome
Ceft	Ceftiofur
Cephal	Cephalonium
Cephalex	Cephalexin
Cephap	Cephapirin
CI	Chemische Ionisation
CID	Collision Induced Dissociation
Clox	Cloxacillin
CRM	Charged Residue Model
CV	Coefficient of Variation, Variationskoeffizient
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCD	DFC-cysteindisulfid
DCMS	Dichlordimethylsilan
DFC	Desfuroylceftiofur
DCI	Direkte Chemische Ionisation
Deceph	Desacetyl-Cephapirin
Dhs	Dihydrostreptomycin
Diclox	Dicloxacillin
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	et alii

EU	Europäische Union
FAB	Fast Atom Bombardment
FLHV	Fleischhygiene-Verordnung
FOA	Ameisensäure (formic acid)
GC	Gaschromatographie/Gaschromatograph
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Gent	Gentamicin C1
h	Stunde
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC-UV	Hochleistungsflüssigchromatographie-Ultraviolett Detektion
IEM	Ion Evaporation Model
IRMPD	Infrared Multiphoton Dissociation
ISP	Ion Spray
IT	Ion Trap
kg	Kilogramm
LC-MS	Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie/Tandem Massenspektrometrie
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenstandegesetz
mg	Milligramm
MRL	Maximum Residue Limit (Höchstmenge)
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion
MW	Molekulargewicht
Naf	Nafcillin
Ng	Nanogramm
NRKP	Nationaler Rückstandskontrollplan
Oxa	Oxacillin
PBP	Penicillin Binding Protein
Pen G	Penicillin G
Pen V	Penicillin V
PWS	Pharmakologisch wirksame Stoffe
RNA	Ribonucleinsäure
m-RNA	Messenger-RNA

tRNA	Transfer-RNA
rRNA	Ribosomale RNA
S	Svedberg-Einheiten
SD _R	Wiederholbarkeit
SD _{wIR}	Laborinterne Reproduzierbarkeit
SIM	Single Ion Monitoring
SL	Lösungsmittel
SPE	Solid Phase Extraction (Fesphasenextraktion)
Spec	Spectinomycin
SRM	Single Reaction Monitoring
Str	Streptomycin
t	Tonne
TSP	Thermospray
UF	Ultrafiltration
US	Ultraschall
μg	Mikrogramm
WDF	Wiederfindung

6. Literaturverzeichnis

- 1 FEDESA Volume sales of antibiotics. Deutsches Tierärzteblatt 11 (1998) 1093
- 2 E.P. Usleber, Professur für Milchwissenschaften, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen, Vorlesung WS 2002
- 3 A.D. Dyan, Veterinary Microbiology 35 (1993) 213
- 4 K.N. Woodward, Vet. Hum. Toxicol. 33 (1991) 168
- 5 A. Fleming, Brit. J. Exp. Pathol. 10 (1929) 226
- 6 E. Chain, H.W. Florey, A.D. Gardner, N.G. Heatley, M.A. Jennings, J. Orr-Ewing, A.G. Sanders, Lancet II (1940) 226
- 7 T.D. Thomson, J.F. Quay, J.A. Webber, JAVMA 10 (1984) 1109
- 8 D. Adam, W. Christ In: W. Forth, D. Henschler, W. Rummel: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim/Wien/Zürich (1987) S. 580
- 9 P. Nuhn, DAZ 48 (2000) 5544
- 10 E. Oberdisse In: E. Oberdisse, E. Hackenthal, K. Kuschinsky: Pharmakologie und Toxikologie, Springer Verlag (1997) S. 614
- 11 B. Granier, M. Jamin, M. Adam, M. Galleni, Methods in Enzymology 244 (1994) 249
- 12 J.L. Strominger, K. Izaki, M. Matsushashi, D.J. Tipper, Fed Proc 26 (1976) 9
- 13 E.L. Miller, J. of Midwifery & Womens's Health 47 (2002) 426
- 14 J.O. Boison, In: H. Oka, H. Nakazawa, K. Harada, J.D. McNeil (Eds.), AOAC International, Arlington, USA (1995) S. 235
- 15 R.E. Hornish, S.F. Kotarski, Current Topics in Medicinal Chemistry 2 (2002) 717
- 16 M.G. Papich, Clinical Pharmacology and Therapeutics 28 (1998) 215
- 17 D.A. Stead, J. Chromatogr. B 747 (2000) 69
- 18 F. Schenk, In: S.B. Turnipseed, A.R. Long (Eds.), Analytical procedures for drug residues in food of animal origin, Science Technology System, West Sacramento, USA (1998), S. 205

