

# **Untersuchungen zur Analytik und zum Einfluss technologischer Prozesse auf Penicillinrückstände in Milch**

Vom Fachbereich Chemie  
der Bergischen Universität Gesamthochschule Wuppertal  
zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigte Dissertation

von

Ludger Grunwald

Wuppertal  
2002

## Abstract

Mastitis arising in milk cattle causes great economical damage. For treating infected animals special preparations, preferably penicillins, are injected directly into the milk channel of the cow in order to obtain a sufficiently high concentration of the antibiotic in the udder. As a consequence of such a medication, the active substances are excreted with the milk for a certain period of time after application.

Four cows suffering from mastitis were treated with Eumacid, a common veterinary drug for mastitis therapy with cloxacillin as active compound. The residue depletion via milk was studied with four qualitative microbiological or immunochemical screening tests (Delvotest SP<sup>®</sup>, BR-AS special<sup>®</sup>, Penzym S<sup>®</sup> test and Snap<sup>®</sup> test) in comparison with an automated quantitative HPLC method to investigate how good the results from these tests correlate and if they allow the detection of cloxacillin concentrations at or near the MRL value. Data analysis shows excellent correlation between all four qualitative tests and also in comparison with the quantitative HPLC results.

For the penicillin nafcillin a new maximum residue limit of 30 µg/kg for milk was established by the European Commission. Flucloxacillin is a penicillin used in human medicine. An automated reversed-phase liquid chromatographic method with UV detection at 300 nm after on-line coupled solid-phase extraction and photochemical post-column derivatization for oxacillin, cloxacillin and dicloxacillin, was extended to include nafcillin and flucloxacillin. This modified method allows a simultaneous analysis of isoxazolyl penicillins and nafcillin or flucloxacillin in one sample. The detection limits were 10 µg/kg for nafcillin and 8 µg/kg for flucloxacillin. The recovery was 67 % for both antibiotics with coefficients of variation of 9 % for nafcillin and 6 % for flucloxacillin.

Milk samples spiked with benzylpenicillin and cloxacillin at and above maximum residue limit concentrations were used to produce yoghurt according to the typical industrial process. As expected coagulation was negatively influenced by increasing concentrations of residual penicillins. On the other hand the concentration of the penicillins was reduced due to various parameters of the production process. The temperature during heat treatment (90 °C, 15 min) of the milk before the yoghurt cultures were added, the fermentation time and temperature, and the influence of the starter cultures proved to be main factors leading to a decrease of residual penicillins. Main degradation products of penicillin G as identified by LC-MS/MS were penicillic, penicilloic, and penilloic acid.

To investigate penicillin-binding to milk proteins, a dialysis was performed to eliminate unbound penicillins. Afterwards the donor solutions were tested by indirect competitive ELISA, which utilized antibodies being sensitive to penicillins with intact as well as hydrolysed beta-lactam ring, to determine the amount of penicillins. 1.5 % of ampicillin, 5 % of penicillin G, and 20 % of cloxacillin were bound to milk proteins.

## *Dank*

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 1999 bis September 2002 an der Bergischen Universität Gesamthochschule Wuppertal im Fachbereich Chemie, Arbeitsgruppe Lebensmittelchemie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Michael Petz.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Petz für die Überlassung des Themas zur weitgehend selbständigen Bearbeitung und für die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt des weiteren Frau Dr. G. Suhren und Frau Dr. K. Knappstein vom Institut für Hygiene und Produktsicherheit der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel für die Herstellung lyophilisierter Rohmilchproben und die Durchführung der Screening Tests.

Danken möchte ich Herrn Dr. Franz und Herrn Dr. Stier vom Chemischen Landes- und Veterinäruntersuchungsamt, Karlsruhe, für die Möglichkeit der LC-MS/MS-Messungen. Insbesondere Herrn M. Becker gilt mein Dank für die Hilfestellung bei den Messungen.

Frau F. Reinhold, Frau S. Goschko und Herrn R. Hilicke danke ich für die unterstützenden, im Rahmen einer studentischen Projektaufgabe durchgeführten, Arbeiten.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen für die gute Zusammenarbeit und das exzellente Arbeitsklima aussprechen. Insbesondere Herrn G. Cacciatore und Herrn Dr. J. Schlösser danke ich für viele konstruktive fachliche Diskussionen. Frau Dr. E. Müller-Seitz danke ich für hilfreiche Anregungen, der Hilfestellung bei verdeckten Kontrollanalysen und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich meiner Frau ein besonderes Dankeschön für ihre stetige Geduld und ständige große Unterstützung widmen.



---

<b>1</b>	<b>THEORETISCHER TEIL</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Penicilline</b>	<b>2</b>
1.2.1	Geschichte	2
1.2.2	Eigenschaften	3
1.2.2.1	Struktur	3
1.2.2.2	Therapeutisches Wirkungsspektrum	3
1.2.2.3	Abbaureaktionen durch nucleophilen und elektrophilen Angriff	5
1.2.3	Wirkungsmechanismus und Resistenzbildung	8
1.2.3.1	Wirkungsmechanismus	8
1.2.3.2	Resistenz	10
1.2.4	Pharmakokinetik	11
1.2.5	Penicillin-Allergie	11
1.2.6	Reaktion mit Proteinen	13
1.2.7	Bildung von Penicillin-Polymeren	14
1.2.8	Anwendung in der Veterinärmedizin	16
1.2.9	Rückstandsanalytik	17
1.2.9.1	Screening Tests	17
1.2.9.2	Chemisch-physikalische Trennmethode	19
1.2.10	Höchstmengenregelungen	23
<b>1.3</b>	<b>Milch und Joghurt</b>	<b>24</b>
1.3.1	Milch	24
1.3.2	Joghurt	25
1.3.3	Joghurtkulturen und Antibiotika	29
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>Vergleich unterschiedlicher Screening-Methoden mit quantitativer HPLC für die Penicillinanalytik in der Milch erkrankter, behandelter Kühe</b>	<b>33</b>

---

<b>2.2</b>	<b>Methodenentwicklung zur Bestimmung von Penicillinen mittels elektrochemischer Detektion</b>	<b>39</b>
<b>2.3</b>	<b>Methodenentwicklung für die Bestimmung von Nafcillin und Flucloxacillin in Milch</b>	<b>45</b>
2.3.1	UV-Absorptionsspektren	46
2.3.2	Bestimmung der Qualitätskenndaten für die Bestimmung von Nafcillin und Flucloxacillin mittels HPLC-Schnellmethode	47
2.3.2.1	Linearität	48
2.3.2.2	Richtigkeit und Präzision	49
2.3.2.3	Verfahrensvariationskoeffizient	50
2.3.2.4	Nachweisgrenze	51
2.3.2.5	Beispielchromatogramm für die Bestimmung von Nafcillin in Milch	51
2.3.2.6	Qualitätssicherung durch verdeckte Analysen	52
2.3.3	Analyse von Flucloxacillin in Humanmilch	54
<b>2.4</b>	<b>Einfluss von technologischen Prozessen auf Penicillinrückstände in Milch und Joghurt</b>	<b>56</b>
2.4.1	Stabilität von Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin bei Erhitzung in Milch	56
2.4.2	Antibakterieller Effekt der Penicilline	58
2.4.3	Einfluss der Joghurtfermentation auf Penicillinrückstände in Milch	59
2.4.3.1	Überblick	59
2.4.3.2	Einfluss der Starterkulturen, Fermentationszeit und -temperatur auf die Stabilität von Penicillin G und Cloxacillin	60
2.4.3.3	Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität von Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin ohne Starterkulturen	62
2.4.3.4	Einfluss der Proteinfällung auf die Stabilität von Penicillin G und Cloxacillin ohne Starterkulturen	64
2.4.3.5	Zusammenfassende Betrachtung	65
2.4.4	Abbauprodukte aus Penicillinrückständen bei der lebensmitteltechnologischen Behandlung von Milch und in Joghurt	65
<b>2.5</b>	<b>Bestimmung des Bindungsanteils von Penicillinen an Milchproteine</b>	<b>71</b>

---

<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>77</b>
3.1	Vergleich unterschiedlicher Screening-Methoden mit quantitativer HPLC für die Penicillinanalytik	77
3.2	Methodenentwicklung zur Bestimmung von Penicillinen mittels elektrochemischer Detektion	79
3.3	Methode zur Bestimmung von Nafcillin und Flucloxacillin in Milch	82
3.4	Einfluss von technologischen Prozessen auf Penicillinrückstände in Milch und Joghurt	85
3.4.1	Darstellung der Problematik	85
3.4.2	Stabilität von Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin bei der Erhitzung von Milch	86
3.4.3	Einfluss der Joghurtkulturen auf Penicillinrückstände in Milch	87
3.4.4	Entstehung von Abbauprodukten von Penicillinrückständen in Milch durch technologische Prozesse	90
3.5	Bindung von Penicillinen an Milchproteine	93
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>96</b>
<b>5</b>	<b>ARBEITSVORSCHRIFTEN UND METHODEN</b>	<b>99</b>
5.1	Screening-Tests	99
5.2	Flüssigchromatographie (HPLC)	100
5.2.1	Chemikalien und Reagenzlösungen	100
5.2.1.1	Allgemeine Chemikalien	100
5.2.1.2	Reagenzienlösungen und Puffer	100
5.2.2	Geräte und Hilfsmittel	103
5.2.3	Chromatographische Ausrüstung (HPLC)	103
5.2.4	Durchführung der Analysen	104
5.2.5	Überprüfung der Methode zur Bestimmung von Cloxacillin in Joghurtproben	106
5.3	Charm <sup>®</sup> II-Test	106

---

5.3.1	Chemikalien und Hilfsmittel	106
5.3.2	Geräte	107
5.3.3	Durchführung der Analysen	107
5.3.4	Überprüfung der Charm <sup>®</sup> II-Methode zur Bestimmung von Cloxacillin und Penicillin G in Joghurtproben	108
5.3.4.1	Cloxacillin	108
5.3.4.2	Penicillin G	110
<b>5.4</b>	<b>Joghurtfermentation</b>	<b>111</b>
<b>5.5</b>	<b>LC-MS/MS System</b>	<b>113</b>
5.5.1	Geräte	113
5.5.2	Durchführung der Analysen	114
<b>5.6</b>	<b>ELISA-Technik</b>	<b>116</b>
5.6.1	Allgemeine Chemikalien und Geräte	116
5.6.2	Reagenzienlösungen und Puffer	117
5.6.3	Durchführung der Analysen	118
5.6.4	Durchführung des indirekten kompetitiven ELISA	120
5.6.4.1	Zweidimensionaler ELISA	120
5.6.4.2	Aufnahme von Standardkurven	120
5.6.4.3	Durchführung des ELISA-Tests	121
<b>5.7</b>	<b>Verwendete Software</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>163</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>166</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>167</b>



---

# 1 Theoretischer Teil

## 1.1 Einleitung

Penicilline gehören zusammen mit Cephalosporinen zur Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Ihnen liegt das gemeinsame Strukturmerkmal des  $\beta$ -Lactamringes zugrunde. Den Penicillinen ist die Grundstruktur der 6-Aminopenicillansäure (6-APA) gemeinsam [Schröder et al., 1982]. Penicilline sind seit etwa 50 Jahren in der Veterinär- und Humanmedizin von großer Bedeutung. So wurden im Jahr 1997 allein in der Europäischen Union (EU) 225 t Penicilline an Tiere verabreicht [FEDESA, 1998]. Wichtige Vertreter in der Veterinärmedizin sind Benzylpenicillin (Pen G), Ampicillin (Amp), Amoxicillin (Amox) und die Isoxazolylpenicilline Oxacillin (Oxa), Cloxacillin (Clox) und Dicloxacillin (Dclx).

Eines der größten Anwendungsgebiete für Penicilline stellt die Erkrankung des Milchviehs an Mastitis (Entzündung der Milchdrüse) dar, die zum Großteil durch Gram-positive Bakterien ausgelöst wird. Mastitis verursachte 1993 in Deutschland nach Schätzungen der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) einen volkswirtschaftlichen Schaden von ca. 1 Mrd. € [DVG, 1994]. Im selben Jahr betrug der Umsatz für antimikrobiell wirksame Substanzen für die Mastitisbehandlung von Kühen weltweit 275 Mio. € [Miller, 1995]. Ohne antimikrobielle Behandlung kann Mastitis zum Tod der betroffenen Tiere führen. Zur Behandlung werden Mastitispräparate meist direkt in den Milchkanal der Kuh injiziert, um eine ausreichend hohe Konzentration des Antibiotikums zu erzielen. Dies hat zur Folge, dass die betreffenden Wirkstoffe primär mit der Milch wieder ausgeschieden werden, auch über einen längeren Zeitraum nach der Applikation. Zum Schutz des Verbrauchers und zur Vermeidung von Störungen bei der weiteren technologischen Bearbeitung von Milch sind daher Rückstandshöchstmengen (Maximum Residue Limit - MRL) für sieben zur Zeit von der EU zugelassene Penicilline in der Verordnung EWG/2377/90 festgelegt [VO EWG/2377/90, 1990]. Daher benötigen die Milchindustrie, die amtliche Überwachung sowie Handelslaboratorien geeignete Nachweis- und Quantifizierungsmöglichkeiten für Penicillinrückstände in Milch. In dieser Dissertation werden in einer Studie etablierte Screening-Tests untereinander und zusätzlich mit einer quantitativen HPLC-Methode

verglichen. Außerdem wurde eine Methode zur Quantifizierung der Penicilline Nafcillin und Flucloxacillin entwickelt.

Die Codex Alimentarius Kommission der Food and Agriculture Organization (FAO) und der World Health Organization (WHO) der Vereinten Nationen hat in ihrer Stellungnahme zur 13. Sitzung des Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food dargelegt, dass die Notwendigkeit besteht, den Einfluss von technologischer Bearbeitung auf Rückstände wie Penicillin verstärkt zu untersuchen [Codex Alimentarius Commission, 2001].

Von Interesse ist dabei ein möglicher Rückgang an Penicillinen bei der Verarbeitung, u.a. der Joghurtproduktion unter Einfluss von Temperatur und Milchsäurebakterien sowie die Identifizierung der gebildeten Abbauprodukte der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Auf diesen Aspekt wird anhand von Untersuchungen zum technologischen Prozess der Joghurtproduktion eingegangen. Die Arbeit zeigt den Einfluss von Starterkulturen, pH-Wert-Änderung, Zeit und Temperatur auf. Mittels LC-MS/MS wurden entstehende Abbauprodukte der Penicilline identifiziert. Der Anteil der Bindungen zwischen Milchproteinen und Penicillinen wurde bestimmt.

## 1.2 Penicilline

### 1.2.1 Geschichte

Bereits 1872 beobachtete der Arzt Joseph Lister, dass ein *Penicillium glaucum*-Extrakt das Wachstum von Bakterien in menschlichem Gewebe hemmt [Selwyn, 1979].

Als Entdecker des Antibiotikums Penicillin gilt Alexander Fleming. Ihm gelang es 1928 aus dem Extrakt des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* eine antibiotisch wirksame Substanz zu gewinnen, die er Penicillin nannte [Fleming, 1929]. Im Jahr 1940 entwickelte dann die Arbeitsgruppe um Florey und Chain ein applizierbares Medikament [Chain et al., 1940] und 1943 wurde von Chain und Abraham die Struktur des  $\beta$ -Lactamsystems veröffentlicht [zitiert in: Clarke et al., 1949].

Seit 1960 ist die Herstellung von 6-APA aus Benzylpenicillin mittels Penicillinamidase möglich. Damit wurde die Herstellung von heute über 10.000 halbsynthetischen Penicillinen mit verschiedenen Seitenketten ermöglicht [Schröder et al., 1982].

---

## 1.2.2 Eigenschaften

### 1.2.2.1 Struktur

Als gemeinsames Grundgerüst besitzen die Penicilline die 6-APA, ein bicyclisches Dipeptid aus den Aminosäuren Cystein und Valin. Sie besteht aus einem  $\beta$ -Lactam-Ring (Azetidin-2-on) und einem Thiozolidin-Ring [Hauptmann, 1991; Hou und Poole, 1971]. Die verschiedenen natürlichen und halbsynthetischen Penicilline unterscheiden sich vor allem in der Seitenkette, welche durch Kondensationsreaktion zwischen einer Carbonsäure und der Aminogruppe in 6-Stellung der 6-APA hergestellt werden [van Krimpen et al., 1987; McGregor, 1984]. Durch die Variation der Seitenkette lassen sich die Eigenschaften des Penicillins wie Säureempfindlichkeit, Resorptionseigenschaft bei oraler Gabe und Empfindlichkeit gegenüber Penicillinasen verändern sowie die Ausdehnung der Wirksamkeit auch auf Gram-negative Keime erreichen [Mutschler, 1986]. Abbildung 1 zeigt die 6-APA als Grundstruktur der Penicilline, Abbildung 2 die Seitenketten der wichtigsten Vertreter der monobasischen und amphoteren Penicilline und Abbildung 3 stellt die Seitenketten der Isoxazolympenicilline dar [Mandell und Petri, 1996; Merck Index, 1999].

### 1.2.2.2 Therapeutisches Wirkungsspektrum

Der antibakterielle Wirkungsbereich der Penicilline und seiner Salze umfasst Gram-positive Kokken wie Pneumokokken, Streptokokken und Staphylokokken, Gram-negative Kokken wie Neisseria, Gram-positive Stäbchen wie Clostridien und Listeria monocytogenes, Actinomyceten und Spirochäten wie Treponemen oder Leptospiren, wobei sich die erfassten Erreger je nach Seitenkette des Penicillins unterscheiden können [Janata, 1999; Mutschler, 1986; Mandell und Petri, 1996]. Die MHK-Werte (minimale Hemmstoffkonzentration) liegen für die genannten Kokken und Stäbchen im Bereich von 0,002 - 0,6  $\mu\text{g/ml}$  [Otten und Plempel, 1975].

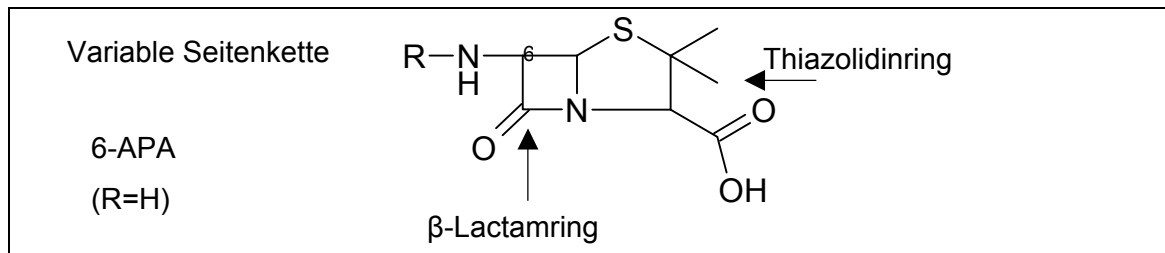


Abbildung 1: Strukturformel von 6-Aminopenicillansäure (6-APA)

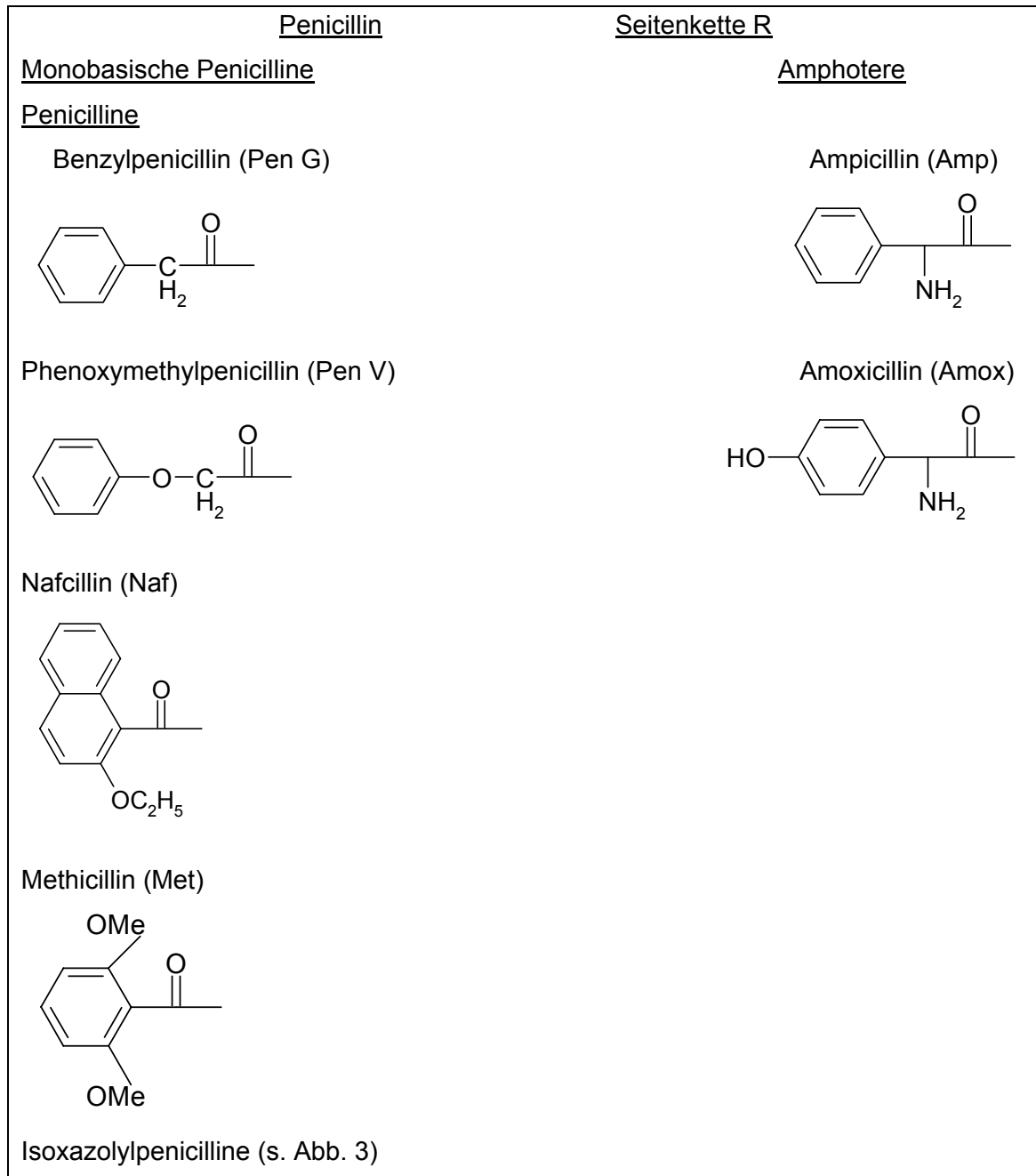


Abbildung 2: Strukturformeln der Seitenkette monobasischer und amphoterer Penicilline

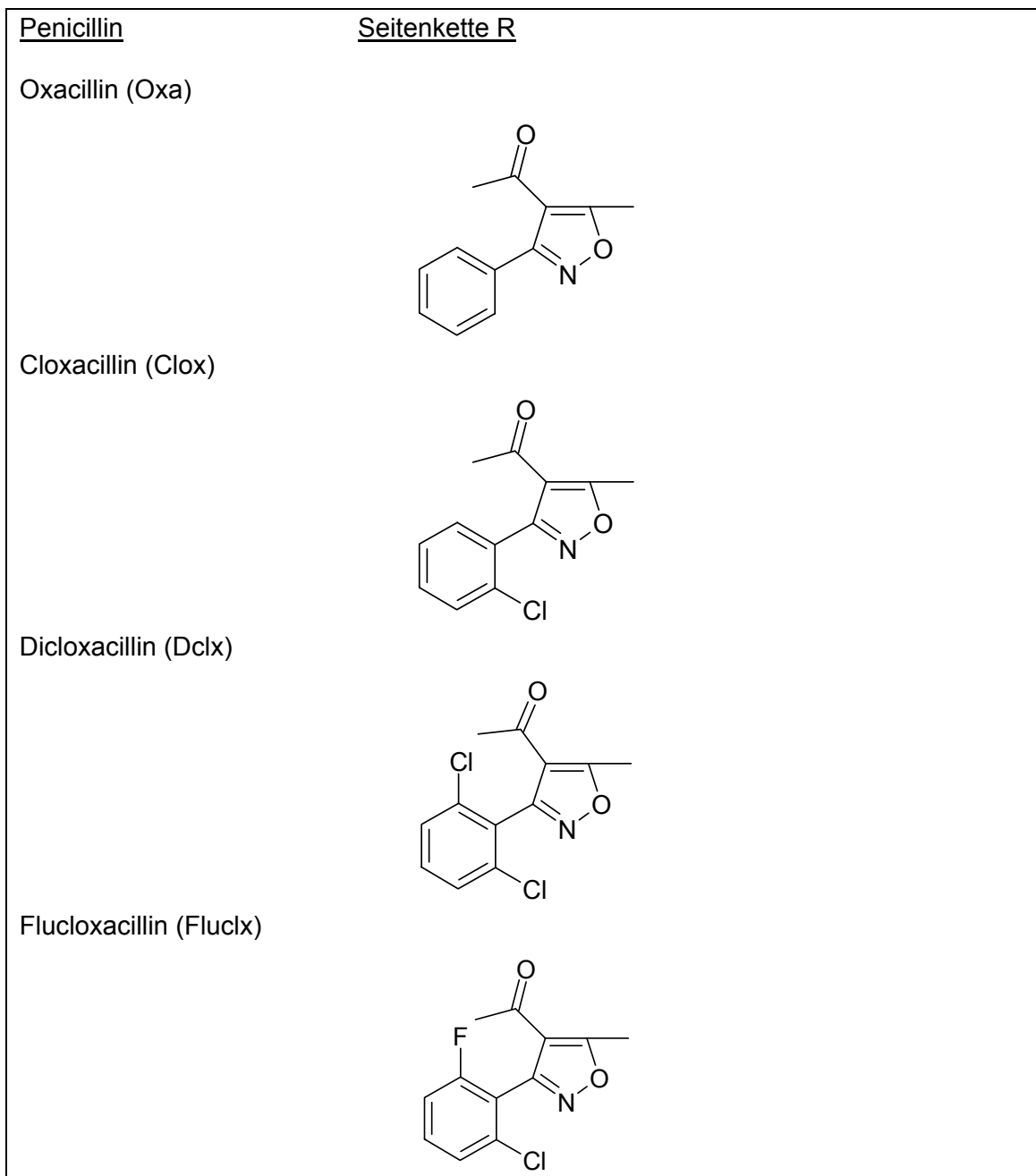


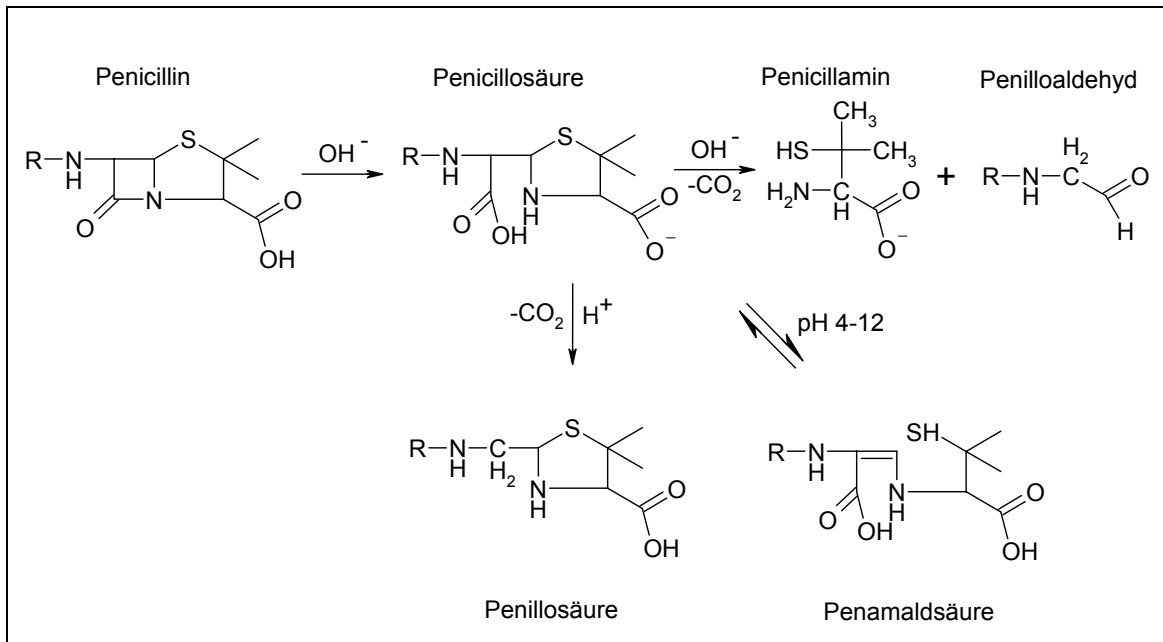
Abbildung 3: Strukturformeln der Seitenkette von Isoxazolympenicillinen

### 1.2.2.3 Abbaureaktionen durch nucleophilen und elektrophilen Angriff

Penicilline weisen eine geringe Stabilität gegenüber nucleophilen Reaktionspartnern auf (Abbildung 4).

Die Instabilität des  $\beta$ -Lactamringes im Penicillin kann auf die durch die Struktur im Bicyclus erzwungene  $sp^3$ -Hybridisierung des Amid-Stickstoffs im Ring zurückgeführt

werden [Auterhoff et al., 1994; Page, 1984]. Durch die Ringspannung des  $\beta$ -Lactamringes ist die Reaktivität gegenüber Nucleophilen wie Hydroxylionen, Aminen oder Alkoholen zu erklären. Auch die Polymerisierung über die  $\alpha$ -Aminofunktion von Ampicillin oder Amoxicillin ist eine nucleophile Reaktion.



**Abbildung 4: Abbaureaktion durch nucleophilen Angriff [Hou und Poole, 1971; van Krimpen et al., 1987]**

Die Empfindlichkeit der Penicilline gegenüber Elektrophilen ist bei monobasischen Penicillinen im Gegensatz zu amphoteren Penicillinen durch die fehlende elektronenziehende Gruppe in Alpha-Stellung zur Amidgruppe der Seitenkette begründbar (Abbildung 5). Es erfolgt eine Umlagerung über das Acyliumion zu den verschiedenen Säuren Penillsäure, Penicillensäure, Penicillosäure und Penillosäure [van Krimpen et al., 1987; Degelaen et al. 1979, Hou und Poole, 1971]. Führt man eine solche elektronenziehende Gruppe wie beim Ampicillin (Aminobenzylpenicillin) oder beim Penicillin V (Phenoxymethylpenicillin) ein, erhöht man die Stabilität im sauren Medium im Vergleich zum Benzylpenicillin [Hoffmann et al., 1972]. Die Empfindlichkeit der Penicilline ist durch Faktoren wie Konzentration oder Temperatur zu beeinflussen [Wiese und Martin, 1989]. Das Stabilitätsoptimum für eine Penicillinlösung liegt bei pH 6-7.

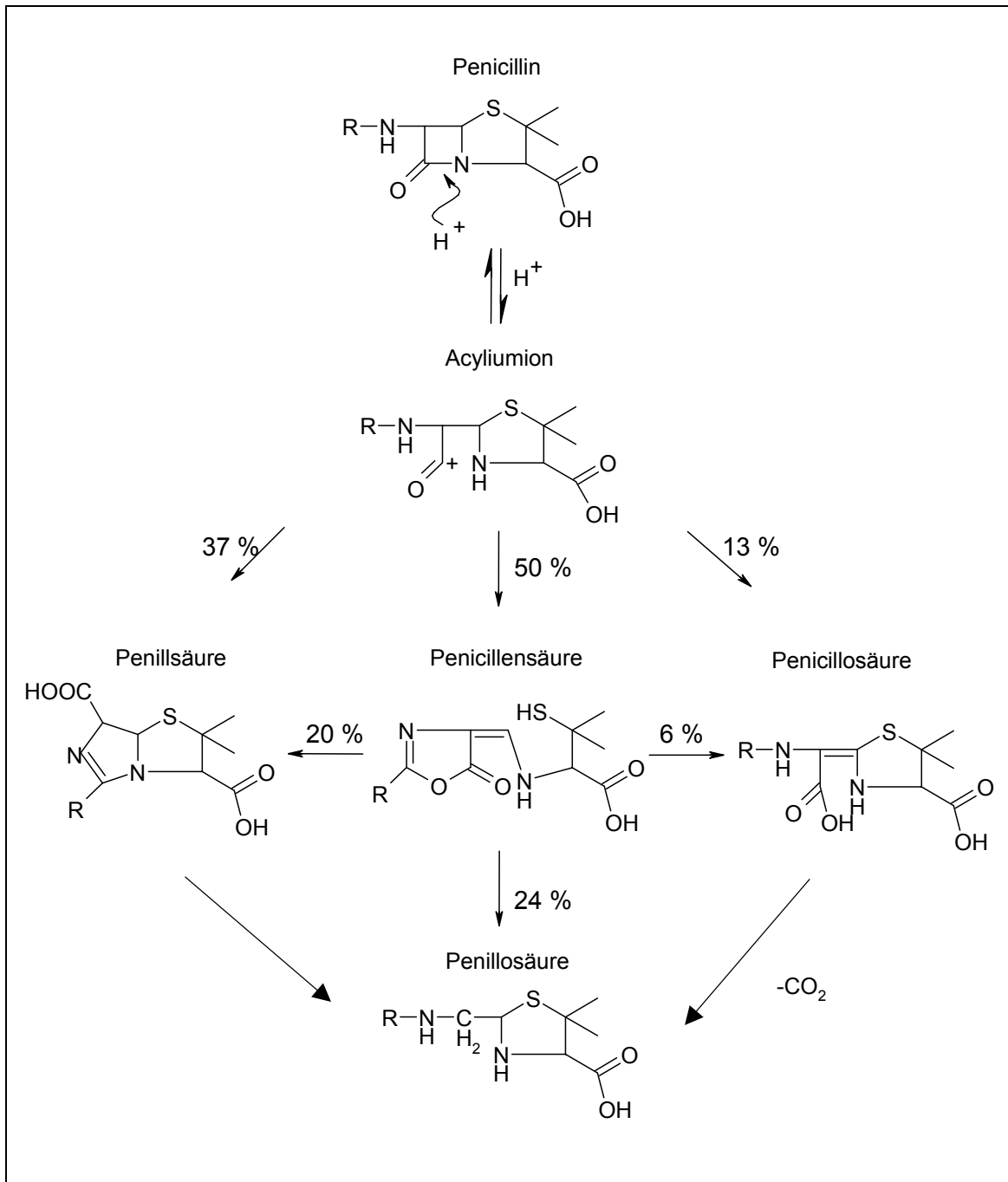
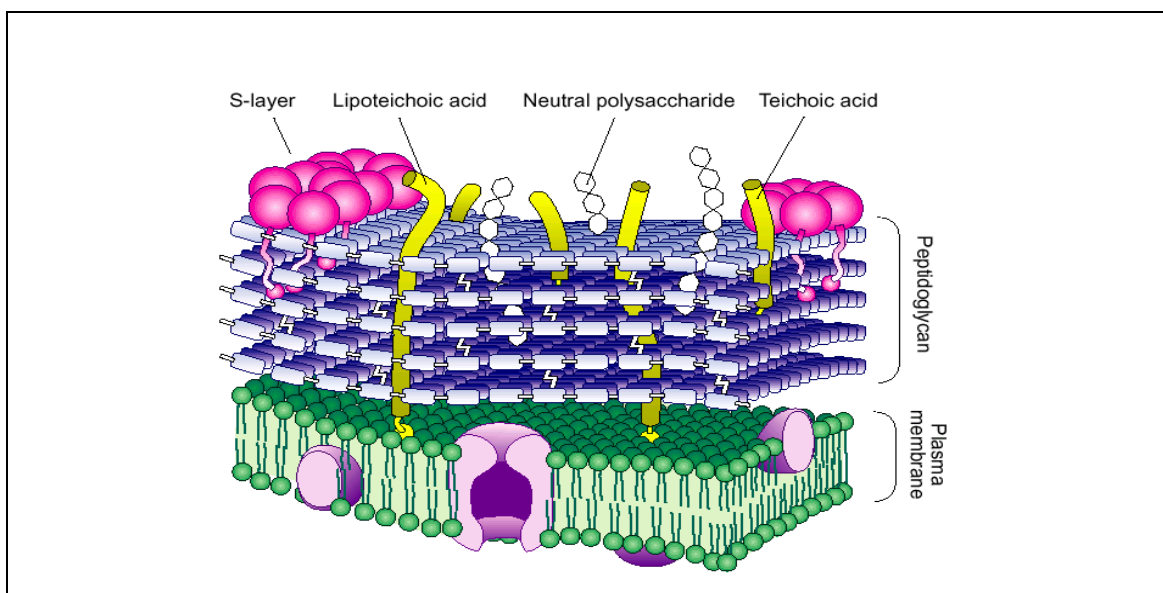


Abbildung 5: Abbaureaktion im sauren Medium durch elektrophile Substitution [Degelaen et al., 1979; Hou und Poole, 1971; van Krimpen et al., 1987]

### 1.2.3 Wirkungsmechanismus und Resistenzbildung

#### 1.2.3.1 Wirkungsmechanismus

Penicilline verhindern bei einer im Wachstum befindlichen Bakterienzellwand durch Hemmung der DD-Transpeptidase die Biosynthese der Murein-Stützschiicht [Schneider, 1985]. Die Zellwand von Gram-positiven Bakterien besteht neben einer Cytoplasmamembran aus einer 20 nm dicken Peptidoglykanschicht, dem Murein. Sie enthält Proteine, aufgelagerte Teichonsäuren und Lipide [Schlegel, 1992]. Die Mureinstützschiicht ist aus heteropolymeren Ketten von N-Acetylglucosamin (NAG) und N-Acetylmuraminsäure (NAM) aufgebaut, die alternierend aufeinander folgen und über eine Verknüpfung der peptidischen Seitenketten der NAM dreidimensional vernetzt sind.

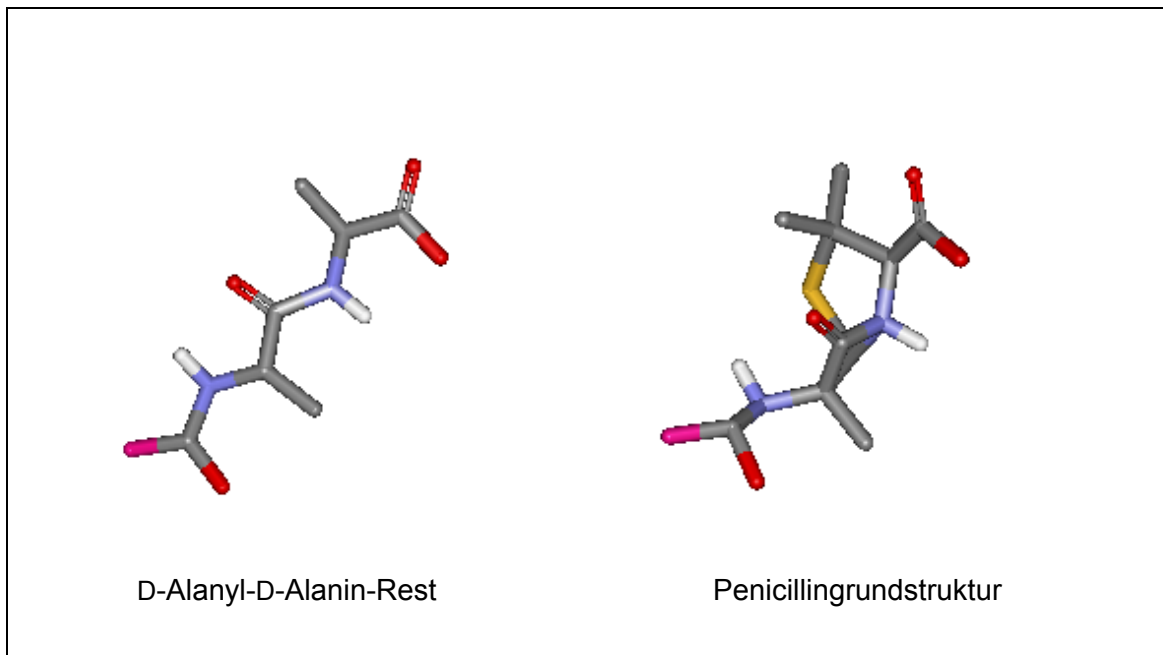


**Abbildung 6: Zellwand eines Gram-positiven Bakteriums [Abbildung entnommen aus: Delcour et al., 1999]**

Abbildung 6 zeigt den Aufbau eines Gram-positiven Bakteriums. Das Peptidoglykan gewährleistet die Stabilität der bakteriellen Zellwand.

$\beta$ -Lactame sind durch ihre L-Cystein-D-Valin-Einheit mit dem D-Alanyl-D-Alanin-Teil des Acetylmuramylpentapeptids isoster (Abbildung 7). Die Zellwandenzyme mit ihrer Serinfunktion können den  $\beta$ -Lactamring anstelle des natürlichen Substrats öffnen [Tipper und Strominger, 1965]. Ein solches Zellwandenzym, die Transpeptidase, wird



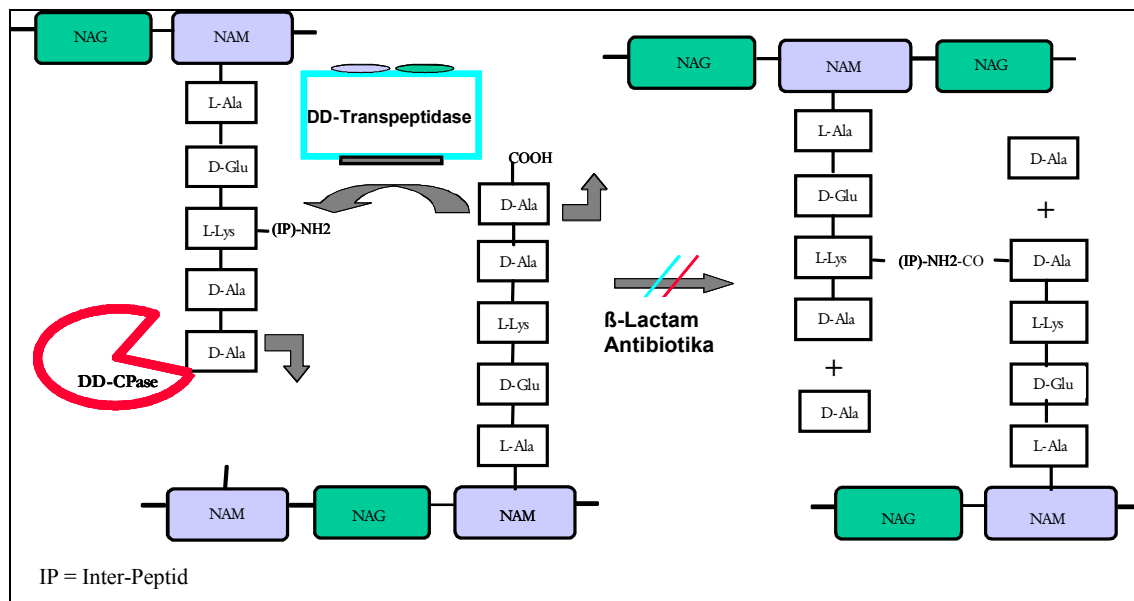


**Abbildung 7: Vergleich des Modells des Penicillins mit dem D-Alanyl-D-Alanin-Teil des Pentapeptidstranges**

auch penicillinbindendes Protein (PBP) genannt, da sie das Penicillin als Substrat aufgrund der strukturellen Analogie akzeptiert. Penicilline acylieren das aktive Zentrum der Peptidase, es kommt zu einer irreversiblen Hemmung des Enzyms. Das Penicillin verhindert, wie Abbildung 8 zeigt, die Verknüpfung der Peptide und somit die Quervernetzung der Polysaccharidstränge (crosslinking) [Waxman und Strominger, 1983; Lessel, 1996].