-
- 19 C.D.C. Salisbury, In: H. Oka, H. Nakazawa, K. Harada, J.D. McNeil (Eds.), AOAC International, Arlington, USA (1995) S. 307
 - 20 N. Isoherranen, S. Soback, AOAC International 82 (1999) 1017
 - 21 J.B.H. Tok, L. Bi, Current Topics in Medicinal Chemistry 2 (2003) 1001
 - 22 J.R. Lockyer, A. Bucknall, I.C. Shaw, In: N. Haagsma, A. Ruiter (Eds.), Proceedings of the EuroResidue I Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, The Netherlands: Noordwijkerhout (1990) S. 254
 - 23 J.J. Schentag, W.J. Jusko, J.W. Vance, T.J. Cumbo, E. Abrutyn, M. De-Lattre, L.M. Gerbracht, J. Pharmacokinet. Biopharm. 5 (1977) 559
 - 24 R. Willoughby, E. Sheehan, S. Mitrovich, A Global View of LC/MS, Global View Publishing, Pittsburg, PA (1998) S. 30
 - 25 W.M.A. Niessen, J. Chromatogr. A 856 (1999) 179
 - 26 A.P. Bruins, Trends Anal. Chem. 13 (1994) 37
 - 27 D.B. Robb, T.R. Covey, A.P. Bruins, Anal. Chem. 72 (2000) 3653
 - 28 P. Kebarle, L. Tang, Anal. Chem. 65 (1993) 972
 - 29 E.M. Thurmann, I. Ferrer, D. Barcelo, Anal. Chem. 73 (2001) 5441
 - 30 J. Sunner, G. Nicol, P. Kebarle, Anal. Chem. 60 (1988) 1300
 - 31 D.N. Heller, D.A. Kaplan, N.G. Rummel, J von Bredow, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 6030
 - 32 D.M. Holstege, B. Puschner, G. Whithead, F.D. Galey, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 406
 - 33 C.K. Fagerquist, A.R. Lightfield, Rapid Commun. Mass Spectrom. 17 (2003) 660
 - 34 L.G. McLaughlin, J.D. Henion, P.J. Kijak, Biol. Mass Spectrom. 23 (1994) 417
 - 35 C.M. Whitehouse, R.N. Dreyer, M. Yamashita, J.B. Fenn, Anal. Chem. 57 (1985) 675
 - 36 A.P. Bruins, T.R. Covey, J.D. Henion, Anal. Chem. 59 (1987) 2642
 - 37 M.G. Ikonomidou, A.T. Blades, P. Kebarle, Anal. Chem. 62 (1990) 957
 - 38 M.G. Ikonomidou, A.T. Blades, P. Kebarle, Anal. Chem. 63 (1991) 1989
 - 39 L. Tang, P. Kebarle, Anal. Chem. 63 (1991) 2709

-
- 40 L. Tang, P. Kebarle, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3654
- 41 P. Kebarle, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 804
- 42 C.G. Enke, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4885
- 43 A. Raffaelli, In: R.M. Caprioli et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherland (1997) S. 17
- 44 A.P. Bruins, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 345
- 45 R.B. Cole, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 763
- 46 J. Abian, A.J. Oosterkamp, E. Gelpi, *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 244
- 47 M. Gamero-Castano, J.F. de la Mora, *Analytica Chimica Acta* 406 (2000) 67
- 48 M. Gamero-Castano, J.F. de la Mora, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 790
- 49 J. Fernandez de la Mora, *Analytica Chimica Acta* 406 (2000) 93
- 50 Ma'an H. Amad, N.B. Cech, G.S. Jackson, C.G. Enke, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 784
- 51 R. Kostianen, T. Kotiaho, T. Kuuranne, S. Auriola, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 357
- 52 K. Cammann, In: K. Cammann: *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin (2001) S. 5-71
- 53 P. Fürst In: N. Haagsma, A. Ruiter (Eds.), *Proceedings of the EuroResidue IV Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food*, The Netherlands: Veldhoven (2000) S. 63
- 54 K.L. Tyczkowska, R.D. Voyksner, A.L. Aronson, *J. Chromatogr.* 490 (1989) 101
- 55 K.L. Tyczkowska, R.D. Voyksner, A.L. Aronson, *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 14 (1991) 51
- 56 R. D. Voyksner, *J. Chromatogr.* 567 (1991) 389
- 57 K. L. Tyczkowska, R. D. Voyksner, K. L. Anderson, A. L. Aronson, *L. J. Chromatogr. B.* 614 (1993) 123
- 58 R. F. Straub, R. D. Voyksner, *J. Chromatogr.* 647 (1993) 167
- 59 J.O.K. Boison, L.J.-Y. Keng, J.D. MacNeil, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 77 (1994) 565