Ein weiteres an der Zellwandsynthese beteiligtes Enzym, die DD-Carboxypeptidase (DD-CPase), ist ebenfalls ein penicillinbindendes Protein. Es spaltet einen D-Alanylrest ab und reguliert damit den Vernetzungsgrad. Die Carboxypeptidase hat keinen direkten Einfluss auf die bakterizide Wirkung des Penicillins, da bei einer Inaktivierung der D,D-Carboxypeptidase die DD-Transpeptidase weiter die Mureinschicht aufbauen würde und damit das Zellwachstum nicht behindert wäre [Blumberg und Strominger, 1971; Ghuysen, 1991].

Die Inhibitoren der Zellwandsynthese bewirken eine Destabilisierung der Mureinschicht. Wird durch die Penicilline die Neusynthese des Mureins unterbrochen, kommt es zum Aufbrechen der Zellwandbegrenzung und schließlich zur Lysis [Gräfe, 1992].



**Abbildung 8:  $\beta$ -Lactamantibiotika in der Mureinbiosynthese [Abbildung modifiziert nach Cacciatore und Petz, 2002]**

### 1.2.3.2 Resistenz

Mikroorganismen entwickeln Antibiotikaresistenzen als Teil ihrer genetischen Anpassungsmöglichkeiten an wechselnde Bedingungen. So waren durch den breiten Einsatz von Antibiotika bereits 1960 mehr als 60 % aller klinischen Isolate von Staphylokokken penicillinresistent [Gräfe, 1992].

Verschiedene Mechanismen sind für diese Resistenz verantwortlich [Bozoglu et al., 1996; Holbrook et al., 1998; European Commission, 2002]. So ist bspw. die Affinität der Bindung der Penicilline durch die Änderung der Target-Rezeptor-Strukturen der PBP zu gering oder das Bakterium veranlasst eine Überproduktion des Targetenzym. Penicilline werden durch  $\beta$ -Lactamasen (Penicillinasen) hydrolytisch inaktiviert [Gold und Moellering, 1996; Medeiros, 1997]. Ein weiterer Mechanismus beruht auf dem Aufbau einer Penetrationsbarriere für Penicilline, so dass sie die PBP nicht erreichen können. Die äußere Membran bei Gram-negativen Bakterien besitzt Porinkanäle, die nur für amphotere Penicilline, wie Ampicillin und Amoxicillin, ausreichende Durchlässigkeit besitzen [Donowitz und Mandell, 1986]; andere Penicilline werden durch  $\beta$ -Lactamasen im Periplasma inaktiviert [Davies, 1997; Jacoby und Archer, 1991; Levy, 1997; Neu, 1992].

---

Im veterinärmedizinischen Bereich [Bisping, 1962] ist das Resistenzproblem ebenfalls von Relevanz. Dies zeigen Studien zum Resistenzverhalten von Bakterienstämmen gegenüber Penicillinen in der Milch von an Mastitis erkrankten Kühen [Krabisch et al., 1999; Sobiraj et al., 1997]. Auch bei technologisch wichtigen Milchsäurebakterien wurde die Resistenz gegenüber Penicillinen untersucht. So sind in der Literatur Untersuchungen zu Lactobacillen [Charteris et al., 1998], Streptokokken [Seelemann und Timm, 1955] Joghurtstarterkulturen wie *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [Ottogalli et al., 1975; Sozzi und Smiley, 1980], verschiedenen anderen Starterkulturen für Käse [Reinbold und Reddy, 1974; Teuber et al., 1999] sowie zur Isolierung von resistenten Stämmen beschrieben [Yaman, 1994].

#### 1.2.4 Pharmakokinetik

Die Penicilline unterscheiden sich in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften. Grundsätzlich besitzen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika eine große therapeutische Breite. Die Penicilline werden, wie unter Punkt 1.2.6 ausgeführt, in unterschiedlichem Maße an Proteine gebunden. Sie werden im menschlichen und tierischen Körper in der Regel nur wenig metabolisiert und treten nur in geringem Maße durch biologische Membranen und Lipidbarrieren. Ein großer Teil der Penicilline wird bei oraler Aufnahme über den Harn unverändert ausgeschieden. Durch Spaltung des  $\beta$ -Lactamringes entstehen als Hauptmetabolite die Penicilloyl-derivate [Rosin und Henschler, 1996; Auterhoff et al., 1994]. Die Galenik des Präparates, die Substanzeigenschaften wie Löslichkeit, lipophiles Verhalten und Faktoren im Tier wie pH-Verhältnisse, Durchblutung des Magen-Darm-Traktes u.a.m. haben großen Einfluss auf die systemische Verfügbarkeit der pharmakologisch wirksamen Stoffe [Kroker, 2002].

#### 1.2.5 Penicillin-Allergie

Arzneimittelallergien können nach wiederholter Aufnahme desselben Arzneimittels auftreten. Bis zu 75 % aller Arzneimittelallergien entstehen durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Am häufigsten sind Penicillin-Allergien. Die Gefahr der Sensibilisierung bzw. der allergischen Reaktion wird bei 10 % der Bevölkerung als gegeben geschätzt [Bisping,

1962; Idsoe et al., 1969]. Grundlage für diese Werte ist die Beobachtung von Symptomen. Daher werden diese Angaben in der Literatur auch kritisch betrachtet. So gibt es die Vermutung, dass die Symptome häufig durch andere Medikamente oder die eigentliche Infektion hervorgerufen werden [Salkind et al., 2001]. Verschiedene Typen der Arzneimittelallergie sind beschrieben, von Urticaria (Hautausschlag) [Shipley und Ormerod, 2001] bis hin zur allergisch-anaphylaktischen Reaktion (Typ I, IgE-Antikörper vermittelte Reaktion), welche bei 0,015 - 0,04 % der mit Penicillin behandelten Patienten auftreten (0,0015 % tödlicher Ausgang). Weitere Allergieformen sind immunhämolytische Anämien (Typ II, IgG (IgM)-Antikörper vermittelte cytotoxische Reaktion), welche geringere Symptome zeigen, sowie Symptome der Serumkrankheit, Arzneimittelfieber (Typ III, IgG (IgM)-Antikörper vermittelte Immunkomplexreaktion) und Kontaktdermatitis oder Photoallergien (Typ IV, Lymphocyten vermittelte Reaktion) [Giertz et al., 1987; Klein, 1991; Mitchell, 1999; Sulyma, 1988; Wilson, 1995].

Es konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Lactam-Antibiotikarückstände in Lebensmitteln Allergien auslösen können. So reagierten in einer Studie vier von fünfzig allergischen Personen auf Milch mit 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Penicillin mit Hautausschlag [Ormerod et al., 1987]. Auch in anderen Studien [Boonk und van Ketel, 1981; Dewdney und Edwards, 1984; Katz, 1982; Poljacki et al., 1995; Wicher et al., 1969] zeigten Patienten allergische Reaktionen schon bei niedrigen Konzentrationen durch Rückstände in Milch. Die Urticaria konnte bei 50 % der Patienten durch eine milch- und milchproduktfreie Diät geheilt oder verbessert werden. Die Autoren führen dies auf die Penicillinrückstände in der Milch zurück [Boonk und van Ketel, 1982].

Auch wenn das mit der Nahrung aufgenommene Arzneimittel nicht zur Sensibilisierung führt, kann es bei sensibilisierten Personen das symptomauslösende Argens sein [Grossklaus und Kaul, 1989]; so werden also auch Penicillinrückstände in Milch oder Milchprodukten für unerwartete allergische Reaktionen verantwortlich gemacht [Giertz et al., 1996].

Andere Autoren beschreiben, dass nicht nur die Penicilline, sondern gerade auch Penicillinderivate und Penicillinabbauprodukte allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock auslösen können [Audicana et al., 1994; Jäger und Ambrosius, 1989; Juhlin et al., 1977]. Die immunogene Reaktion auf Penicillin-Derivate ist laut Literatur größer als beim intakten Penicillin [Schneider und de Weck, 1970; Knudsen et al., 1970].

Auch Verunreinigungen der Arzneimittel sind Sensibilisatoren. Sie können Allergien hervorrufen. Als Verunreinigungen bezeichnet man in diesem Zusammenhang niedermolekulare Chemikalien, die mit Proteinen reagieren, Polymerisationsprodukte des Arzneimittels, z.B. Penicillinpolymere, durch chemische Reaktionen mit sich selbst oder Hilfsstoffen sowie durch Zusätze oder Verunreinigungen entstandene Allergene [Bundgaard, 1983; Jäger und Ambrosius, 1989].

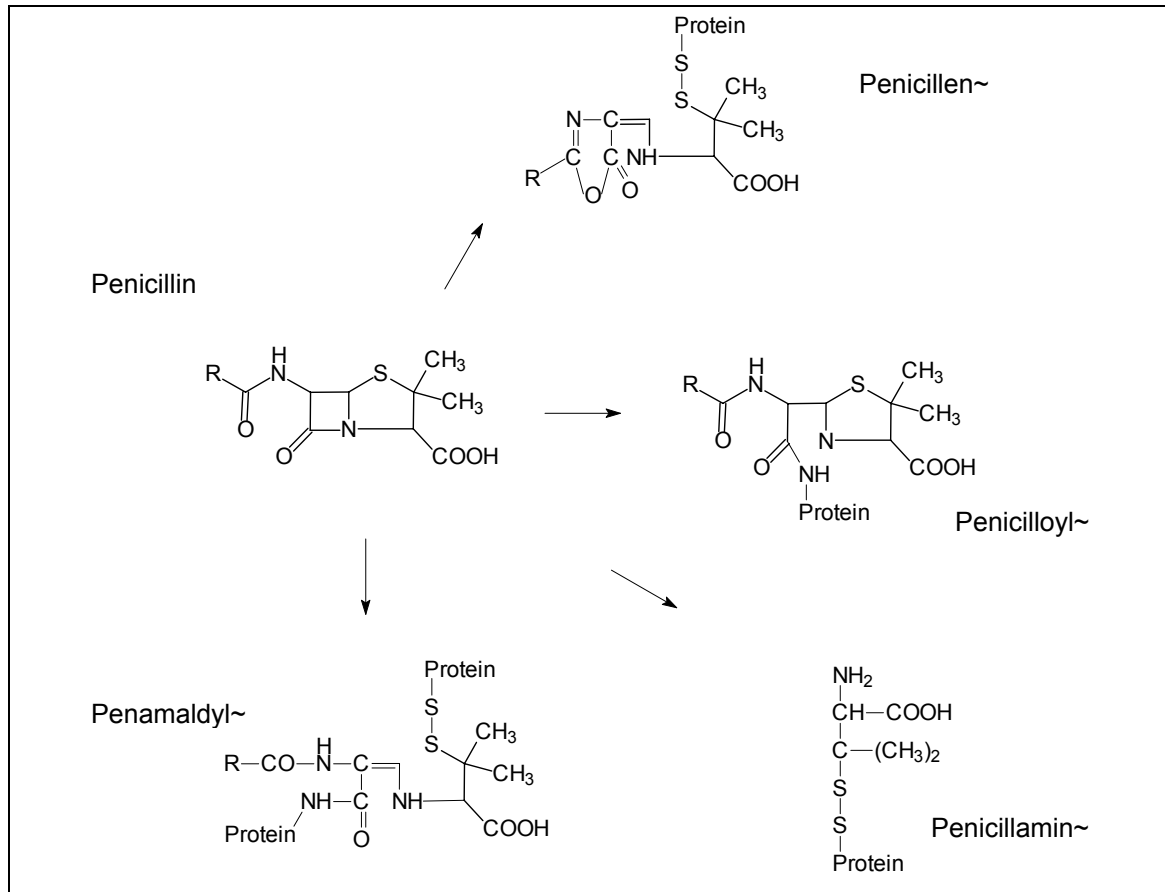
Penicilline und Penicillinpolymere können mit Kohlenhydraten (z.B. Lactose aus der Milch) reagieren, daraus kann ebenfalls ein allergenes Potential entstehen (Kohlenhydrat-Penicilloyl-Konjugat) [Schneider und de Weck, 1967; Molinari et al., 1973; Bundgaard und Larsen, 1978].

Durch die enzymatische Herstellungsweise der Penicilline finden sich Protein-Penicilloyl-Derivate im semisynthetischen Produkt [Batchelor et al., 1967; Butcher und Stewart, 1970].

### 1.2.6 Reaktion mit Proteinen

Zwischen Proteinen und Penicillin bzw. -derivaten bilden sich adsorptive und kovalente Bindungen aus [Bundgaard, 1983; Markovich et al., 1977]. Als adsorptiven Bindungen bilden sich über hydrophobe Wechselwirkungen micellartige Strukturen der Penicilline [Taboada et al., 2000a; Ruso et al., 2001]. Auch kovalente Bindungsstellen werden in der Literatur näher beschrieben [DiPiro et al., 1993; LaFaye und Lapresle, 1988; Yvon et al., 1990]. Zwischen 50 und 95 % von Penicillin G bzw. Cloxacillin binden in Versuchen an Plasma- (oder Serum-) Protein von Kühen bzw. Menschen [Baggot, 1977]. Bei dieser Bindung öffnet sich der  $\beta$ -Lactam-Ring, wobei ein Teil der Bindungen über die Amino-Gruppe des Lysins reagieren; dies ist auch die bestimmende Größe für die Antigen-Antikörper-Reaktion [Weltzien und Padovan, 1998] und spielt eine Rolle in 75 % der IgE vermittelten allergischen Reaktionen [Sullivan, 1993]. Durch die kovalente Bindung von  $\beta$ -Lactamen an Aminogruppen sind die Penicilline immunogener als andere Antibiotika wie z.B. wenig reaktive Sulfonamide [Batchelor et al., 1965; Park et al., 1987]. Andere Bindungen zwischen Penicillin und Proteinen entstehen durch Abbauprodukte des Penicillins wie Penicillensäure oder Penicillosäure, die Disulfidbrücken mit SH-Gruppen vom Cystein ausbilden. Die Reaktion zwischen Penicillin und Protein erfolgt schneller und weitgehender im alkalischen als im physiologischen pH-Bereich [Kitteringham et al., 1987]. Die

Bindungen haben auch Einfluss auf die Stabilität des Proteins [Markovich, 1988]. Abbildung 9 zeigt einige Beispiele für solche Penicillin-Protein-Bindungen. Eine umfangreiche Darstellung möglicher Bindungen ist veröffentlicht [Schwartz, 1969].



**Abbildung 9: Beispiele möglicher Proteinbindungen von Penicillinen [Dewdney und Edwards, 1984; Idsoe et al., 1969; Juhlin et al., 1977; Schwartz, 1969]**

### 1.2.7 Bildung von Penicillin-Polymeren

Die Polymere entstehen zunächst durch Dimerisation, wie Abbildung 10 zeigt [Stewart et al., 1970]. Die Polymere werden in zwei Gruppen eingeteilt: mit und ohne Aminofunktion. Sie besitzen Molekulargewichte von 1.000 bis 5.000 Dalton.

Zur Analytik der Polymere sind in der Literatur verschiedene elektrophoretische und chromatographische Methoden beschrieben worden [Niu und Zhu, 1997; Bundgaard und Larsen, 1977]. Bei den amphoteren Penicillinen erfolgt die Polymerisation über die Aminofunktion. Abbildung 11 zeigt die chemische Struktur eines Ampicillin-Polymers.



### 1.2.8 Anwendung in der Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin wurden im Jahr 1997 in Europa und Nordamerika insgesamt 10.000 t Antibiotika verwendet. [Ungemach, 2000; Fox, 2001]. Am häufigsten werden neben den Tetracyclinen, die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, insbesondere Penicilline, eingesetzt [FEDESA, 1998].

Dieser Einsatz von Antibiotika dient der Behandlung und Prophylaxe von Infektionen, da oft der gesamte Tierbestand eines Hofes behandelt werden muß, sobald ein Tier klinische Symptome aufweist [Gustafson und Bowen, 1997; Committee on Drug Use in Food Animals, 1999]. In Bezug auf die Eutergesundheit des Milchviehs lassen sich Penicilline gegen eine Vielzahl von Erregern einsetzen, da mehr als 85 % der Milchsekretonsstörungen durch Bakterien verursacht werden [Wendt et al., 1994]. Ein Haupteinsatzgebiet der Penicilline, die Mastitis, wird klassisch von Erregern wie *S. aureus*, *S. agalactiae* oder *S. dysgalactiae* hervorgerufen [DVG, 1994; Brückler, 1994], aber auch von Streptokokken und Coliformen Keimen [Hady et al., 1993; Sobiraj et al., 1997; Tolle, 1982; Tyler et al., 1992].

Der Mastitis geht eine latente Infektion voraus, wobei zwar Mastitiserreger nachgewiesen werden können, jedoch keine äußerlichen Krankheitssymptome erkennbar sind. Es liegt eine „Subklinische Mastitis“ vor. Bei einer „Klinischen Mastitis“ wird zwischen „Akuter Mastitis“, bei der die Entzündungssymptome wie erhöhte Temperatur, Schwellungen oder Rötung der Euterhaut deutlich wahrnehmbar sind und „Subakuter Mastitis“ unterschieden. Die „Subakute Mastitis“ zeigt keine klinischen Symptome, wohl aber eine Veränderung der Milch, die z.B. Flocken aufweist. Eine „Chronische Mastitis“ liegt vor, wenn längerfristige Therapien nicht ansprechen und die Tiere zeitlebens klinische Befunde aufweisen [DVG, 1994; Horsch, 1984].

Ohne therapeutische Behandlung kann Mastitis zum Tod der erkrankten Tiere führen.

In der Behandlung und Prophylaxe der Mastitis sind Penicillin G, die Isoxazolympenicilline, wie Cloxacillin, sowie Kombinationspräparate aus den amphoteren Penicillinen mit den Isoxazolympenicillinen von großer Bedeutung [Davis et al., 1975; Keefe, 1980; Petrusch, 2000; Prescott, 2000; Watkins et al., 1975].

Die Ausscheidung der Wirkstoffe mit der Milch ist von verschiedenen Faktoren, wie Dosierung und Formulierung des Antibiotikums oder Anzahl der Melkzeiten, abhängig [Debackere, 1995; Moretain und Boisseau, 1989]. Auch die Auswahl des Euterviertels



---

zur Applikation bzw. zum Melken ist von Bedeutung [Hawkins et al., 1962; Evans und Stern, 1960].

Die während der Wartezeit ermolzene Milch darf nach Milchgüte-Verordnung nicht abgeliefert werden, da Wirkstoffe enthalten sein können [MilchGüteVO, 1980].

## 1.2.9 Rückstandsanalytik

### 1.2.9.1 Screening Tests

In der Lebensmittelüberwachung ist die direkte Identifizierung und Quantifizierung von Arzneimittelrückständen in Verdachtsproben zu zeit-, geräte-, personal- und kostenaufwendig. Um die Effizienz der Laboratorien zu erhöhen, werden zunächst Screening-Tests durchgeführt, die eine Ja / Nein - Entscheidung innerhalb der vom Testsystem gesetzten Grenzen zum Vorhandensein von Rückständen erlaubt. Es können sowohl Rückstände erfasst werden, die von pharmakologischen Wirkstoffen stammen, die nicht zugelassen sind, aber illegal angewendet werden als auch Tierarzneimittelrückstände, die zugelassen sind, aber deren vorgeschriebene Wartezeiten nicht eingehalten wurden. In einem zweiten Schritt kann dann die Wirkstoffgruppe eingegrenzt werden, bevor die Rückstände mittels chromatographischer Methoden identifiziert, quantifiziert und abgesichert werden [Petz, 1991; Suhren, 2002].

Anforderungen an Screening-Tests bestehen darin, dass sie verlässliche Hinweise geben sollen, ob ein gesuchter illegaler Wirkstoff vorhanden ist oder ein zugelassener Wirkstoff oberhalb der festgesetzten Höchstmenge liegt. Sie sollen einfach, schnell und kostengünstig durchzuführen sein, sowie einen geringen Anteil an „Falsch-Negativen“ (< 5 %) und „Falsch-Positiven“ (< 10 %) aufweisen [Anderson et al., 1998; Cullor et al., 1994].

Die Screening-Tests können unterteilt werden in Hemmstofftests, Rezeptortestverfahren und Immunoassays [Aerts et al., 1995; Boison und MacNeil, 1995; Mitchell et al., 1998], auf die in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird. Seltener finden physikalisch-chemische Methoden Anwendung als Screeningverfahren, da sie meist einer aufwendigen Probenaufreinigung bedürfen.

### Mikrobielle Hemmstofftests

Zu den gebräuchlichsten Hemmstofftests zählen der Dreiplattentest gemäß Fleischhygienerecht [FleischhygieneVO, 2001] und der EU-Vierplattentest [Ellerbroek et al., 1994]. Der Zwölfplattentest nach Lund ermöglicht eine vorläufige Stoffklassenidentifizierung [Lund, 1986]. Hierbei handelt es sich um mikrobiologische Agardiffusionsverfahren. Weitere Hemmstofftests, die über bakterielle Produktion von z.B. Reduktionsäquivalenten oder Säuren auswerten, sind der Brillantschwarzreduktionstest [Amtl. Sammlung §35, L 01.00/11; IDF, 1991b], der Premi<sup>®</sup>Test [Arts et al., 2000; Spörri und Stephan, 2000; Reybroeck, 2000], der Delvotest<sup>®</sup> P oder SP [Suhren und Beukers, 1998] und der Charm Aim 96<sup>®</sup> [Korsrud et al., 1998].

### Rezeptortests

Bekannte Rezeptortestverfahren sind der Charm II<sup>®</sup>-Test, der Delvo-X-Press<sup>®</sup>-Test, der Cite<sup>®</sup>Probe-Test und der Snap<sup>®</sup>test sowie der auf einer Enzymreaktion beruhende Penzym<sup>®</sup>-Test [Bishop et al., 1992]. Beim Snap<sup>®</sup>test und dem Cite<sup>®</sup>Probe-Test beruht das Testsystem auf der Konkurrenzreaktion der Penicilline mit zugesetztem enzymmarkiertem Penicillin um Rezeptoren an speziell präparierten Bakterienzellwänden, die auf einer Kunststoffmembran fixiert sind [Anonymous, 1994]. Der Charm II<sup>®</sup>-Test beruht auf der Reaktion eines spezifischen mikrobiellen Rezeptors von *Bacillus stearothermophilus* mit dem Wirkstoff, wobei <sup>14</sup>C-markierter Wirkstoff dabei mit Penicillinrückstand aus einer Probe um die Bindungsstellen konkurriert. Ausgewertet wird nach Entfernung des überschüssigen markierten Wirkstoffs über eine Szintillationsmessung [Carlsson und Björck, 1991; Charm, 1992; Charm Science Inc., 1998; Korsrud et al., 1996; Suhren und Heeschen, 1987].