-
- 60 R. Straub, M. Linder, R.D. Voyksner, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3651
- 61 K.L. Tyczkowska, R.D. Voyksner, R.F. Straub, A.L. Aronson, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 77 (1994) 1122
- 62 J. Keever, R.D. Voyksner, K.L. Tyczkowska, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 57
- 63 D.N. Heller, M.A. Ngoh, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 12 (1998) 2031
- 64 R.D. Voyksner, H. Lee, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1427
- 65 E. Daeseleire, H. De Ruyck, R. Van Renterghem, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 1404
- 66 S. Riediker, J.M. Diserens, R.H. Stadler, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4171
- 67 S. Riediker, R.H. Stadler, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1614
- 68 F. Bruno, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 3463
- 69 D. Hurtaud, B. Delepine, P. Sanders, *Analyst* 119 (1994) 2731
- 70 D. Hurtaud-Pessel, B. Delepine, In: N. Haagsma, A. Ruiter (Eds.), *Proceedings of the EuroResidue III Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food*, University of Utrecht, Utrecht (1996) S. 526
- 71 V. Hormazabal, M. Yndestad, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 21 (1998) 3099
- 72 C.Y.W. Ang, F.F. Liu, J.O. Lay, W. Luo, K. McKim, T. Gehring, R. Lochmann, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1673
- 73 Y. Ito, Y. Ikai, H. Oka, H. Matsumoto, Y. Miyazaki, K. Tabeka, H. Nagase, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 217
- 74 S. De Baere, M. Cherlet, K. Baert, P. De Backer, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1393
- 75 W.J. Blanchflower, S.A. Hewitt, D.G. Kennedy, *Analyst* 119 (1994) 2595
- 76 M.C. Carson, D.N. Heller, *J. Chromatogr. B* 718 (1998) 95
- 77 D.N. Heller, S.B. Clark, H.F. Richter, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 39
- 78 L.G. McLaughlin, J.D. Henion, *J. Chromatogr.* 59 (1992) 195
- 79 R. E. Hornish, J. R. Wiest, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 123
- 80 M. Cherlet, S. De Baere, P. De Backer, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 1342
- 81 Z. Yuan, H.Q. Russlie, D.M. Canafax, *J. Chromatogr. B.* 692 (1997) 361

-
- 82 W.A. Moats, R. Harik-Khan, J. AOAC Int. 78 (1995) 49
- 83 W.A. Moats, R.D. Romanowski, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 1410
- 84 W.A. Moats, R.D. Romanowski, J. Chromatogr. A. 812 (1998) 237
- 85 Chih-Chun Hong, Chin-Lan Lin, Chin-En Tsai, F. Kondo, Am. J. Vet. Res. 56 (1995) 297
- 86 Y. Ito, Y. Ikai, H. Oka, H. Matsumoto, T. Kagami, K. Takeba, J. Chromatogr. A. 880 (2000) 85
- 87 L.K. Sorensen, L.K. Snor, J. Chromatogr. A. 882 (2000) 145
- 88 L.K. Sorensen, L.K. Snor, T. Elkaer, H. Hanson, J. Chromatogr. B. 734 (1999) 307
- 89 K. Tyczkowska, A. Aronson, J. AOAC Int. 71 (1988) 773
- 90 K. Tabeka, K. Fujinuma, T. Miyazaki, H. Nakazawa, J. Chromatogr. A. 812 (1998) 205
- 91 Z. Yongxin, A. Verhasselt, E. Roets, A. Perez, E. Porqueras, J. Hoogmartens, J. Chromatogr. A. 773 (1997) 147
- 92 J.A. Tarbin, W.H.H. Farrington, G. Shearer, Analytika Chimica Acta 318 (1995) 95
- 93 S. Lihl, A. Rehorek, M. Petz, J. Chromatogr. A. 729 (1996) 229
- 94 W.M.A. Niessen, J. Chromatogr. A. 856 (1999) 179
- 95 M. Okamoto, K. Jinno, J. Chromatogr. 395 (1987) 171
- 96 H.-S. Huang, J.-R. Wu, M.-L. Chen, J. Chromatogr. 564 (1991) 195
- 97 A.A. Petrauskas, V.K. Svedas, J. Chromatogr. 585 (1991) 3
- 98 J.F. Banks, S. Shen, C.M. Whitehouse, J.B. Fenn, Anal. Chem. 66 (1994) 406
- 99 J.P. Hou, J.W. Poole, J. Pharm. Sci. 60 (1971) 503
- 100 Cephalosporins, Veterinary-Systemic, Micromedex (2000) www.usp.org/veterinary
- 101 SPARC, On-Line Calculator, <http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc>, Wert entstammt der Datenbank des Kalkulationsprogrammes, Quelle: E.P. Serjeant, B. Dempsey, IUPAC Chemical Data Series
- 102 K. Hartke, H. Hartke, E. Mutschler, G. Rücker, M. Wichtl, Cefazolin-Natrium, Kommentar zum Europäischen Arzneibuch, 14. Lieferung (2001) C27/065