Beim Penzym<sup>®</sup>-Test wird die D,D-Carboxypeptidase, welche die Peptidbindung von D-Alanyl-D-Alanin hydrolysiert, von Penicillinen irreversibel gehemmt. Freigesetztes D-Alanin wird mit D-Aminosäureoxidase zu Pyruvat oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid entsteht, der in Gegenwart von Peroxidase den zugesetzten Farbindikator von gelb nach orange umschlagen lässt. Penicilline verhindern diesen Reaktionsweg [Everest et al., 1994; Frere et al. 1980; Suhren et al., 1996].

### Immunchemische Tests

Die immunchemischen Methoden beruhen auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. In der Penicillinanalytik wird aufgrund der Niedermolekularität der Analyten kompetitiv, also durch eine Konkurrenzreaktion zwischen Antigen und dem Zielanalyten, gearbeitet [Cliquet et al., 2001; Märtlbauer, 1993]. Bei den immunchemischen Tests werden kommerziell erhältliche, bspw. der LacTek<sup>®</sup>-Test [Mitchell, et al., 1999] oder der Parallax<sup>®</sup>-Test [Huth et al., 2002] angeboten. Man verwendet als Marker radioaktive Isotope (RIA - Radio Immuno Assay), Enzyme (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay) oder fluoreszierende Verbindungen (FIA – Fluoreszenz-immunoassay). Ebenso sind Immunfiltrationstests [Beier und Stanker, 2000] oder auch das Biocore-System (Surface Plasmon Resonance Technology), das mit spezifischen Sensoroberflächen arbeitet, im Einsatz [Schindler, 2000]. Für Isoxazolympenicilline in Milch wurde ein spezifischer ELISA entwickelt [Usleber et al., 1994].

### 1.2.9.2 Chemisch-physikalische Trennmethoden

#### Probenvorbereitung

Um Penicillinrückstände mit den gewünschten Qualitätskennwerten des Analysenverfahrens wie genügend hoher Spezifität und Selektivität bestimmen zu können, ist meist eine Probenvorbereitung nötig.

Die Probenaufarbeitung lässt sich in die Punkte Probenzerkleinerung (incl. Durchmischung und Homogenisierung), Spaltung von adsorptiven Bindungen, Deproteinierung, Extraktion, Reinigung und gegebenenfalls Vorsäulenderivatisierung einteilen [Petz, 1984].

Die repräsentativ genommene Probe muss zunächst homogenisiert werden. Dann kann durch sogenannte „Releasing solvents“ die adsorptive Bindung (Punkt 1.2.6.) zwischen Penicillinen und Proteinen gespalten werden. Solche „Releasing solvents“ sind Aceton oder Acetonitril [Tyczkowska et al., 1989]. Es schließt sich eine Präzipitation der Proteine an; beides kann auch in einem Schritt erfolgen. Wirksame Lösemittel bei der Proteinfällung sind Acetonitril [Boatto et al., 1998; Gee et al., 1996; Lihl und Petz, 1994; Moats und Harik-Khan, 1995], Aceton [Hormazábal und Yndestad, 1995; Tarbin et al., 1996] und Dichlormethan [Fletouris et al., 1992]. Andere Möglichkeiten der Deproteinierung sind die Ultrafiltration [Ibach und Petz, 1998; Furusawa, 2000; Muth et al., 1996; Voyksner et al., 1991] und die Dialyse [Imerman et

al., 1996; Snippe et al., 1994]. Verschiedene Autoren beschreiben auch eine Säurefällung der Proteine z.B. mit Natriumwolframat / Schwefelsäure [Boison et al., 1991; Hong und Kondo, 2000; Ito et al., 2000; Tarbin et al., 1995] oder Trichloressigsäure [Ang und Luo, 1997; Leroy et al., 1992; Verdon und Couedor, 1996]. Zur Entfettung der Proben werden die Lipide mit unpolaren Lösemitteln wie Hexan [Becker et al., 2001; Riediker und Stadler, 2001], Isooctan [Verdon und Couedor, 1999] oder Ethylacetat [Marchetti et al., 2001] extrahiert. Ebenso werden Extraktionen über Flüssig / Flüssig-Verteilungen durchgeführt. Geeignete Lösemittel sind hierfür Acetonitril oder Dichlormethan [Ang et al., 1996; Blanchflower et al., 1994; Pérez et al., 1997]. In den letzten Jahren häufiger im Einsatz ist die Festphasenextraktion (SPE – solid phase extraction) vor allem mit C<sub>18</sub> modifiziertem Kieselgel aber auch anderen Materialien [Dasenbrock und LaCourse, 1998; Taguchi et al., 1999; Takeba et al., 1998; Verdon und Couedor, 1999] wie Restricted-Access Materials (RAM), bei denen das Trennprinzip auf einer Fraktionierung der Probe in Analyt- und Matrixfraktion durch sterische Ausschlusschromatographie der Makromoleküle und Adsorptionschromatographie der Analyten beruht [Ibach, 1999; Schäfer und Lubda, 2001].

#### Dünnschichtchromatographische Methoden (DC)

In der Penicillinanalytik werden DC-Methoden zur qualitativen, semiquantitativen und auch quantitativen Bestimmung eingesetzt. Laut Literatur sind verschiedene Fließmittel, stationäre Phasen und Detektionsmöglichkeiten, z.B. mit Ninhydrin oder Derivatisierung zu Fluoreszenzprodukten, im Einsatz [Abjean und Lahogue, 1997; Boison, 1992; Bossuyt et al., 1976; Kreuzig, 1996; McGilveray und Strickland, 1967; Manni et al., 1973; Moats, 1983].

#### Gaschromatographie (GC)

Gaschromatographische Methoden zur Bestimmung von Penicillinen sind in der Literatur wenige beschrieben [Hamann et al., 1975; Meetschen und Petz, 1991, Mineo et al., 1992]. Die amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden nach §35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) gibt eine prävalidierte Methode zur Bestimmung von sieben Penicillinen in Geweben und Milch an [Amtl. Sammlung §35, L 01.01/02]. Hierbei handelt es sich um die durch zwei weitere Laboratorien validierte Methode von Meetschen und Petz.

### Kapillarelektrophorese (CE)

Auch die Kapillarelektrophorese wird zur Bestimmung von Penicillinrückständen herangezogen. In der jüngsten Literatur befindet sich ein Überblick [van Schepdael und Hoogmartens, 2000]. Die Kapillarelektrophorese wird auch in Kombination mit der Massenspektrometrie eingesetzt [Ahrrer et al., 2001; Hernandez, 1999].

### Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die zur Quantifizierung der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika am häufigsten verwendete Bestimmungsart ist die Flüssigchromatographie. Zur Penicillinrückstandsanalytik mittels HPLC findet man in der Literatur verschiedene Methodenzusammenstellungen [Boison, 1995; Brandšteterová et al., 2000; Botsoglou und Fletouris, 2001; Petz, 1992]. Bei der Penicillinbestimmung wird mit Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed Phase, RP) gearbeitet. Als organischer Modifier dient vor allem Acetonitril und seltener Methanol [Verdon und Couedor, 1998; Zomer et al., 1995], welcher mit einem Puffer im pH-Bereich von 2 bis 7 zur mobilen Phase gemischt wird. Auch Gradientensysteme [Kubalec et al., 1997; Tarbin et al., 1995] oder der Zusatz von Ionenpaarreagenzien zur Erhöhung der Retention werden in der Literatur beschrieben [Hormazábal und Yndestad, 1995; Muth et al., 1996; Takeba et al. 1998; Tyczkowska et al., 1994]. Als Trägermaterial werden modifizierte Silicagele verwendet, vor allem C<sub>18</sub>- [Pérez et al., 1997; Gee et al., 1996] oder C<sub>8</sub>-Materialien [Boison und Keng, 1998, Rose et al., 1997a], aber auch cyano- und phenylsubstituierte bzw. modifizierte Silicagele und Polymere, da letztere bessere chemische Stabilität, höhere Flussraten, bessere Retention und Selektivität erreichen können [Moats und Leskinen, 1987; Ang und Luo, 1997]. Zur Detektion werden überwiegend UV-Detektoren verwendet [Furusawa, 2000]. Der UV-Bereich zur Messung der Penicilline liegt zwischen 200 und 230 nm; da in diesem Bereich aber auch Matrixkomponenten adsorbieren, werden die Penicilline häufig derivatisiert. Zur besseren Detektion der Analyten bei anderen Wellenlängen werden Derivatisierungsreaktionen über eine photochemische Reaktion [Ibach und Petz, 1998, Taguchi et al., 1999] durchgeführt, auch elektrochemische [Dasenbrock und LaCourse, 1998; Lihl et al., 1996; Kirchmann et al., 1994] sowie Fluoreszenz-Detektoren werden angewandt. Zur Bildung fluoreszierender Derivate werden Fluorescamin [Hong und Kondo, 2000; Leroy et al., 1992], o-Phthaldialdehyd [Rogers et al., 1984] oder 9-Fluorenylmethylchlorformiat [Shah und Adlard, 1988] eingesetzt. In

der Praxis sind vor allem zwei Methoden etabliert: Die Methode nach Boison und Sørensen [Boison et al., 1991; Sørensen et al., 1997, Terada et al., 1985], deren Grundlage von Bundgaard erarbeitet wurde [Bundgaard, 1971; Bundgaard und Ilver, 1972], setzt die Penicilline mit Quecksilberchlorid in Gegenwart von 1,2,4-Triazol um. Es entsteht ein Quecksilbermercaptid-Komplex welcher bei  $> 300$  nm im UV absorbiert. Für amphotere Penicilline wie Ampicillin und Amoxicillin geht der Triazolmethodik eine Benzoylierung oder Acetylierung voraus. Eine weitere Methode für die amphoteren Penicilline ist die Derivatisierung mittels Formaldehyd und Trichloressigsäure (TCA) [Ang und Luo, 1997] bzw. 2-Hydroxy-benzaldehyd (Salicylaldehyd) [Luo et al., 1997] und anschließender Fluoreszenzdetektion.

#### Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

In der Flüssigchromatographie der Penicilline hat sich in den letzten Jahren die MS oder  $MS^n$  als Detektionsmöglichkeit durchgesetzt [Tyczkowska et al., 1994, Blanchflower et al., 1994; Straub et al., 1994]. Der Vorteil der LC-MS liegt in der weniger aufwendigen Probenvorbereitung, der Möglichkeit der Detektion ohne vorhergehende Derivatisierung, der hohen Selektivität und Empfindlichkeit der Methodik, im großen Probendurchsatz und in den verkürzten Analysenzeiten. Zur eindeutigen Identifizierung der Analyten über  $MS^n$  findet die LC-MS ihren Einsatz. Nachteile sind die Beeinflussung der Quantifizierung durch Matrixeffekte, hohe Anschaffungskosten der Geräte, die vergleichsweise aufwendige Technik, die Einschränkung auf flüchtige Puffer und die Schwierigkeit untereinander vergleichbare Spektrenbibliotheken zu erstellen. Als Ionisationstechnik wird in den Veröffentlichungen zumeist die Elektrospray Ionisation (ESI) verwendet [Ang et al. 2000; Becker et al., 2001; Bruno et al., 2001; De Baere et al., 2002; Daeseleire et al., 2000; Ito et al., 2001; Riediker et al., 2001]. Bei der Elektrospray-Technik sind Flussraten von 0,001-1 ml/min möglich, wobei Ionen unzersetzt in den Massenanalysator gelangen können. Es bilden sich Quasi-Molekülionen  $[M+H]^+$  oder  $[M+H]^-$  bzw. Addukte, je nachdem, ob im Positiv- oder Negativmodus gearbeitet wird. Mit der Elektrospray-Technik wurden ältere Ionisationsverfahren abgelöst wie z.B. die Thermospray Ionisation [Siegel et al., 1987; Suwanrumpha und Freas, 1989; Tyczkowska et al., 1989; Voyksner et al., 1991], Fast Atom Bombardment (FAB) [Casy et al. 1989; Suwanrumpha et al., 1988], Particle Beam Interface [Hurtaud et al., 1994] oder Plasmaspray [Ohki et al., 1992]. Auch ein API Ion Spray-Verfahren ist beschrieben [Hormazábal und Yndestad, 1998]. Als

Massenanalysator findet vor allem die Triple Quadrupol-Technik Verwendung, wobei der erste Quadrupol zur Massenanalyse, der zweite als Kollisionskammer und der dritte zum Scannen der Ionen eingesetzt wird [Ang et al., 2000; Becker et al., 2001; De Baere et al., 2002; Daeseleire et al., 2000; Ito et al., 2001; Riediker et al., 2001]. Ebenfalls Verwendung als Massenanalysator, auch für MS<sup>n</sup>, findet die Ionenfalle (Ion Trap) [Heller und Ngoh, 1998; Holstege et al., 2002; Rabbolini et al., 1998].

### 1.2.10 Höchstmengenregelungen

Für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs sind innerhalb der EU durch die Verordnung EWG/2377/90 Höchstmengenregelungen über MRL-Werte festgesetzt worden [Verordnung EWG/2377/90, 1990]. Tabelle 1 gibt die in allen Mitgliedsstaaten der EU maximal zulässigen Penicillinrückstände in Lebensmitteln wieder.

Antibiotikum	Milch	Muskulatur, Leber, Niere, Fett
Benzylpenicillin	4	50
Ampicillin	4	50
Amoxicillin	4	50
Oxacillin	30	300
Cloxacillin	30	300
Dicloxacillin	30	300
Nafcillin	30	300
Phenoxymethylpenicillin	-	25

**Tabelle 1: Höchstmengen für Penicillinrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs (MRL-Wert in µg/kg)**

Die Rückstandssituation in Lebensmitteln, wie z.B. Milchprodukten, wird national über den Rückstandskontrollplan untersucht [Richtlinie 96/23/EG, 1996; Entscheidung der Kommission 97/747/EG]. Laut dem letzten veröffentlichten Rückstandskontrollplan von 2000 wurde in Deutschland in keiner Milchprobe Penicillin gefunden [BgVV, 2002]. Weitere Untersuchungen zu Tierarzneimittelrückständen finden im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung statt. Hierbei waren im Jahr 2000 bspw. alleine im Untersuchungsamt Karlsruhe 21 Milchproben mit Antibiotika belastet, darunter auch β-

Lactame [CVUA Karlsruhe, 2001], und dies obwohl die Milchindustrie die gesetzlich vorgeschriebenen Eigenkontrollen durchführt. In der internationalen Literatur finden sich Anteile von 0,9 % - 5 % mit Penicillin belasteter Milch [Brady et al., 1988; Collins-Thomson et al., 1988; Suhren et al., 1990; Wehr, 1987].

Die internationale Codex Alimentarius Kommission in Rom unterhält ein sogenanntes horizontales Komitee für Tierarzneimittelrückstände sowie ein vertikales Komitee für Milch- und Milchprodukte. So ist für Benzylpenicillin in Milch ein Grenzwert von 4 µg/kg bzw. 50 µg/kg für Leber, Niere und Muskulatur von Rind und Schwein vorgesehen [Codex Alimentarius, 1995].

## **1.3 Milch und Joghurt**

### **1.3.1 Milch**

Im Sinne der deutschen Milchverordnung ist Milch nach §2 Nr.1 das durch ein- oder mehrmaliges Melken gewonnene unveränderte Eutersekret von zur Milchgewinnung gehaltenen Kühen [MilchVO, 1995]. Milch ist in der EU nach Art. 1 IIa der Verordnung zur gemeinsamen Marktorganisation für Milch und Milcherzeugnisse als das Gemelk einer oder mehrerer Kühe definiert [Verordnung EG/2597/97, 1997]. Auch in der Sammlung der Lebensmittelstandards des Codex Alimentarius sind Grundsätze, Anwendungsbereiche, Begriffsbestimmungen und Kennzeichnung geregelt [Codex Alimentarius, 1999].

Milch hat eine sehr große ernährungsphysiologische und wirtschaftliche Bedeutung. So wurden in der Bundesrepublik Deutschland 2001 pro Kopf 90,9 kg Milch und Milchfrischprodukte (z.B. Milchgetränke und Joghurt) verzehrt, insgesamt 7,48 Mio. t [aid, 2002]. Die deutsche Milchindustrie machte im Jahr 2001 in 129.900 Betrieben einen Umsatz von 21,01 Mrd. € [Milchindustrie-Verband, 2002]. In der EU wurden im selben Jahr 30 Mio. t Konsummilch produziert [European Dairy Association, 2002].

Milch besteht aus 87 % Wasser und 13 % Trockenmasse, davon ca. 4 % Fett. Sie enthält 4,8 % Lactose, 0,6 % Molkenproteine und 2,7 % Caseine. Ernährungsphysiologisch ist sie vor allem eine wichtige Calcium- und Vitaminquelle (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, A, Folsäure, Pantothenensäure) [Eisenbrand und Schreier, 1995].



Im Handel erhältliche Milch ist gereinigte, wärmebehandelte Milch. Hierbei wird unterschieden zwischen Pasteurisation (z.B. 71°C, mind. 15 s) und Ultrahoherhitzung, UHT bzw. H-Milch (100-150 °C 1 s) [Belitz et al., 2001; Eisenbrand und Schreier, 1995].

Zum Einfluss der Erhitzung auf Penicillinrückstände in Milch ist in der Literatur nur wenig beschrieben [Konecny, 1978; Marth and Ellickson, 1959a; Oda und Hiwaki, 1996; Pilet et al., 1969; Shahani et al., 1956] (siehe auch Punkt 3.4.2).

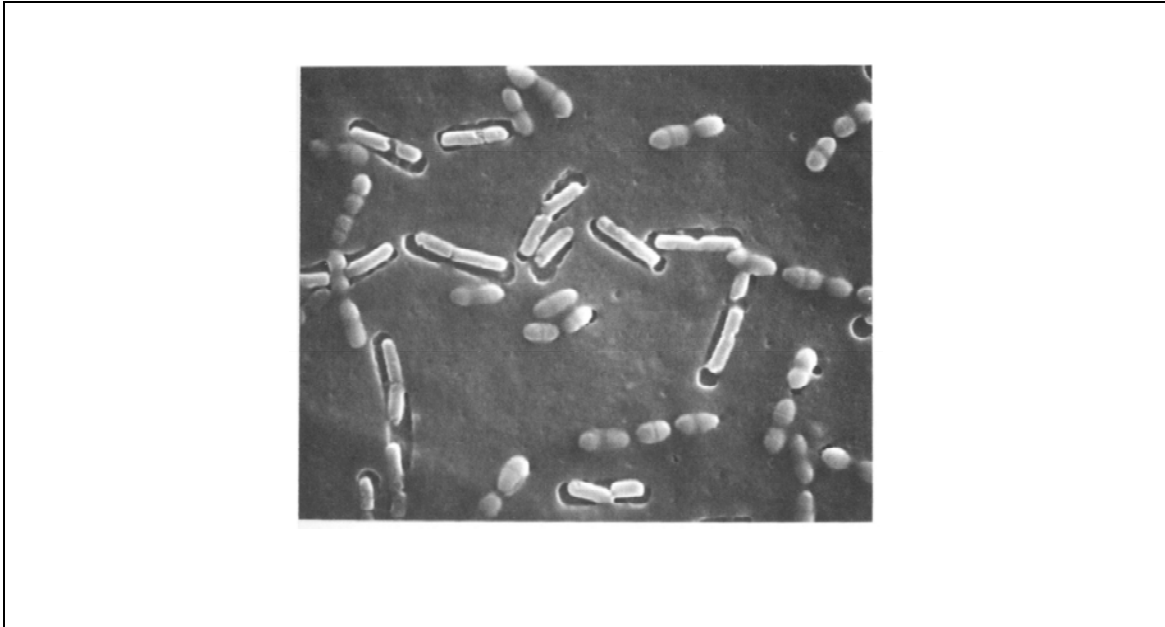
Frauenmilch ist die von der Milchdrüse des weiblichen Menschen während der Laktation abgeschiedene Nährflüssigkeit für Neugeborene [Täufel et al., 1998]. Gegenüber der Kuhmilch enthält sie weniger Protein, dafür aber mehr Kohlenhydrate [Dockter und Grundler, 1995].

### 1.3.2 Joghurt

Die Bezeichnung Joghurt tragen feste oder trinkfähige Sauermilcherzeugnisse, die nach Codex Alimentarius lebende Milchsäurebakterien enthalten müssen [Codex Alimentarius, 1975]. Joghurt ist je nach eingesetzter Milch in verschiedenen Fettgehalten als stichfester Joghurt, Rührjoghurt oder Trinkjoghurt auf dem Markt [Klupsch, 1992; Kurmann et al., 1992; Rasic und Kurmann, 1978]. Nach Milcherzeugnisverordnung enthält ein Joghurterzeugnis als Reifungskulturen überwiegend *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [Verordnung über Milcherzeugnisse, 1970]. Bei *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* handelt es sich um kugelige oder ellipsoide, unbewegliche Bakterien mit einem Durchmesser von 0,7 - 0,9 µm und einem Wachstumsoptimum bei 37 - 42°C. Bei *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* handelt es sich um Stäbchen von 0,2 - 0,4 µm Breite mit einem Wachstumsoptimum bei 42 - 45°C. Beide sind Gram-positiv, anaerob und aerotolerant [Dellaglio et al., 1992; Schlegel, 1992; Spreer, 1995]. Abbildung 12 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Kulturen.

Die Produkteigenschaften eines Joghurts lassen sich steuern über die Impfmenge an Starterkulturen, der Bebrütungstemperatur und Bebrütungszeit. Die Fermentation wird durch Hefen oder einen Sauerstoffgehalt von über 4 mg O<sub>2</sub>/l (*Streptococcus salivarius*

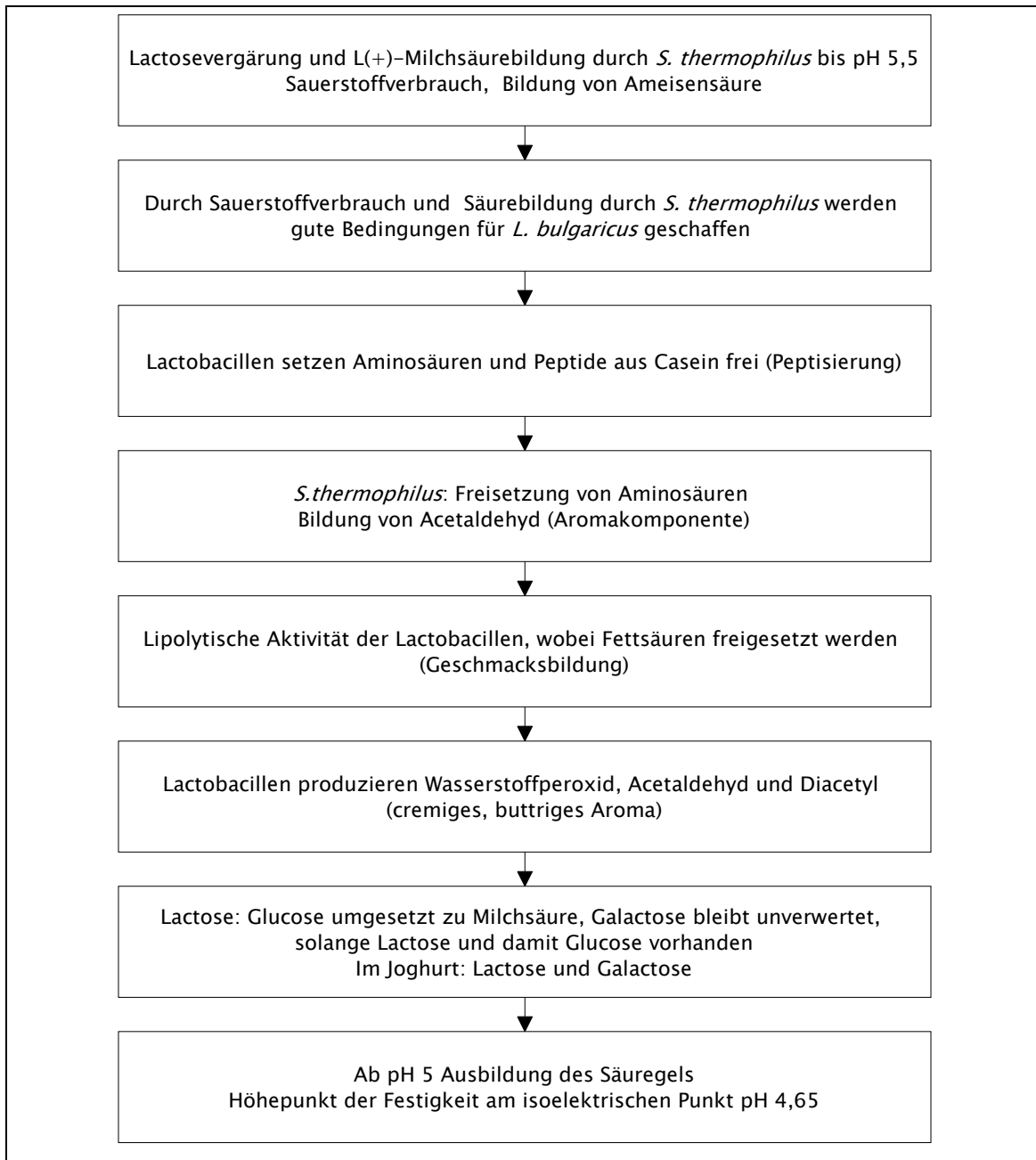
subsp. *thermophilus*) gehemmt. Das Wachstum stoppt bei einem pH-Wert von ca. 4,2. Den Verlauf der Fermentation verdeutlicht Abbildung 13.



**Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Joghurtkulturen [Abbildung entnommen aus: Ramesh und Chandan, 1989]**

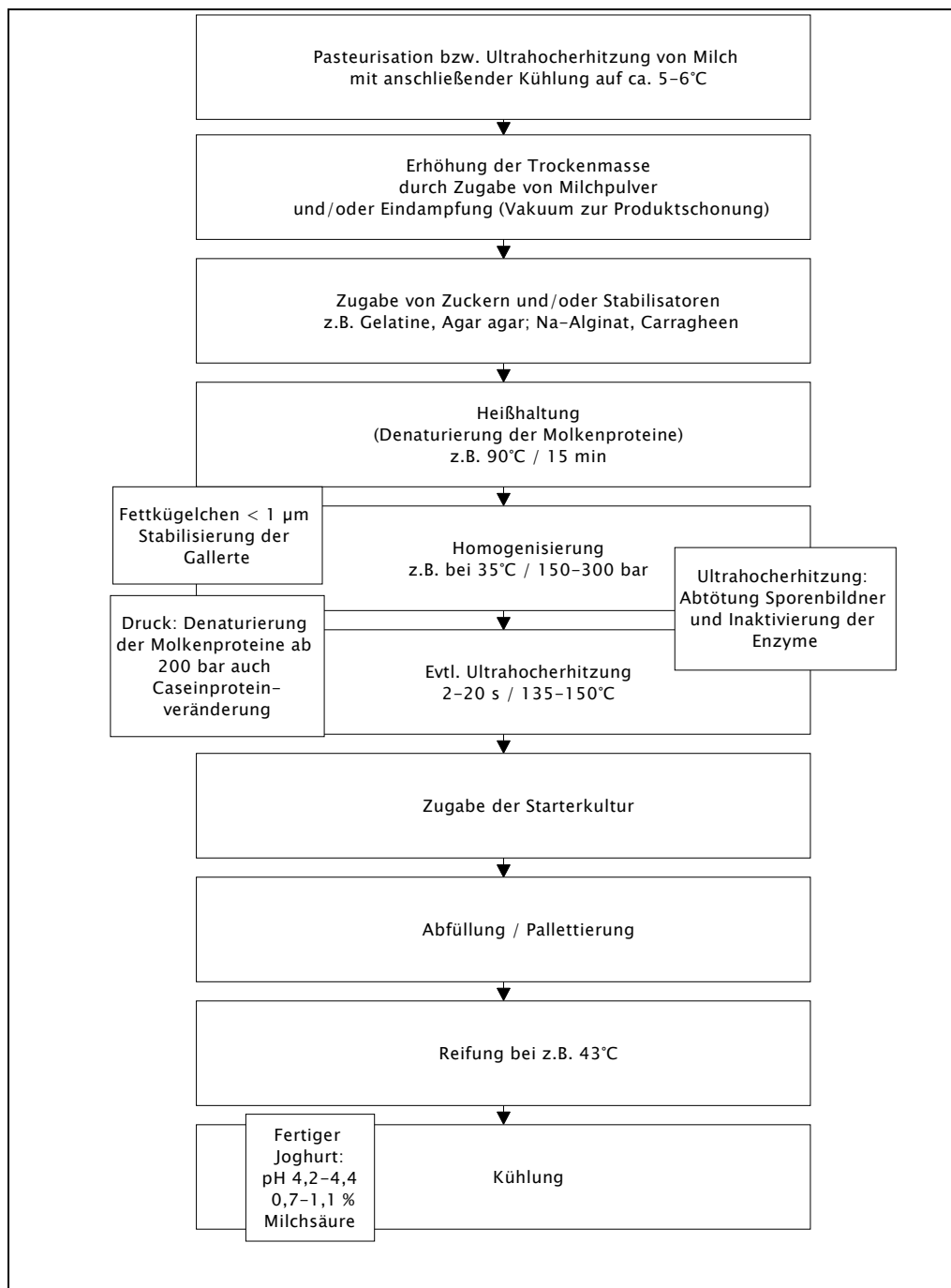
Den Prozess der Joghurtproduktion gibt Abbildung 14 wieder [Baustian, 1981; IDF, 1988; IDF, 1992; Kessler, 1996; Knopf, 1975; Rasic und Kurman, 1978; Robinson und Tamime, 1990; Tamime und Deeth, 1980]. Dabei kann die Reihenfolge von Heisshaltungsphase und Homogenisierung auch umgekehrt sein.

Die Erhitzung der Milch auf z.B. 90 °C bringt eine Abschwächung der Hydrophobität der Micelloberfläche der Caseine, weil die denaturierten Molkenproteine, bspw.  $\beta$ -Lactoglobulin, an Kappa-Casein anlagern, wobei hydrophobe Gruppen abgeschottet werden. Durch die Säurebildung bei der Fermentation verändern sich die Micellstrukturen, da Calciumphosphat und monomere Caseine auswandern. Unter Quellung können die Micellen hierbei ihren Umfang aufrechterhalten. Bei der Koagulation reassoziieren die gelösten monomeren Caseine mit den Micellen, welche je nach Temperierung in unterschiedlichem Verhältnis vorliegen, und bilden so gröbere oder weichere Gelnetzwerke. Je niedriger die Temperatur bei der Erhitzung gewählt wird, desto festere, gröbere Gele entstehen. Durch höhere Temperaturen (z.B. 130 °C) entstehen weiche, glatte Gele [Belitz et al., 2001].



**Abbildung 13: Verlauf der Joghurtfermentation [Davis et al., 1971; Dreissen et al., 1983; Groß, 1990; Spreer, 1995]**

Durch eingelagerte Fettkügelchen ist das entstehende Proteinnetzwerk weniger stabil, daher ist die Stabilität eines Magermilchjoghurts größer als die eines Vollmilchjoghurts.



**Abbildung 14: Prozess einer Joghurtproduktion (Literatur siehe Text)**

Ein Standardjoghurt ist bei < 10 °C 8 bis 10 Tage ohne Qualitätsverlust haltbar. Man unterscheidet zwischen „Aseptischer Produktion“ und „Thermischem Konservieren“. Bei der „Aseptischen Produktion“ wird die wärmebehandelte Milch frei von Kontaminationen mit Fremdkeimem gehalten, dabei wird in einer hermetisch

geschlossenen Produktionsanlage gearbeitet. Beim „Thermischen Konservieren“ wird der Joghurt nach der Produktion erhitzt, für einen stichfesten Joghurt auf 72 - 75 °C. Produkte mit einem Mindesthaltbarkeitsdatum von > 10 Tagen erhält man durch eine UHT-Behandlung nach der Produktion [Spreer, 1995].

### 1.3.3 Joghurtkulturen und Antibiotika

Penicilline haben ab ca. 2 µg/kg einen Einfluss auf Joghurtkulturen. Dabei wird Benzylpenicillin von keinem anderen Penicillin in der Wirkung übertroffen. Die Literatur zu diesem Bereich ist vielfältig. Schon in den fünfziger Jahren wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt [Jepsen und Overby, 1951; Marth und Ellickson, 1959b]. Das Thema wurde von verschiedenen Standpunkten aus betrachtet. So wurde der Einfluss von Penicillinen mit dem anderer Antibiotika verglichen [Celik, 1992; Lim et al., 1995; Schiffmann et al., 1992; Teply und Cerminova, 1974]. Auch verschiedene Penicilline wie Cloxacillin [Cogan, 1972; Loussouarn, 1983] oder Amoxicillin [Milashki, 1990] wurden untersucht. Es wurden Versuche mit isolierten Kulturen durchgeführt, die aus kommerziellen Joghurts stammten [Brindani et al., 1994], das Verhalten der Kulturen beobachtet [Kondratenko et al., 1978] und der Bezug zur Resistenzproblematik hergestellt [Bozoglu et al., 1996]. Der Einfluss von Penicillinen auf Konsistenz, Geruch und Aroma ist untersucht [Holec und Klimes, 1964; Jakimov, 1970; Mäyra-Mäkinen, 1995; Nikolov, 1966]. Literatur, die die Thematik umfassend behandelt, liegt vor [Suhren, 1996; Tamime und Robinson, 1999].

<b>Autor (Jahr)</b>	<b>Einfluss von Benzylpenicillin auf Joghurtkulturen</b>
Bozoglu (1996)	> 2 µg/kg
Cogan (1972)	> 7 µg/kg
Kondratenko (1978)	> 4 µg/kg
Loussouarn (1983)	> 5 µg/kg
Mäyra-Mäkinen (1995)	> 6 µg/kg
Marth (1959)	> 2 µg/kg
Nikolov (1966)	> 2 µg/kg
Schiffmann (1992)	> 6 µg/kg
Suhren (1996)	> 4 µg/kg
Teply (1974)	> 6 µg/kg

**Tabelle 2: Ausgewählte Literatur zum Einfluss von Benzylpenicillin auf Starterkulturen**

Die Wirkung der Antibiotika auf die Starterkulturen ist konzentrationsabhängig. Bei Rückstandsmengen am MRL-Wert verzögert sich die Koagulation zunächst nur. Bei höheren Antibiotikakonzentrationen findet kein Wachstum mehr statt [Kondratenko et al., 1978]. Je nach Penicillin kann bei niedrigen Konzentrationen noch eine Zunahme der Kokken und ein Längenwachstum der Stäbchen beobachtet werden, jedoch verzögert sich die Säurebildung und die Koagulation. Ab Konzentrationen von ca. 4 µg/kg verformen sich die Kokken und die Stäbchen bilden Hohlräume aus. Oberhalb von 120 µg/kg findet kein Wachstum mehr statt [Kondratenko et al., 1978]. Bei Cloxacillin zeigen sich erst bei höheren Konzentrationen Wirkungen. Auch der Einfluss auf die Kulturen ist unterschiedlich. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* reagiert gegenüber Penicillin G empfindlicher (ab ca. 2 µg/kg) als *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ab ca. 26 µg/kg), bei den Isoxazolylpenicillinen sind die Unterschiede zwischen den Kulturen geringer.

Schon längere Zeit wurde vermutet, dass einige Milchsäurebakterien auch selbst befähigt sind, antibiotisch wirksame Stoffwechselprodukte zu bilden [Emanuiloff, 1956; Yazicioglu und Yilmaz, 1966]. In der neueren Literatur wurden vielfach Milchsäurebakterienstämme isoliert und auf ihre Fähigkeit zur Produktion von Antibiotika getestet. So wurde schon Anfang der siebziger Jahre eine antibakterielle Aktivität in einer Mischung aus *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* festgestellt [Singh et al. 1973]. Letztere Species zeigt eine größere antibakterielle Aktivität. Die Ursache liegt zumeist in antibakteriell wirksamen Peptiden, die das Wachstum des Produzenten aber nicht beeinflussen. In der jüngsten Literatur sind folgende Bacteriocine detailliert untersucht worden: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* [Aktypis et al., 1998; De Vuyst und Vandamme, 1994; De Vuyst, 1994; Ivanova et al., 1998; Pulusani et al., 1979; Villani et al., 1995; Ward und Somkuti, 1995] *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [Abdel-Bae et al., 1987; Shahani et al., 1976; Balasubramanyam und Varadaraj, 1998] und andere Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* oder *Lactobacillus acidophilus* [Barefoot und Nettles, 1993; Bogovic-Matijasic et al., 1998; Dave und Shah, 1997; Huot et al., 1996; Oh et al., 2000; Sánchez et al., 2000; Sablon et al., 2000].

---

## 1.4 Zielsetzung

In der amtlichen Überwachung, in Handelslaboratorien und der industriellen Eigenkontrolle sind Verfahren zur Bestimmung von Tierarzneimittelrückständen in Milch im Einsatz. Dies geschieht aus Verbraucherschutz Gesichtspunkten, aber auch aus Gründen der reibungslosen lebensmitteltechnologischen Praxis.

So sind für die amtliche Überwachung und die Handelslaboratorien, ebenso wie für Molkereien und milchverarbeitende Betriebe nicht nur schnelle und sichere Screening-Tests, sondern auch Methoden zur Identifizierung und exakten Quantifizierung der Wirkstoffe zur rechtlichen Beurteilung unerlässlich.

In der Praxis häufig angewandte Screening-Tests sollten mit der bereits durch Ibach [Ibach, 1999] etablierten Methode zur Bestimmung von Isoxazolylpenicillinen im Rahmen dieser Arbeit verglichen werden, um eine Aussage über die Zuverlässigkeit der Tests treffen zu können (Punkt 2.1 / 3.1).

Des Weiteren war ein Ziel, eine HPLC-Methode für weitere Penicilline in Milch zu entwickeln, um der Überwachung eine möglichst breit anwendbare, apparativ preiswerte und einfache Methode zur Verfügung zu stellen (Punkt 2.2 / 3.2 und 2.3 / 3.3).

Obgleich Penicilline eine der ältesten Antibiotikaklassen sind und in der Human- und Tiermedizin häufig Anwendung finden, ist wenig über Veränderungen von Penicillinen während technologischer Prozesse bekannt. Die Codex Alimentarius Kommission der FAO und der WHO der Vereinten Nationen hat in ihrem Bericht aus dem Jahre 2001 festgestellt, dass die Verarbeitung von Nahrungsmitteln Einfluss auf Tierarzneimittelrückstände haben kann. Hierzu sei in der Literatur nur wenig beschrieben, so dass zusätzliche Studien in diesem Bereich benötigt werden [Codex Alimentarius Commission, 2001]. Die Konzentration der Penicilline kann sich während technologischer Prozesse ändern, die freie Verfügbarkeit und damit die Erfassung in analytischen Bestimmungsverfahren ist unter Umständen nicht mehr gewährleistet und entstehende Abbauprodukte können ein unbekanntes Risiko wie z.B. Allergien für den Verbraucher darstellen.

Daher wurde das Verhalten von Penicillin bei verschiedenen Prozessschritten während der Joghurtproduktion verfolgt. Hierbei waren die Heisshaltungsphase der Milch und

die Fermentation mittels Joghurtkulturen von besonderem Interesse. Fragestellungen wie der Abbau von Penicillinen durch Erhitzung in der Milch im Vergleich zum Abbau in Wasser und der Einfluss der Fermentationsparameter Temperatur, Zeit, Milch-Matrix und Starterkulturen auf entstehende Penicillin-Abbauprodukte, wie z.B. Penicilloylsäuren oder Penicillinpolymere, sollte untersucht werden (Punkt 2.4 / 3.4). Ebenso sollte geklärt werden, in welchem Maße Penicilline an die Milchproteine binden (Punkt 2.5 / 3.5).



## 2 Experimenteller Teil

### 2.1 Vergleich unterschiedlicher Screening-Methoden mit quantitativer HPLC für die Penicillinanalytik in der Milch erkrankter, behandelter Kühe

Laut §16 Milchverordnung [Milch-VO, 1995] müssen Molkereien über betriebseigene Kontrollen Milch auf Tierarzneimittelrückstände untersuchen. Zu diesem Zweck werden Screening-Tests verwendet. Ursache für die positiven Screening-Befunde sind oft  $\beta$ -Lactam-Antibiotika [Suhren, 2002].

Für die Zulassung von Tierarzneimitteln, die zur Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren vorgesehen sind, müssen in der EU den Zulassungsbehörden Rückstandsdaten von gesunden Tieren geliefert werden, die mit dem betreffenden Arzneimittel behandelt wurden. Aus Tierschutzgründen wird darauf verzichtet, Tiere für Rückstandsstudien künstlich mit Krankheitserregern zu infizieren. Eine Entzündung des Euters, wie sie Ursache für eine Antibiotikabehandlung in der Praxis darstellt, könnte jedoch gegenüber einem gesunden Euter zu einer verzögerten Ausscheidung von Antibiotika über die Milch führen. Es steht in Frage, ob die für gesunde Tiere ermittelten Wartezeiten auch für kranke Tiere hinreichend sind und ob die festgesetzten MRL innerhalb der Wartezeit zuverlässig unterschritten werden.

In einer Pilotstudie zu dieser Fragestellung wurden vier an Mastitis erkrankte Kühe mit dem in Deutschland mit einer Wartezeit von sechs Tagen zugelassenen Tierarzneimittel Eumacid<sup>®</sup> intramammär am infizierten Euterviertel zweimal behandelt (Punkt 5.1). Als antibiotisch wirksame Komponente enthält Eumacid<sup>®</sup> das Isoxazolylpenicillin Cloxacillin. Die bei den erkrankten Kühen festgestellten Mastitiserreger gibt Tabelle 3 wieder.

Kuh	Erreger
1	Vermutlich Infektion mit <i>Escherichia Coli</i> und <i>Streptokoccus uberis</i>
2	Infektion mit Hefe
3	Infektion mit <i>Streptokoccus uberis</i>
4	Infektion mit <i>Streptokoccus uberis</i>

**Tabelle 3: Infektionsart der behandelten Kühe**

Die von den behandelten Kühen erhaltenen Gesamtgemelke wurden mittels vier qualitativer Screening-Verfahren

- BR-AS spezial<sup>®</sup> (spezieller Brilliantschwarz-Reduktionstest zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamid-Rückständen in Milch),
- Delvotest SP<sup>®</sup> (mikrobiologischer Hemmstofftest zum Nachweis in Milch),
- Penzym S<sup>®</sup> (Rezeptortest über Enzym der Mureinbiosynthese),
- Snaptest<sup>®</sup> (Rezeptortest)

auf die Anwesenheit von Rückständen geprüft. Die dabei erhaltenen Befunde wurden mit den Daten verglichen, die mittels quantitativer HPLC erhalten wurden (Zentrifugation und Ultrafiltration der Milchproben, anschließende on-line SPE unter Verwendung von RAM, chromatographische Trennung mittels C-18 Säule und photochemischer Derivatisierung mit UV-Detektion [Ibach und Petz, 1998]). Die Screening-Tests wurden in der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel und die HPLC-Analysen an der Bergischen Universität GH Wuppertal unabhängig voneinander durchgeführt, ohne dass die Ergebnisse dem jeweils anderen Labor vor Abschluss der Analysen bekannt waren.