-
- 103 Merck Index (1999) Monographie Nummer 2025
- 104 SPARC, On-Line Calculator, <http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc>
- 105 Committee for Veterinary Medicinal Products (2003) Cefquinome, Summary Report (3), In: The European agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA/MRL/883/03-Final, EMEA, London
- 106 S. Rabbolini, E. Verardo, M. Da Col, A. M. Gioacchini, P. Traldi, Rapid. Commun. Mass Spectrom. 12 (1998) 1820
- 107 B.A. Mansoori, D.A. Volmer, R.K. Boyd, Rapid Commun. Mass Spectrom. 11 (1997) 1120
- 108 D.A. Volmer, B. Mansoori, S.J. Locke, Anal. Chem. 69 (1997) 4143
- 109 M. Jemal, Biomed. Chromatogr. 14 (2000) 422
- 110 G.J. Van Berkel, J. Mass Spectrom. 35 (2000) 773
- 111 G. J. Van Berkel, F. Zhou, J. T. Aronson, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process 162 (1997) 55
- 112 C.L. Gatlin, F. Turecek, Anal. Chem. 66 (1994) 712
- 113 R.J. McCracken, D.E. Spence, D.G. Kennedy, Food Additives and Contaminants 17 (2000) 907
- 114 W.A. Moats, R.D. Romanowski, M.B. Medina, J. AOAC Int. 81 (1998) 1135
- 115 W.A. Moats, J. AOAC Int. 82 (1999) 1071
- 116 K. Takeba, K. Fujinuma, T. Miyazaki, H. Nakazawa, J. Chromatogr. A. 812 (1998) 205
- 117 H.-E. Gee, K.-B. Ho, J. Toothill, J. AOAC Int. 79 (1996) 640
- 118 R. Harik-Khan, W.A Moats, J. AOAC Int. 78 (1995) 978
- 119 W. A. Moats, J. AOAC Int. 77 (1994) 41
- 120 J.E. Hutchins, K. Tyczkowska, A.L. Aronson, J. AOAC Int. 69 (1986) 757
- 121 T. Nagata, M. Saeki, J. AOAC Int. 69 (1986) 448
- 122 M.D. Rose, J. Bygrave, W.H.H. Farrington, G. Shearer, Analyst 122 (1997) 1095
- 123 V. Hormazabal, M. Yndestad, J. Liq. Chromatogr. 18 (1995) 2467