Die folgenden Tabellen 4-7 fassen die Ergebnisse der Screening-Tests zusammen, ein „+“ steht hierbei für einen positiven Befund (Cloxacillin nachgewiesen), ein „-“ für einen negativen Befund (kein Cloxacillin nachweisbar) sowie „+/-“ für ein fragliches Ergebnis. Bei den Tests in den Tabellen 4 und 5 wurde zusätzlich die Penicillinaseempfindlichkeit geprüft. Die mit B bezeichneten Proben wurden mit Penicillinase behandelt, die mit A bezeichneten Proben nicht. Bei der ermolkenen Milch handelt es sich um Morgen- bzw. Abendgemelk (Melkzeit), d.h. nach der ersten Injektion wurde gemolken, danach jeweils morgens und abends.

BR AS spezial<sup>®</sup>

Melkzeit	Kuh							
	1		2		3		4	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	+	-	+	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	+	-	+	-
3	+	-	+	-	+	-	+	-
4	+	+	+	-	+	-	+	-
5	+	-	-	-	+	-	+	-
6	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 4: Ergebnis des BR AS spezial<sup>®</sup> Screening-Verfahrens

Delvotest SP®

Melkzeit	Kuh							
	1		2		3		4	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	+	-	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	-	+	+	+	-
3	+	-	+	-	+	-	+	-
4	+	+	+	-	+	+	+	-
5	+	-	-	-	+	-	+	-
6	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	+	-	-

**Tabelle 5: Ergebnis des Delvotest SP® Screening-Verfahrens**

Penzym S®

Melkzeit	Kuh			
	1	2	3	4
1	-	+	-	-
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+/-
4	+	+	+	+
5	+	-	+	+/-
6	+	-	-	-
7	-	-	-	-

**Tabelle 6: Ergebnis des Penzym S® Test Screening-Verfahrens**

Snap-Test®

Melkzeit	Kuh			
	1	2	3	4
1	+	+	-	-
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	-	+	+
6	+	-	-	-
7	-	-	-	-

**Tabelle 7: Ergebnis des Snap® Test Screening-Verfahrens**

Die in Tabelle 8 zum Vergleich angegebenen quantitativen HPLC-Resultate geben die Einzelwerte von zwei Doppelbestimmungen an (vier separate Aufarbeitungen: je Gemelk zwei Proben, je zwei Aufarbeitungen). Wobei die Proben a und b je Melkzeit getrennt lyophilisiert wurden. Die Ergebnisse wurden nicht um die Verfahrenswiederfindung von 70 % korrigiert.

Melkzeit / Probe*	Kuh			
	1	2	3	4
1/a	43 / 43	10056 / 9969	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG
1/b	86 / 85	9285 / 9459	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG
2/a	18257 / 18272	46 / 50	6997 / 7471	4550 / 4849
2/b	20215 / 20312	36 / 33	7738 / 7740	5227 / 5134
3/a	485 / 494	<NWG / <NWG	322 / 355	23 / 27
3/b	401 / 367	4301 / 4385	334 / 330	20 / 20
4/a	13865 / 13834	46 / 45	7901 / 8036	1507 / 1485
4/b	14476 / 14379	49 / 49	6555 / 6557	4422 / 4342
5/a	17154 / 17236	33 / 30	227 / 227	36 / 54
5/b	1283 / 1357	4186 / 4116	285 / 267	32 / 33
6/a	89 / 89	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG
6/b	83 / 84	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG
7/a	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG
7/b	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG	<NWG / <NWG

\*Angegeben sind jeweils die Einzelwerte der Doppelbestimmung.

**Tabelle 8: Ergebnis der HPLC-Bestimmung (Cloxacillin in µg/kg)**

Der Vergleich der vier qualitativen Tests zeigt eine ausgezeichnete Korrelation mit der quantitativen HPLC-Methode, z.B. in den positiven Resultaten für Gemelk 1 bei den Kühen 1 und 2 und den negativen Befunden für das Gemelk 1 bei den Kühen 3 und 4. Die Zunahme der Cloxacillinkonzentration nach der Melkzeit 3 bzw. 4 war durch die laut Anwendungsinformation vorzunehmende wiederholte Behandlung der Kühe mit Eumacid® bedingt. Alle Proben ergaben zur Melkzeit 7 (= 3½ Tage) Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC-Methode von 7 µg/kg. Bei dreien der vier Kühe war die Nachweisgrenze bereits beim 6. Gemelk unterschritten. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Screening-Methoden überein. Zur Fragestellung der Wartezeiten konnte festgestellt werden, dass die vorgeschriebene Wartezeit von 6 Tagen nach der Behandlung eine gute Sicherheit bezogen auf die Rückstände gewährleistet,

besonders angesichts der Tatsache, dass die Kühe zweimal behandelt wurden und die Milchproben von erkrankten und nicht von gesunden Kühen stammten. Es ist eine Nachinjektion innerhalb der ersten 24 Stunden für dieses Präparat vorgesehen.

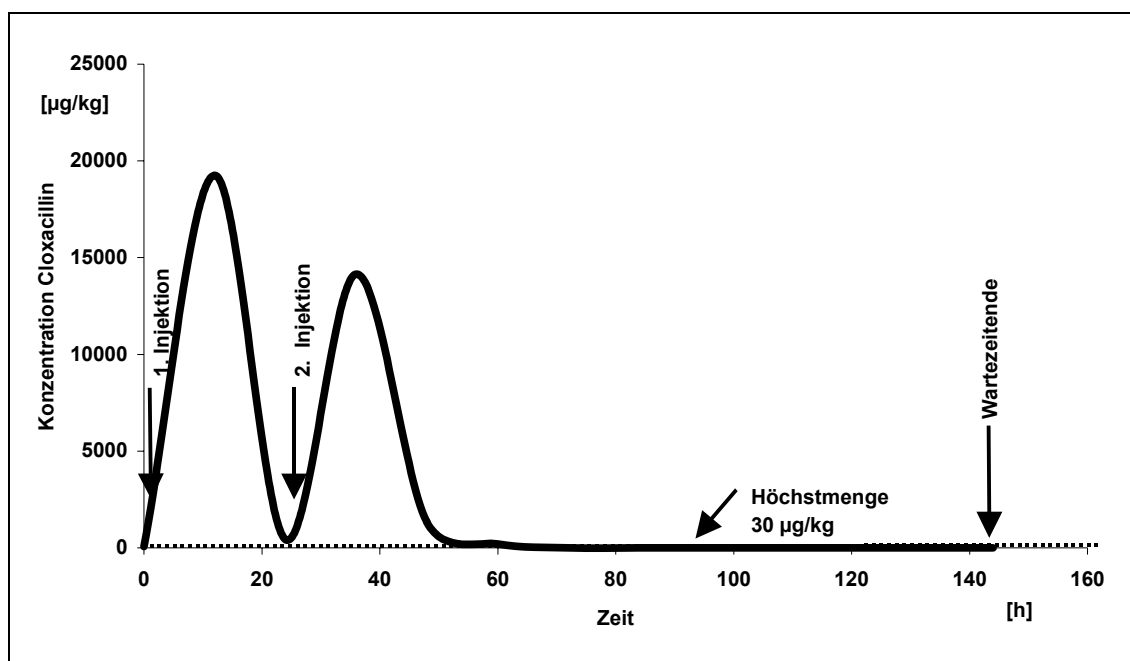


Abbildung 15: Eliminationskinetik von Cloxacillin (nach Werten der Kuh 1)

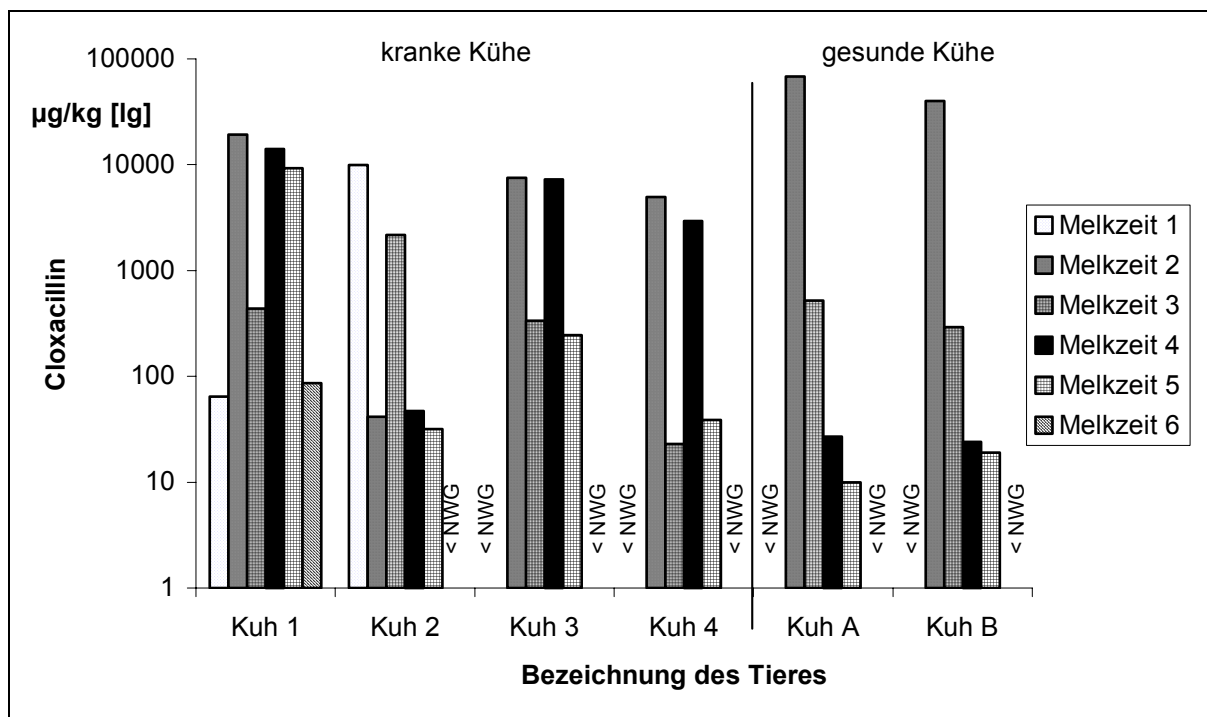
Einige der HPLC-Resultate lagen nahe des MRL-Wertes von 30 µg/kg. Hier zeigte sich im Vergleich, dass der Penzym S<sup>®</sup>-Test etwas weniger empfindlich war als die anderen Screening-Tests, da nur bei diesem Test Ergebnisse, wie bei Kuh Nr. 4 bei der Melkzeit 3 und 5 oder wie bei Kuh Nr. 1 bei der Melkzeit 1, als fraglich bzw. falschnegativ beurteilt wurden. Er erbrachte aber keine falschpositiven Resultate. Der Delvo SP<sup>®</sup>-Test zeigte unter Penicillinasezusatz bei Kuh Nr. 3 zur Melkzeit 7 ein falschpositives Resultat.

Für die divergierenden Ergebnisse bei einigen Doppelbestimmungen der HPLC-Methode, z.B. Kuh 1 bei Melkzeit 5 oder Kuh 2 bei Melkzeit 3, konnte keine Erklärung gefunden werden. Es scheint nicht im analytischen Verfahren begründet zu sein, da für die Doppelbestimmung der Proben jeweils vergleichbare Resultate erzielt wurden.

Um das Vorhandensein von Antibiotikarückständen zu bestätigen, wurde beim BR AS Spezial<sup>®</sup> sowie beim Delvo SP<sup>®</sup>-Test Penicillinase zugegeben. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Methodik sinnvoll ist, da nur dann eine positive Rückstandssituation

festgestellt wurde, wenn Cloxacillin in sehr hoher Konzentration vorlag. Dies ist mit der hohen Penicillinase Stabilität der Isoxazolylpenicilline zu begründen [Schröder et al., 1982].

Abbildung 16 zeigt einen Vergleich der HPLC-Werte aus Tabelle 8, bestimmt aus der Milch von erkrankten Kühen mit Werten aus einer Studie von Ibach [Ibach, 1999]. Bei dieser Studie wurden gesunde Tiere auf dieselbe Weise mit demselben Medikament behandelt. Die analytische Methode inklusive der verwendeten Geräte waren identisch. Einziger Unterschied war, dass die Medikation mit Eumacid® bei diesen Versuchen nicht wiederholt wurde, sondern nur am Tag 0 stattfand, also unmittelbar vor Melkzeit 1.



**Abbildung 16: Vergleich des Cloxacillingehaltes der Milch von kranken mit gesunden Tieren (Ergebnisse der HPLC-Analyse)**

(Bei den erkrankten Tieren wurde im Unterschied zu den gesunden die Behandlung am Tag nach der Erstmedikation wiederholt.)

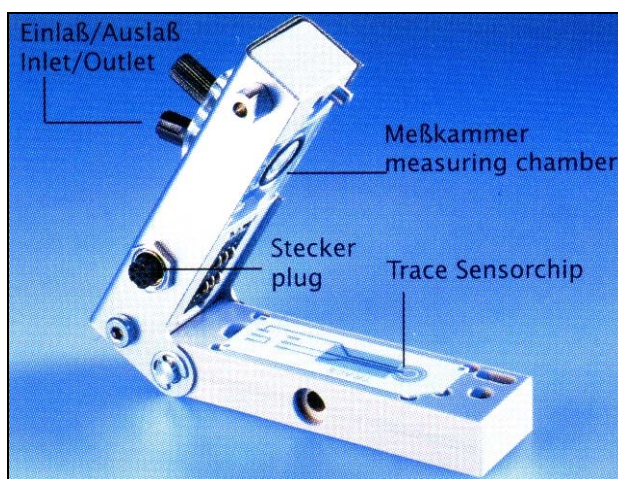
Die Grafik zeigt höhere Konzentrationen an Cloxacillin bei der Melkzeit 2 für die gesunden Tiere. Diese Unterschiede sind jedoch für die tierärztliche Praxis nicht relevant. Zwischen erkrankten und gesunden Tieren zeigten sich nach der letzten Ausscheidung keine auffälligen Unterschiede in der Kinetik der Rückstandselimination. Die Aussagekraft des Vergleiches ist begrenzt, da es sich um zwei Medikationsstudien handelt. Durchführende Personen, Kuhrasen etc. waren unterschiedlich. Allerdings beide Male in der Bundesanstalt für Milchforschung, die mit dem gleichen Präparat, in gleicher Konzentration durchgeführt wurden. Die Gemelke wurden am selben Institut mit den selben Verfahren und Anlagen analysiert.

## **2.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von Penicillinen mittels elektrochemischer Detektion**

Ausgangspunkt für die Versuche mit dem elektrochemischen Detektor war die von Ibach [Ibach, 1999] entwickelte HPLC-Methode zur Bestimmung dreier Isoxazolympenicilline in Milch unter Einsatz von Restricted-Access Material für die on-line Festphasenextraktion und einer photochemischen Nachsäulenderivatisierung. Neben den drei Isoxazolympenicillinen Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin sollte die Methode, die in der Studie unter Punkt 2.1 ihre Praxistauglichkeit gezeigt hat, unter Verwendung der elektrochemischen Detektion, um andere Penicilline erweitert werden. Da monobasische Penicilline (Penicillin G, Penicillin V, Methicillin, Nafcillin, Isoxazolympenicilline) keine funktionellen Gruppen besitzen, die eine gute elektrochemische Detektion ermöglichen, ist eine vorausgehende photochemische Derivatisierung nötig. Die Wirkung einer Bestrahlung bei 254 nm mit Detektion an einer Silber / Silberchlorid-Elektroden-Detektion wurde beschrieben [Lihl, 1995].

Die amperometrische Detektion mit einer neuartigen Elektrode, einer „wall jet“-Messzelle mit auswechselbarem Elektrodenmaterial, sollte die Empfindlichkeit der Analysenmethode erhöhen. Abbildung 17 zeigt eine Fließzelle zum Anschluss als Elektrode an „Basiseinheiten“ elektrochemischer Detektoren. Durch die „wall jet“-Messzelle sollte die Nachweisempfindlichkeit der Analyten erhöht und die Handhabung vereinfacht werden.

In dieser Fließzelle kann der Elektrodenchip durch einfaches Entnehmen leicht gewechselt werden (siehe Abbildung 17). Als Elektroden wurden die Materialien Gold, Platin, Kupfer und Graphit verwendet. In neueren Veröffentlichungen ist für Penicilline die Verwendung von Gold als Elektrode bekannt [Dasenbrock und LaCourse, 1998; Koprowski et al., 1993; Kirchmann et al., 1994]. Es wurde überprüft, ob dies auch für die photochemisch derivatisierten Penicilline bestätigt werden kann. Hierzu wurden Voltammogramme, also die Abhängigkeit von Potential zur Stromstärke, für jede angegebene Elektrodenart aufgenommen. Anschließend wurde der geeignete Potentialbereich für die Penicilline ermittelt.



**Abbildung 17: Messzelle des elektrochemischen Detektors [entnommen aus: TRACE-Biotech, 2000]**

Als Testsubstanzen wurden zunächst die von Ibach untersuchten Isoxazolympenicilline für die Versuche gewählt. Bestimmt wurde der resultierende Strom in Abhängigkeit vom angelegten Potential im Eluat der Trennsäule nach Bestrahlung mit einer Hg<sub>254</sub>-Lampe (Elutionsmittel siehe Punkt 5.2.1.2). Der Response der Analyten stieg mit zunehmendem Potential. Ebenso stieg auch der Grundstrom, die Basislinie, an. Dieser Effekt wurde berücksichtigt, indem das Verhältnis von Signalstärke zu Grundrauschen, also Analytstrom zu Grundstrom, in Abbildung 18 dargestellt wurde. Das günstigste Ansprechverhalten ergab sich für die drei Isoxazolympenicilline, die in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt wurden, bei einem Potentialbereich von ca. 400 bzw. 800 mV. Als günstigstes Elektrodenmaterial ergab sich, wie Abbildung 18 zeigt, das Gold, da bei einem niedrigeren Potential von 400-500 mV ein gutes Signal-



Rausch-Verhältnis resultierte. Das ebenfalls günstige Potential von ca. 800 mV für Graphit ist für das Probenmaterial Milch schlechter geeignet, da bei einem höheren Potential auch vermehrt Störungen durch Matrixbestandteile in der Detektion festgestellt wurden. Die Kupferelektrode lieferte aufgrund eines zu hohen Grundstroms keine verwertbaren Ergebnisse.

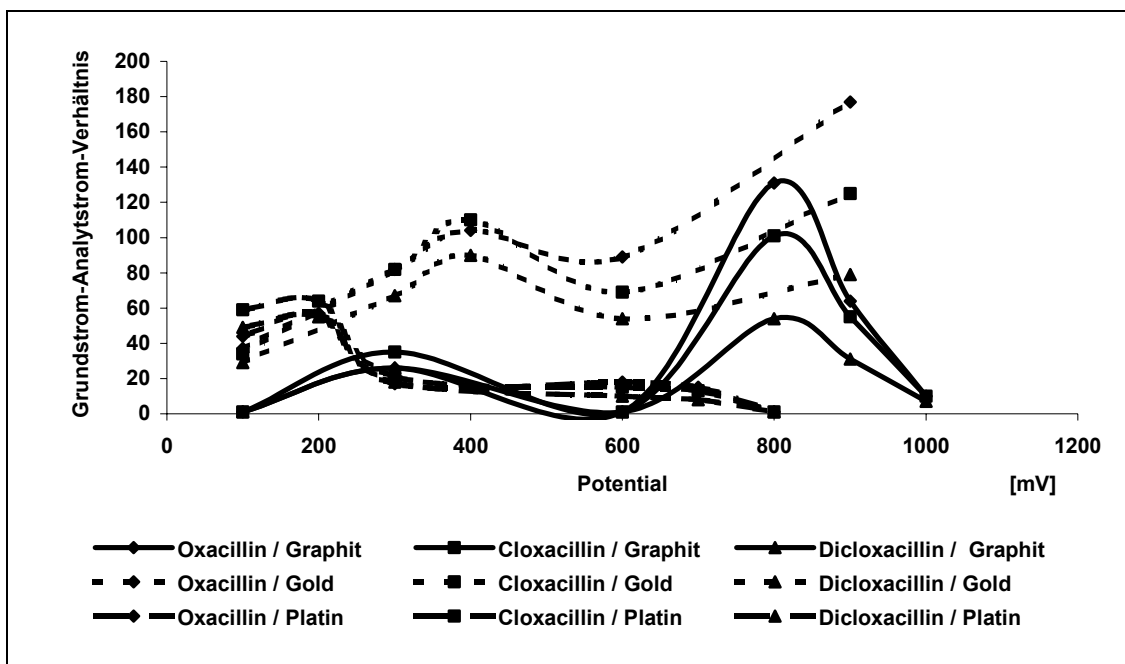
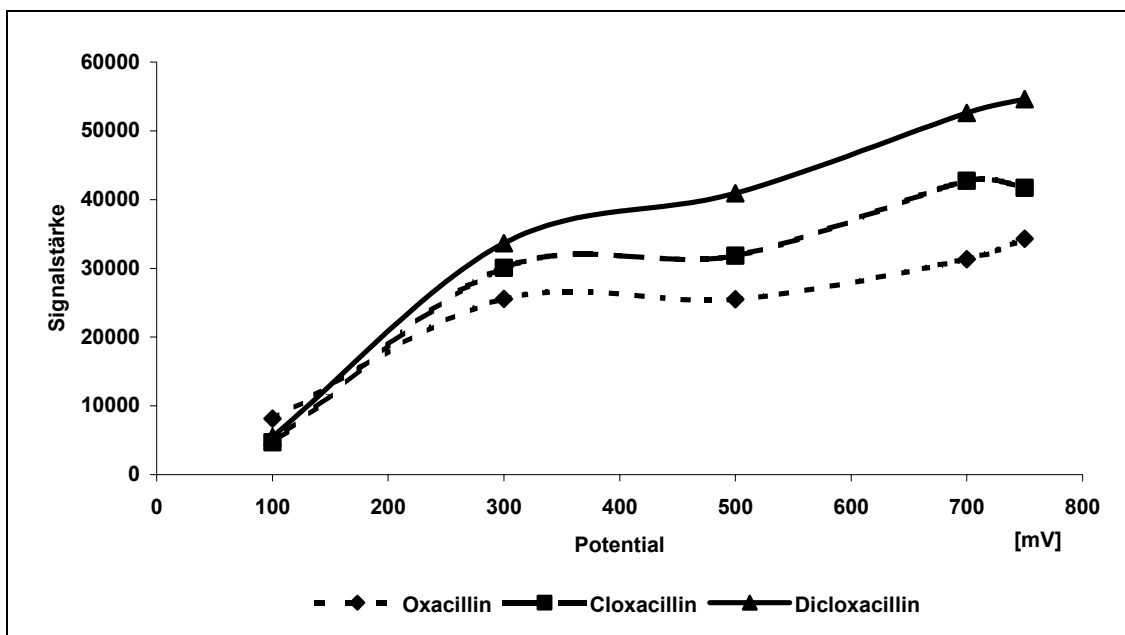


Abbildung 18: Vergleich der Elektrodenmaterialien der elektrochemischen Messzelle für die Isoxazolympenicilline über einen Potentialbereich von 100-1.000 mV nach Bestrahlung (jeweils 2 µg/ml)

Abbildung 19 zeigt die resultierende Signalstärke über die Peakhöhe des Chromatogramms für die Isoxazolympenicilline nach der photochemischen Reaktion an einer Goldelektrode in Abhängigkeit vom angelegten Potential.



**Abbildung 19: Abhängigkeit der Signalstärke der Isoxazolylicpenicilline vom Potential für die Goldelektrode über einen Potentialbereich von 100-750mV nach Bestrahlung (jeweils 2 µg/ml)**

Flucloxacillin konnte als Isoxazolylicpenicillin, aufgrund der damit sehr ähnlichen Eigenschaften zu Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin, unter gleichen analytischen Bedingungen in die vorliegende Methode integriert werden. Das Erfassen weiterer Penicilline konnte nicht realisiert werden, da Ampicillin, Amoxicillin und Methicillin mit dem vorgegebenen chromatographischen System nicht getrennt werden konnten. Die Anreicherung an einem C<sub>18</sub>-Material war ohne Änderung der Methode nicht möglich. Für die Penicilline Nafcillin, Penicillin G und Penicillin V konnte ein chromatographisches Signal beobachtet werden. Abbildung 20 zeigt die resultierenden Signalstärken an der Goldelektrode in Abhängigkeit vom angelegten Potential nach der photochemischen Reaktion. Während Nafcillin und Penicillin V auf die Potentialänderung ansprechen, ist bei Penicillin G das Signal kaum vom Grundrauschen zu unterscheiden. Es ist somit auch dem Penicillin G nicht eindeutig zuzuordnen.

Als Optimum für die Penicilline in Milch erwies sich ein Potential von 600 mV, da bei höheren Werten vermehrt Matrixstörungen der Milch auftraten und bei niedrigeren Werten das entstehende Signal zu klein wurde.

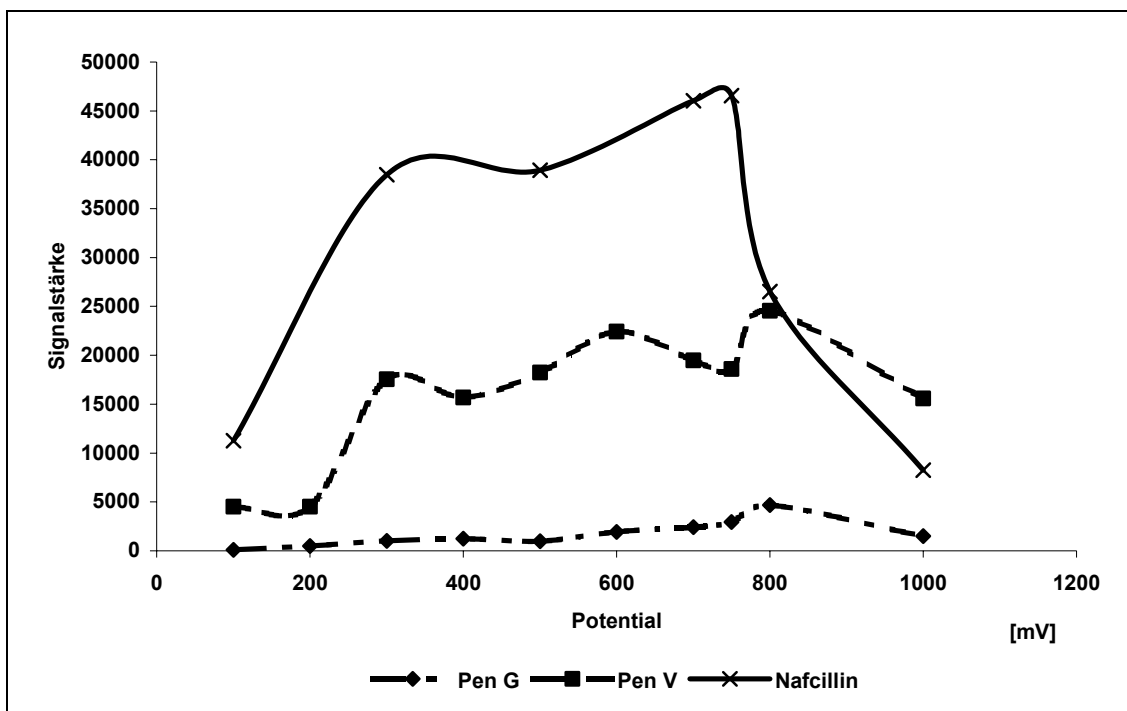


Abbildung 20: Abhängigkeit der Signalstärke von Penicillin G, Penicillin V und Nafcillin vom Potential für die Goldelektrode über einen Potentialbereich von 100-1.000 mV nach Bestrahlung

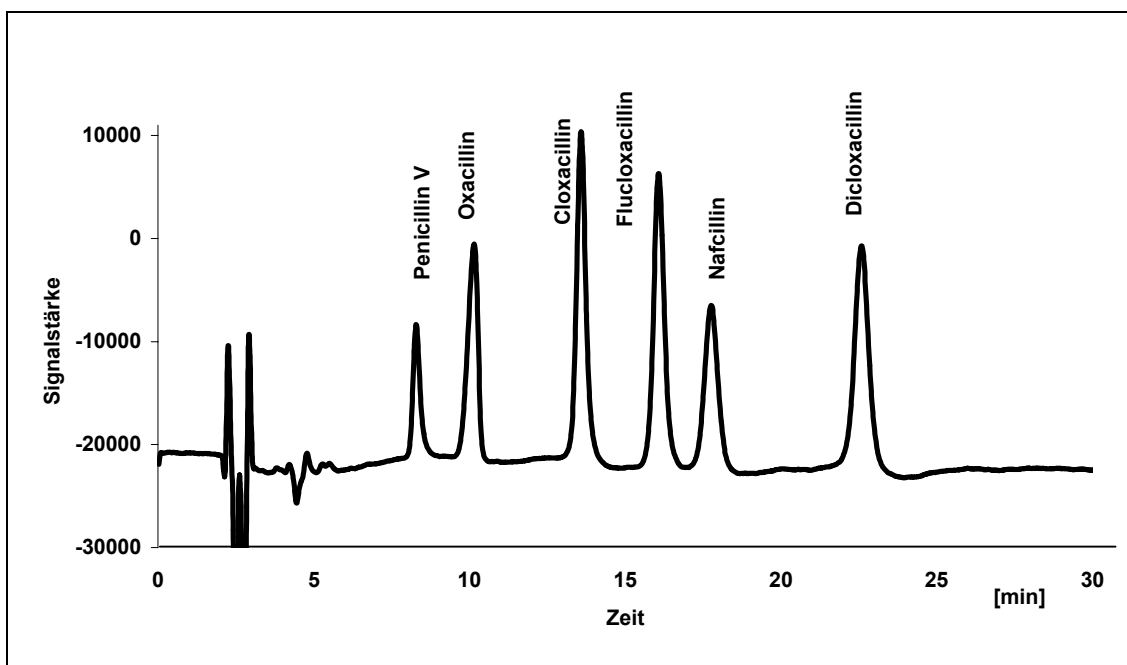


Abbildung 21: Chromatogramm der Penicillinstandards (100 ng/ml entsprechen 100 µg/kg in einer Probe mit Matrix) nach photochemischer Reaktion durch Detektion bei 600 mV an der Goldelektrode

Abbildung 21 zeigt ein Standardchromatogramm für eine jeweilige Penicillinkonzentration von 100 µg/kg.

Hierbei wurde der Eluent zur besseren Trennung der Analyten leicht modifiziert. Aufgrund von Ergebnissen aus der Literatur, welche Methanol und Acetonitril für die Penicillintrennung und Detektion mittels ECD (Elektrochemischer Detektor) an einer Goldelektrode verwendet haben [Kirchmann und Welch, 1993] wurde ein Eluent mit Zusatz von Methanol für die Tests eingesetzt. Als am besten geeignet erwies sich folgende Mischung: Phosphat-Puffer pH 3,0 / Acetonitril / Methanol 65:30:5 (v/v/v) + 0,75 g/l EDTA (Punkt 5.2.1.2).

Ein Zusatz von Ionenpaarreagenzien (Natriumdecansulfonsäure [Lihl, 1995; Moats, 1990]), der in verschiedenen Tests zur Trennung und Detektion von weiteren Penicillinen durchgeführt wurde, zeigte keine Verbesserung für die Möglichkeit der Bestimmung zusätzlicher Analyten.

Bei der Analyse von dotierten Proben ergab sich ein ungünstigeres Bild. Abbildung 22 zeigt zwei Chromatogramme bei einem Konzentrationsbereich der Penicilline am MRL-Wert von 30 µg/kg von Nafcillin und der vier Isoxazolylpenicilline sowie einen Milchblindwert.

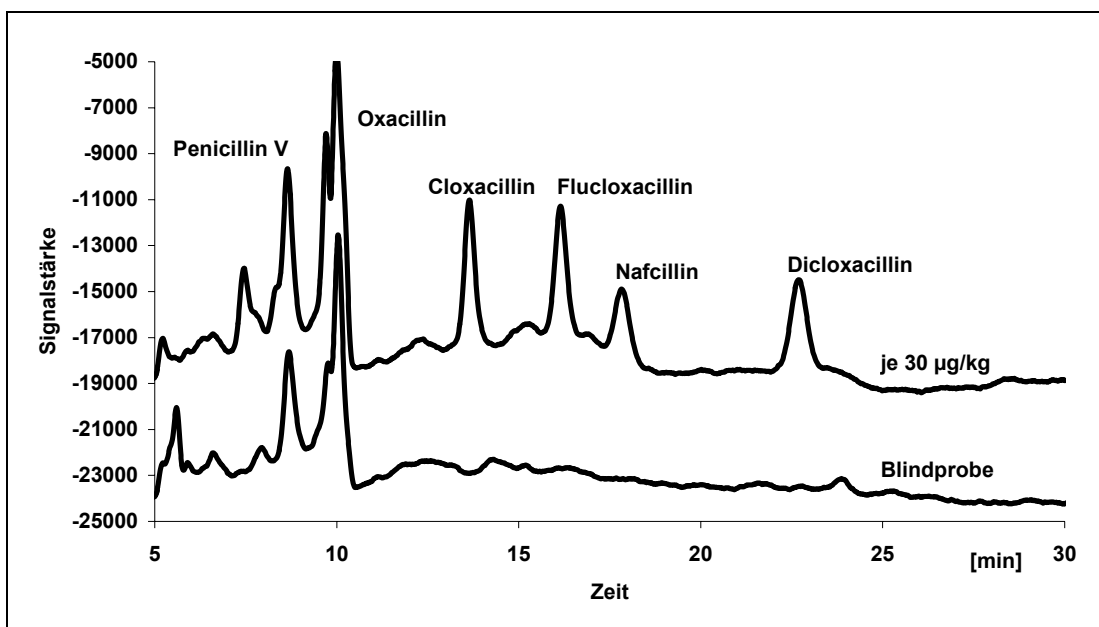


Abbildung 22: Chromatogramm der Penicilline in Milch (30 µg/kg) im Vergleich zum Chromatogramm der Milchblindprobe nach photochemischer Reaktion durch Detektion bei 600 mV an der Goldelektrode

---

Das Chromatogramm des Milchblindwertes in Abbildung 22 zeigt Störpeaks, hervorgerufen durch Milchmatrix bei der Retentionszeit des Penicillin V und des Oxacillins, so dass eine Messung im  $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich für Oxacillin nicht möglich ist. Für Penicillin V ist der Konzentrationsbereich für eine quantitative Auswertung bedingt durch Matrixeffekte zu gering.

### **2.3 Methodenentwicklung für die Bestimmung von Nafcillin und Flucloxacillin in Milch**

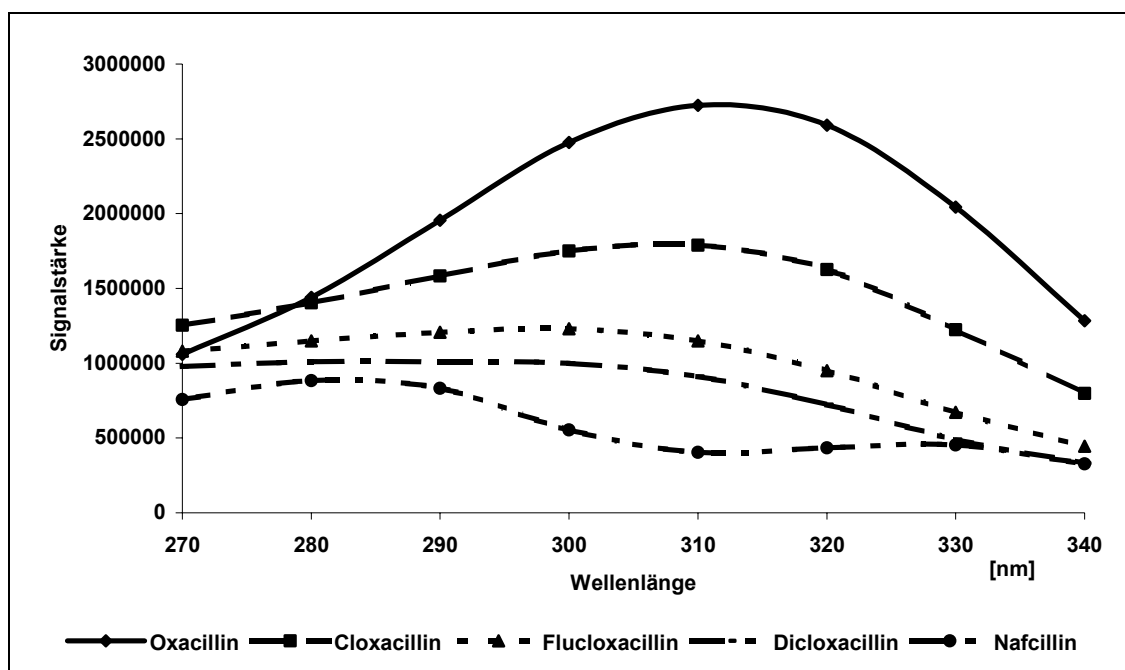
Nafcillin ist im April 2001 für die intramammäre Anwendung in der Veterinärmedizin bei Rindern zugelassen worden [Verordnung EG/807/2001, 2001]. In der Verordnung EWG/2377/90 ist seitdem ein MRL-Wert für Nafcillin in Milch von  $30 \mu\text{g}/\text{kg}$  vorgesehen. Die amtliche Überwachung benötigt daher einfache und schnelle Analysemethoden zur Bestimmung von Nafcillin in Milch. Die von Ibach [Ibach und Petz, 1998] etablierte Methode zur Bestimmung von drei Isoxazolylpenicillinen in Milch mittels on-line SPE und photochemischer Nachsäulenderivatisierung wurde daher als Grundlage zur Entwicklung einer Quantifizierungsmethode für Nafcillin verwendet.

Flucloxacillin ist ein Isoxazolylpenicillin, das in der Humanmedizin in den letzten Jahren zur Behandlung von Brustentzündungen eingesetzt wurde. Es ist von Interesse, die für Kuhmilch ausgearbeitete Analytik auf die Anwendbarkeit auch für Frauenmilch zu überprüfen, da für dieses Antibiotikum nur wenige Studien und Methoden vorliegen [Bennett, 1996; Schaefer und Spielmann, 2001]. Im Bereich der Veterinärmedizin liegen für Flucloxacillin keine Methoden oder Studien vor. Es ist aber möglich, dass es auch zur illegalen Anwendung im Bereich der milchliefernden Tiere, die an Mastitis erkrankt sind, kommt, oder Flucloxacillin in nächster Zeit für die Anwendung in der Veterinärmedizin zur Zulassung angemeldet bzw. zugelassen wird. Aus diesem Grund wurde auch dieses Antibiotikum in die bestehende HPLC-Analytik miteingebunden.

### 2.3.1 UV-Absorptionsspektren

Ausgehend von der Einbeziehung von Nafcillin und Flucloxacillin in die analytische Trennung mit elektrochemischer Detektion war das Ziel, die beiden Antibiotika in das UV-Detektions-System zu integrieren, da in der Routineanalytik in Ämtern und Handelslaboratorien die Anwendung von UV-Detektoren weit verbreitet ist und eine Anschaffung der „wall jet“-Messzelle zusätzliche Kosten verursachen würde. Ebenso wurde auf den HPLC-Eluenten aus Acetonitril / Phosphatpuffer (Punkt 5.2.1.2) zurückgegriffen. Da die optimale Trennung von Nafcillin und Flucloxacillin unter 2.2 an einer bereits über 2-3 Jahre verwendeten mit vielen Matrixproben genutzten Säule erzielt wurden, konnte nach Unbrauchbarkeit der Säule, eine vergleichbare Trennung auch an einer neuen Säule desselben Typs, nicht wieder erreicht werden, weder mit der Eluentenzusammensetzung für die ECD-Bedingungen noch für die HPLC-Eluenten, zu denen wieder zurückgekehrt wurde.

Zur Feststellung der geeigneten Wellenlänge für die Messung der photochemisch entstandenen Derivatisierungsprodukte wurden UV-Absorptionsspektren für Nafcillin, Flucloxacillin, Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin aufgenommen. Für die Messung der fünf Penicilline wurden mit einem Photodioden-Array-Detektor (DAD) bei den Wellenlängen 270-340 nm UV-Spektren aufgezeichnet. Diese eingeschränkte Wahl der Wellenlängen ergab sich aus der Arbeit von Lihl [Lihl, 1995], in der Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin nach photochemischer Reaktion detektiert wurden. Die Spektren von Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin wurden zum Vergleich aufgenommen. Es wurde das bestehende HPLC-System (Punkt 5.2) mit einer mit Hg<sub>254</sub>-Lampe zur photochemischen Derivatisierung und einem 5 m Coil im Photoreaktor verwendet, was einer Bestrahlungszeit von 60 s entspricht. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 23.



**Abbildung 23: Auftragung der Abhängigkeit der Signalstärke der photochemisch derivatisierten Penicilline von der Wellenlänge (DAD)**

Als geeignete Wellenlänge zur Detektion erwies sich für Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Flucloxacillin eine Wellenlänge von 300 nm, weil dort für die beiden am schwächsten reagierenden Isoxazolylpenicilline Dicloxacillin und Flucloxacillin der maximale Response erzielt wurde. Für Nafcillin ist eine Detektion bei 300 nm ebenfalls möglich, jedoch ergibt sich bei 280 nm ein intensiveres Analytsignal.

Für die Bestimmung der Qualitätskenndaten der quantitativen HPLC-Analytik wurde daher ein wellenlängenprogrammierbarer UV-Detektor verwendet, der bei der Retentionszeit des Nafcillins die Wellenlänge von 300 nm auf 280 nm ändern konnte.

### **2.3.2 Bestimmung der Qualitätskenndaten für die Bestimmung von Nafcillin und Flucloxacillin mittels HPLC-Schnellmethode**

Bei Substanzen mit gesetzlich festgesetzter Höchstmenge (MRL-Wert), wie bei Nafcillin, soll laut der für die Validierung zugrundegelegten EU-Entscheidung [Entscheidung der Kommission 93/256/EWG, 1993] an dem MRL-Konzentrationsniveau sowie an dem halben und doppelten MRL-Wert dotiert und

analysiert werden. Für Nafcillin ergeben sich daraus Konzentrationen von 15 µg/kg (1/2 x MRL), 30 µg/kg (1 x MRL) und 60 µg/kg (2 x MRL). Da für die drei zugelassenen Isoxazolympenicilline die gleiche Höchstmenge gilt, wurden diese Konzentration auch für das nicht zugelassene Isoxazolympenicillin Flucloxacillin als Dotierkonzentration gewählt. Sechs Analysenreihen wurden an drei verschiedenen Tagen für jedes Penicillin als Doppelbestimmung nach der beschriebenen Methode (Punkt 5.2) analysiert.

Zur Qualitätssicherung wurden 14 im Hinblick auf Art und Menge der Wirkstoffe unbekannt dotierte Penicillin-Milch-Proben mit Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Nafcillin und / oder Flucloxacillin in zwei Analysenreihen an zwei aufeinander folgenden Tagen vermessen, wobei Nafcillin häufiger bestimmt wurde als Flucloxacillin, da für Flucloxacillin in der Veterinärmedizin noch keine EU-Zulassung besteht.

### **2.3.2.1 Linearität**

Die Linearität beschreibt die Fähigkeit des Prüfverfahrens, innerhalb eines definierten Konzentrationsbereiches Messwerte zu liefern, die zur Konzentration des Analyten direkt proportional sind. Die Linearität wurde über den Bereich 7,5 - 60 µg/kg Nafcillin bzw. Flucloxacillin für die Standardlösungen und für die dotierten Proben bestimmt.

Ein F-Test dient zum Vergleich der Varianz bzw. der Werte von Standardabweichungen in sich homogener Datengruppen. Der F-Test bestätigte die Linearität der Regressionsfunktionen der einzelnen Bestimmungen mit der vorgegebenen Sicherheitsschwelle von 99 %.

Um die Linearität des Messbereiches auch optisch zu überprüfen, bietet sich die Auftragung des Quotienten aus Signalfläche (Peakfläche – Achsenabschnitt) und Konzentration gegen die Konzentration an. Der parallele Verlauf zur x-Achse zeigt, dass die Methode über den gewählten Konzentrationsbereich linear ist (Abbildung 24 und 25).