-
- 124 M.D. Rose, J. Tarbin, W.H.H. Farrington, G. Shearer, *Food Additives and Contaminants* 14 (1997) 127
- 125 L.K. Sorensen, H. Hansen, L. Snor, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1345
- 126 L.K. Sorensen, B.M. Rasmussen, J.O. Boison, L. Keng, *J. Chromatogr. B.* 694 (1997) 383
- 127 P. Kubalec, E. Brandsteterova, A. Bednarikova, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 205 (1997) 85
- 128 W. Luo, E.B. Hansen, C.Y.W. Ang, J. Deck, J.P. Freeman, H.C. Thompson, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1264
- 129 J.O. Boison, C.D.C. Salisbury, W. Chan, J.D. MacNeil, *J. AOAC Int.* 74 (1991) 497
- 130 S. De Baere, M. Cherlet, P. De Backer In: N. Haagsma, A. Ruiter (Eds.), *Proceedings of the EuroResidue IV Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, The Netherlands: Veldhoven (2000)* S. 271
- 131 W. Luo, C.Y. W. Ang, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 20
- 132 C.Y.W. Ang, W. Luo, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 25
- 133 W. Luo, C.Y.W. Ang, H.C. Thompson, *J. Chromatogr B.* 694 (1997) 401
- 134 C.Y.W. Ang, W. Luo, E.B. Hansen, J.P. Freeman, H.C. Thompson, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 389
- 135 S.A. Barker, A.R. Long, C.R. Short, *J. Chromatogr.* 475 (1989) 353
- 136 M. McGrane, M. O'Keeffe, M.R. Smyth, *Analyst* 123 (1998) 2779
- 137 J. Blanchard, *J. Chromatogr.* 226 (1981) 455
- 138 K.L. Tyczkowska, R.D. Voyksner, A.L. Aronson, *J. Chromatogr.* 594 (1992) 195
- 139 S. Lihl (1995) Dissertation Universität GH Wuppertal
- 140 M. Preu (1999) Dissertation Universität GH Wuppertal
- 141 E Verdon, P. Couedor. *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1083
- 142 J.O. Boison, L.J.-Y. Keng, *J. AOAC Int.* 81 (1998) 1267
- 143 J.O. Boison, L.J.-Y. Keng, *J. AOAC Int.* 81 (1998) 1113
- 144 E. Verdon, P. Couedor, *J. Chromatogr. B.* 705 (1998) 71

-
- 145 U. Meetschen, M. Petz, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 193 (1991) 337
- 146 Firmenschrift Waters
- 147 Firmenschrift Macherey & Nagel
- 148 J. Henion, E. Brewer, G. Rule, Analytical Chemistry News & Features 1 (1998) 650
- 149 J. Hajslova, J. Zrostlikova, J. Chromatogr. A. 1000 (2003) 181
- 150 I. Fu, E. J. Woolf, B.K. Matuszewski, J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1998) 347
- 151 B.K. Choi, A.I. Gusev, D.M. Hercules, Anal. Chem. 71 (1999) 4107
- 152 B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Anal. Chem. 70 (1998) 882
- 153 D.L. Buhrmann, P.I. Price, P.J. Rudewicz, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 7 (1996) 1099
- 154 W. Hammes, C. Bourscheid, U. Büchsler, G. Stodt, H. Bökens, J. Mass Spectrom. 35 (2000) 378
- 155 R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, Rapid Commun. Mass Spectrom. 13 (1999) 1175
- 156 B.P.-Y. Lau, P.M. Scott, D.A. Lewis, S.R. Kanhere, J. Mass Spectrom. 35 (2000) 23
- 157 C.H.P. Bruins, C.M. Jeronimus-Stratingh, K. Ensing, W. D. van Dongen, G. J. de Jong, J. Chromatogr. A. 863 (1999) 115
- 158 D.J. Borts, L.D. Bowers, J. Mass Spectrom 35 (2000) 50
- 159 C. Müller, P. Schäfer, M. Störtzel, S. Vogt, W. Weinmann, J. Chromatogr. B. 773 (2002) 47
- 160 R. Kitamura, K. Matsuoka, E. Matsushima, Y. Kawaguchi, J. Chromatogr. B. 754 (2001) 113
- 161 R. Pascoe, J.P. Foley, A.I. Gusev, Anal. Chem. 73 (2001) 6014
- 162 B.K. Choi, D.M. Hercules, A.I. Gusev, Fresenius J. Anal. Chem. 369 (2001) 370
- 163 G.S. Rule, A.V. Mordehai, J. Henion, Anal. Chem. 66 (1994) 230
- 164 M. Preu, M. Petz, Analyst (1998) 2785

-
- 165 J. Schlösser, A. Mehlich, F. Ballwanz, M. Petz, Fresenius J. Anal. Chem. (1998) 498
- 166 Committee for Veterinary Medicinal Products (2001) Cephapirin, Summary Report (2), In: The European agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA/MRL/745/00-Final, EMEA, London
- 167 W.A. Moats, K.L. Anderson, J.E. Rushing, S. Buckley, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 498
- 168 L. Grunwald, M. Petz, Analytica Chimica Acta 483 (2003) 73
- 169 H. Köhler-Schmidt, G. Bohn, L. Acker, Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 36 (1982) 107
- 170 A. Ibach (1995) Dissertation Universität GH Wuppertal
- 171 D. Guggisberg, A.E. Moser, H. Koch, Mitt. Lebensm. Hyg. 94 (2003) 70
- 172 S. Yakkundi, A. Cannavan, C.T. Elliott, T. Lövgren, D.G. Kennedy, J. Chromatogr. B 788 (2003) 29
- 173 P.S. Jaglan, F.S. Yein, R.E. Hornish, B.L. Cox, T.S. Arnold, R.D. Roof, T.J. Gilbertson, J. Dairy Sci. 75 (1992) 1870
- 174 S.C. Olson, M.G. Beconi-Barker, E.B. Smith, R.A. Martin, T.J. Vidmar, L.D. Adams, J. Vet. Pharmacol. Therap. 21 (1998) 112
- 175 R.E. Hornish, P.J. Hamlow, S.A. Brown, J. AOAC Int. 86 (2003) 30
- 176 T.J. Gilbertson, R.D. Roof, J.L. Nappier, M.J. Zaya, R.H. Robins, D.J. Stuart, L.F. Krzeminski, P.S. Jaglan, J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 229
- 177 M.G. Beconi-Barker, K.L. Davison, R.E. Hornish, T.S. Arnold, A.L. Craigmill, T.J. Gilbertson, E.B. Smith, T.J. Vidmar, G.A. Hoffman, C.L. Gatchell, J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 1589
- 178 M.G. Beconi-Barker, E.B. Smith, T.S. Arnold, R.E. Hornish, T.J. Vidmar, C.L. Gatchell, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 2606
- 179 M.G. Beconi-Barker, R.D. Roof, L. Millerioux, F.M. Kausche, T.J. Vidmar, E.B. Smith, J.K. Callahan, V.L. Hubbard, G.A. Smith, T.J. Gilbertson, J. Chromatogr. B. 673 (1995) 231
- 180 P.S. Jaglan, B.L. Cox, T.S. Arnold, M.F. Kubicek, D.J. Stuart, T.J. Gilbertson, J. AOAC Int. 73 (1990) 26
- 181 S.A. Brown, B.J. Hanson, A. Mignot, L. Millerioux, P.J. Hamlow, V.L. Hubbard, J.K. Callahan, F.M. Kausche, J. vet. Pharmacol. Therap. 22 (1999) 35

-
- 182 E.J. Robb, F.M. Kausche, A.P. Belschner, *Int. Dairy Federation Special Issue* 5 (1995) 195
- 183 L.A. Mitscher, H.D. Hollis Showalter, K. Shirahata *J. Antibiot.* 28 (1975) 668
- 184 F.M. Lagerwerf, W.D. van Dongen, R.J.J.M. Steenvoorden, M. Honing, J.H.G. Jonkman, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 418
- 185 A. Apffel, S. Fischer, G. Goldberg, P.C. Goodley, F.E. Kuhlmann, *J. Chromatogr. A.* 712 (1995) 177
- 186 R. Dams, T. Benijts, W. Günther, W. Lambert, A. De Leenheer, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 1072
- 187 A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177
- 188 V.V. Tolstikov, O. Fiehn, *Analytical Biochemistry* 301 (2002) 298
- 189 D.S. Risley, M.A. Strege, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1736
- 190 H. Schlichtherle-Cerny, M. Affolter, C. Cerny, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2349
- 191 S.C. Churns, *J. Chromatogr. A.* 720 (1996) 75
- 192 A.J. Alpert, M. Shukla, A.K. Shukla, L.R. Zieske, S.W. Yuen, M.A.J. Ferguson, A. Mehlert, M. Pauly, R. Orlando, *J. Chromatogr. A.* 676 (1994) 191
- 193 M. McGrane, H.J. Keukens, M.O'Keeffe, J.A. Rhijin, M. Smyth, In: N. Haagsma, A. Ruiter (Eds.), *Proceedings of the EuroResidue IV Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food*, The Netherlands: Veldhoven (2000) S. 765
- 194 G.C. Gerhardt, C.D.C. Salisbury, J.D. MacNeil, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 334
- 195 H. Abbasi, K.E. Hellenäs, *Analyst* 123 (1998) 2725
- 196 P. Edder, A. Cominoli, C. Corvi, *J. Chromatogr. A.* 830 (1999) 345
- 197 M.A. Fennell, C.E. Uboh, R.W. Sweeney, L.R. Soma, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995)
- 198 *Europäisches Arzneimittelbuch*, 4. Ausgabe, Grundwerk 2002, Band 2, Wasserfreies Ampicillin S. 1201
- 199 Committee for Veterinary Medicinal Products (2000) Streptomycin, Dihydrostreptomycin, Summary Report (2), In: *The European agency for the Evaluation of Medicinal Products*, EMEA/MRL/728/00-Final, EMEA, London