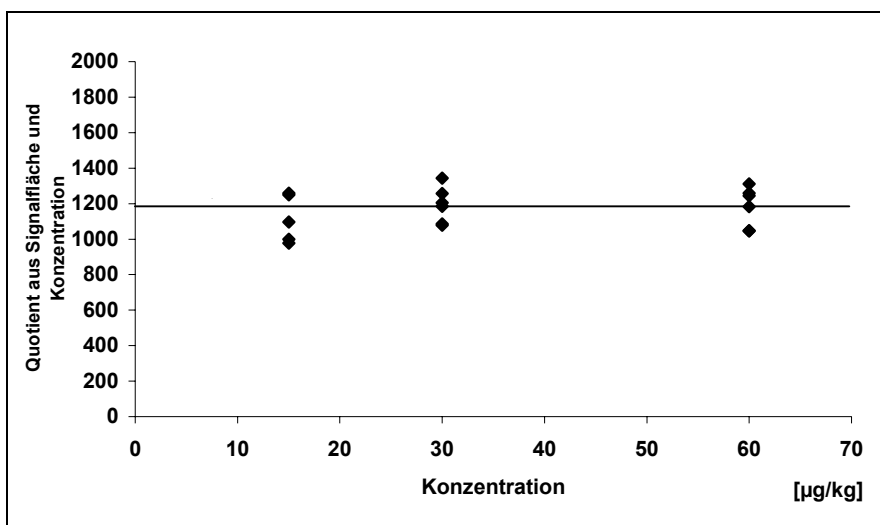


Abbildung 24: Quotient aus Signalfäche und Konzentration gegen die Konzentration für die Messungen der Nafcillin-Milchproben

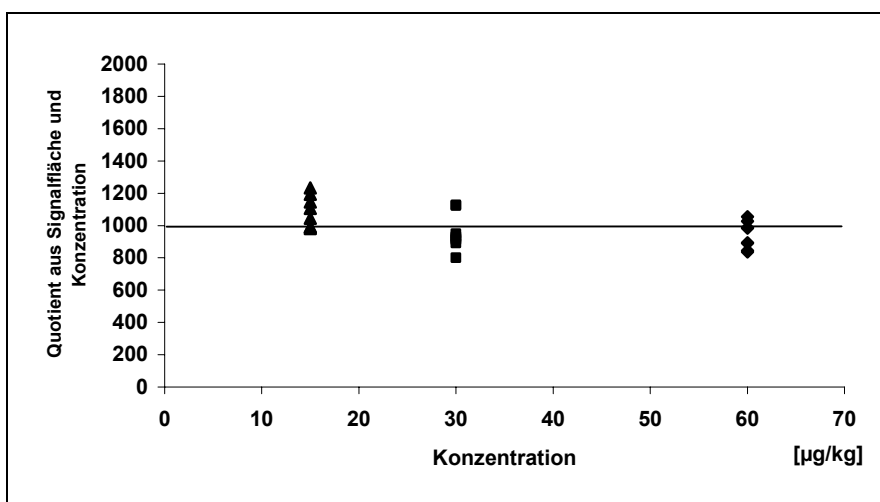


Abbildung 25: Quotient aus Signalfäche und Konzentration gegen die Konzentration für die Messungen der Flucloxacillin-Milchproben

### 2.3.2.2 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit einer Methode ist ein Maß für die Annäherung des Erwartungswertes (Mittelwert) eines Prüfergebnisses an den wahren Wert und wurde über die Wiederfindungsrate ermittelt. Die Präzision ist ein Maß für die Streuung der Prüfergebnisse um ihren Mittelwert. Die Ermittlung der Präzision erfolgte aus einer

Vierfachbestimmung jeder dotierten Konzentration, ausgedrückt als Variationskoeffizient. Die Tabellen 9 und 10 geben die ermittelten Werte wieder.

Konzentration in Milch	15 µg/kg Wiederfindung ± VK (%)	30 µg/kg Wiederfindung ± VK (%)	60 µg/kg Wiederfindung ± VK (%)
Tag 1	67 ± 8	65 ± 5	64 ± 4
Tag 2	67 ± 11	65 ± 14	65 ± 7
Tag 3	64 ± 21	72 ± 7	72 ± 7

**Tabelle 9: Ergebnisse der Wiederfindung (n=4) mit Angabe des Variationskoeffizienten (VK) für Nafcillin**

Konzentration in Milch	15 µg/kg Wiederfindung ± VK (%)	30 µg/kg Wiederfindung ± VK (%)	60 µg/kg Wiederfindung ± VK (%)
Tag 1	75 ± 4	72 ± 7	65 ± 4
Tag 2	69 ± 3	65 ± 3	65 ± 3
Tag 3	73 ± 11	62 ± 6	62 ± 2

**Tabelle 10: Ergebnisse der Wiederfindung (n=4) mit Angabe des Variationskoeffizienten (VK) für Flucloxacillin**

Gemäß Kommissionsentscheidung 93/256/EWG soll in einem Konzentrationsbereich von 10-100 µg/kg die Wiederfindung bei 70 - 110 % liegen [Entscheidung der Kommission 93/256/EWG, 1993]. Nach dieser Entscheidung ist dabei die Korrektur der Wiederfindung mit einzubeziehen. Die ermittelten Daten liegen ohne Korrektur knapp unter 70 %; mit Korrektur halten sie die Entscheidung ein.

Die Präzision soll nach dieser Entscheidung, ausgedrückt als VK im Bereich von 10 µg/kg – 100 µg/kg nicht höher als 20 % liegen. Die Variationskoeffizienten für Nafcillin und für Flucloxacillin halten diese Kriterien ein.

### 2.3.2.3 Verfahrensvariationskoeffizient

Der Verfahrensvariationskoeffizient wird als Streuung der Messwerte um die Kalibrierfunktion, geteilt durch den Wert der Steigung der Kalibriergeraden, multipliziert mit dem arithmetischem Mittel der Gehalte der Kalibrierproben berechnet. Er wird in

Prozent angegeben. Ein Verfahrensvariationskoeffizient  $< 10\%$  wird als gut angesehen [DIN 38402, 1986; Hädrich, 1999]. Für die Nafcillin-Bestimmungen ergibt sich ein Verfahrensvariationskoeffizient von  $9\%$ , für die Flucloxacillin-Bestimmungen von  $6\%$ . Er bestätigt damit die Leistungsfähigkeit des Verfahrens.

### 2.3.2.4 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze, als kleinste statistisch gesicherte nachweisbare Konzentration des Analyten in der Probe, wurde nach DIN 32645 [DIN 32645, 1994] auf Grundlage der über Dotierung erhaltenen Kalibriergeraden über das Programm Kalibo berechnet. Tabelle 11 und 12 zeigen die Ergebnisse.

Nafcillin	Tag 1	Tag 2	Tag 3
in $\mu\text{g}/\text{kg}$	6,1	13,5	10,3

**Tabelle 11: Ergebnisse der Nachweisgrenze (n=12) für Nafcillin**

Flucloxacillin	Tag 1	Tag 2	Tag 3
in $\mu\text{g}/\text{kg}$	11,6	4,9	7,4

**Tabelle 12: Ergebnisse der Nachweisgrenze (n=12) für Flucloxacillin**

Als Mittelwerte ergeben sich für Nafcillin  $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$  und für Flucloxacillin  $8\ \mu\text{g}/\text{kg}$ .

### 2.3.2.5 Beispielchromatogramm für die Bestimmung von Nafcillin in Milch

Einen Vergleich der Chromatogramme für nicht dotierte und mit  $30\ \mu\text{g}/\text{kg}$  dotierte Milch zeigt Abbildung 26. Analysiert wurden die Penicilline Nafcillin, Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin.

Flucloxacillin war in der detektierten Probe nicht enthalten, wies aber eine dem Nafcillin gleiche Retentionszeit auf. Bei Vorliegen beider Substanzen in der Probe war eine „Schulterbildung“ am Flucloxacillin-Peak deutlich erkennbar.

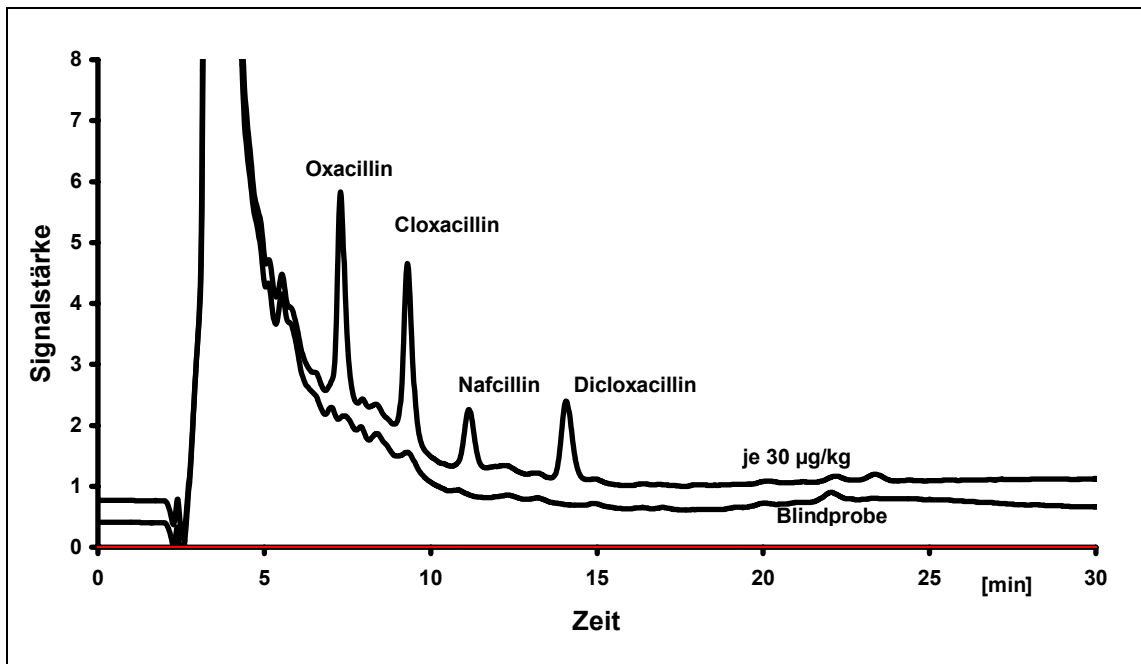


Abbildung 26: HPLC-Chromatogramm für einen Milchblank und einer mit 30 µg/kg dotierten Probe von Oxacillin, Cloxacillin, Nafcillin und Dicloxacillin

### 2.3.2.6 Qualitätssicherung durch verdeckte Analysen

Zur Qualitätssicherung wurden in unbekannt dotiertem Probenmaterial die vorliegenden Penicilline identifiziert und quantifiziert. Hierbei handelte es sich um die Bestimmung von „verdeckten“ Kontrollproben, wobei lediglich bekannt war, ob in der Probe neben den eventuell vorhandenen drei Isoxazolympenicillinen (Oxa, Clox, Dclx), Nafcillin oder Flucloxacillin zu erwarten war. Der zur Verfügung stehende Dioden-Array-Detektor erlaubte in dem auf 0-60 µg/kg eingegrenzten Konzentrationsbereich keine zuverlässige Spektrenaufnahme zur Identifizierung. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse für Nafcillin und Flucloxacillin, wobei bei fehlenden Säulen die Substanzen nicht dotiert waren und die Analysenwerte sich unterhalb der Nachweisgrenze befanden. Die Werte für Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin bestätigten die bisher bekannten Ergebnisse für diese Methode [Ibach, 1999], abgesehen von einem einzigen, durch Matrixeffekte bedingten, falsch positiven Wert für Oxacillin in Probe 13 (Tabelle 13).

Die analysierten Resultate geben eine gute Übereinstimmung mit den dotierten Konzentrationen wieder. Es wurden weder falsch positive noch falsch negative Ergebnisse für Nafcillin oder Flucloxacillin ermittelt. Die Genauigkeit der Methode liegt

in den geforderten Grenzen von – 20 % bis + 10 % [Entscheidung der Kommission 93/256/EWG, 1993].

Probe	Oxacillin		Cloxacillin		Dicloxacillin		Nafcillin	
	dot.	ana.	dot.	ana.	dot.	ana.	dot.	ana.
1	0	<NWG	15	13	15	<10	0	<NWG
2	15	12	0	<NWG	0	<NWG	15	14
3	60	52	15	14	15	<10	15	19
4	0	<NWG	0	<NWG	0	<NWG	0	<NWG
5	15	11	30	27	20	30	30	35
6	30	20	0	<NWG	0	<NWG	0	<NWG
7	30	20	0	<NWG	60	50	60	70
8	0	<NWG	0	<NWG	15	<10	90	>60
9	45	33	0	<NWG	0	<NWG	15	10
10	30	23	15	10	0	<NWG	0	<NWG
11	0	<NWG	30	24	30	20	60	66
12	60	62	60	52	30	20	90	>60
							Flucloxacillin	
13	0	31	0	<NWG	0	<NWG	15	14
14	0	<NWG	0	<NWG	0	<NWG	45	43

dot.= dotiert, ana.= analysiert, Arbeitsbereich lag bei 15-60 µg/kg, Werte zwischen 10 und 15 µg/kg wurden zur besseren Orientierung angegeben. (Im Vergleich zu den Resultaten von Ibach [Ibach, 1999] wurde bei diesen Analysen H-Milch nicht Rohmilch verwendet.)

**Tabelle 13: Ergebnisse der Analyse „verdeckter Proben“ für Oxacillin, Cloxacillin, Nafcillin, Dicloxacillin und Flucloxacillin in H-Milch (in µg/kg)**

Auf die Analyse gewachsener Proben wurde verzichtet, da es sich bei Flucloxacillin und Nafcillin um den Isoxazolylpenicillinen Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin in ihren Eigenschaften sehr ähnlichen Substanzen handelt, für die Studien mit gewachsenem Material bereits durchgeführt wurden [Ibach, 1999]. Die Beschaffung von Probenmaterial erkrankter Kühe, die mit Nafcillin oder Flucloxacillin behandelt wurden, war nicht möglich.

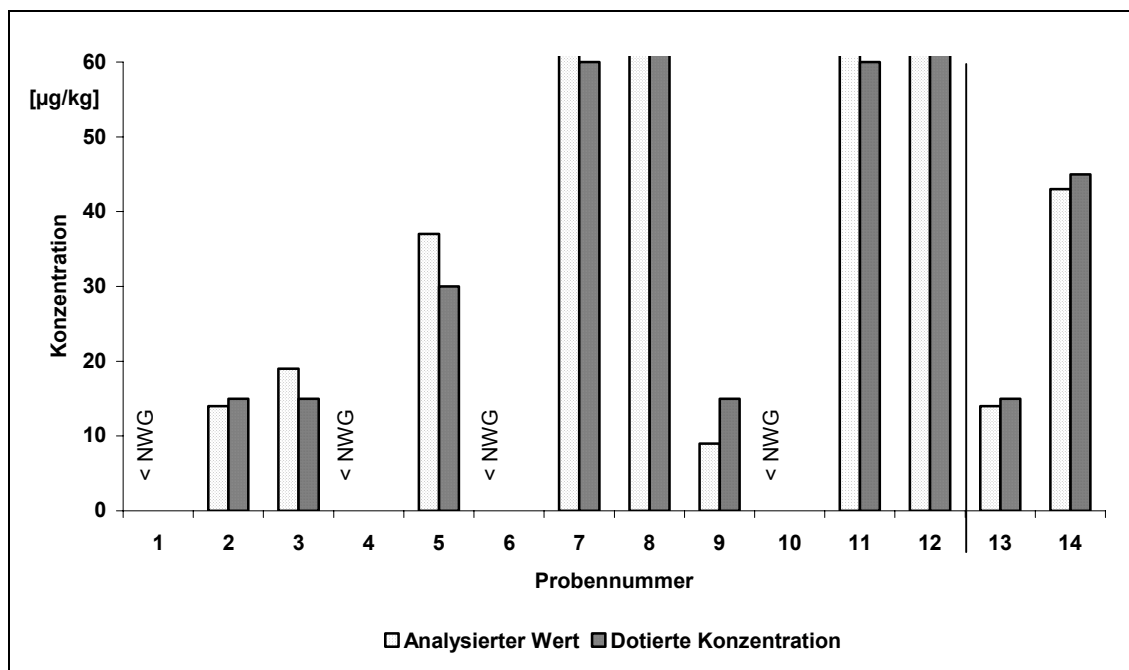


Abbildung 27: Ergebnis der Analyse „verdeckter“ Proben für Nafcillin (Proben 1-12) und Flucloxacillin (Proben 13-14)

### 2.3.3 Analyse von Flucloxacillin in Humanmilch

Bei der Bestimmung von Flucloxacillin in Humanmilch stellte sich das Problem der Probenbeschaffung. Es standen für Versuche nur geringe Mengen rückstandsfreie Milch zur Verfügung, so dass nur anhand einer Doppelbestimmung bei einer Konzentration von 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  die eventuelle Eignung der Methode zur Quantifizierung von Flucloxacillin in Frauenmilch überprüft werden konnte. Als Vergleich wurde zur Milch in gleicher Konzentration Cloxacillin dotiert. Abbildung 28 zeigt ein Kuhmilch- und ein Frauenmilchchromatogramm im Vergleich.

Die Methodik erscheint nach den vorliegenden Pilotexperiment zur Bestimmung von Flucloxacillin in Frauenmilch geeignet.

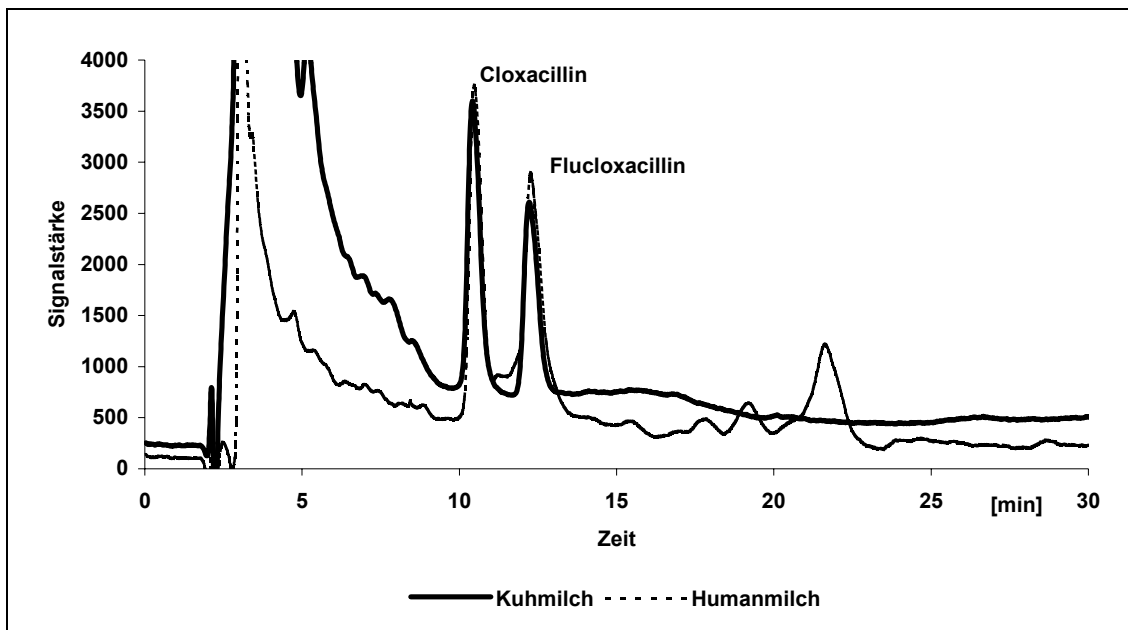


Abbildung 28: Vergleich der Chromatogramme von Flucloxacillin und Cloxacillin in Kuhmilch- und Humanmilch-Proben

## **2.4 Einfluss von technologischen Prozessen auf Penicillinrückstände in Milch und Joghurt**

### **2.4.1 Stabilität von Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin bei Erhitzung in Milch**

Bei der Verarbeitung von Milch werden verschiedene Erhitzungsverfahren angewandt. Auch bei der Joghurtproduktion ist eine Erhitzung der Milch vorgesehen, jedoch mit längeren Zeiten als bei den sonstigen Kurzzeiterhitzungen. Die Milch wird in vielen Betrieben für 15 Minuten bei 90 °C gehalten, um die Molkenproteine zu denaturieren, was sich auf die spätere Textur des Joghurts positiv auswirkt. Diese Erhitzung der Milch wirkt sich auch auf evtl. vorhandene Penicillinrückstände aus. In einem Versuch wurden die Unterschiede beim Abbau von Cloxacillin, Oxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin in Milch sowie in wässrigen Lösungen untersucht. Hierzu wurden 20 ml fassende Messkolben mit dotierter Milch bzw. Standardlösung 15 Minuten in ein Wasserbad von 90 °C getaucht; nach zügigem Abkühlen wurde die Konzentration an noch intaktem Penicillin per HPLC (Punkt 5.2) bestimmt. Die Dotierungen lagen in einem Bereich von 30-6.000 µg/kg. Der obere Bereich orientierte sich daran, dass in einzelnen Gemolken diese Konzentrationen in der Praxis durchaus vorkommen können. In Milch aus Molkereien sind selbst bei Eintrag kontaminierter Milch durch die Verdünnung mit nicht-kontaminierter Milch messbare Rückstände eher unwahrscheinlich. Der Abbau sollte abhängig von der Konzentration untersucht und charakterisiert werden. Tabelle 14 zeigt die verbleibenden Konzentrationen für die Penicilline in den bearbeiteten Lösungen.

Die Tabelle zeigt einen unterschiedlichen Abbau der Penicilline je nach Matrix. In Milch wird im Vergleich zu einer rein wässrigen Lösung vor allem bei niedrigen Konzentrationen ein protektiver Effekt deutlich. Bei höheren Konzentrationen ist er prozentual weniger ausgeprägt, wenngleich die absolut abgebauten Mengen zwangsläufig höher sind. Der Abbau der Penicilline ist sowohl in Wasser als auch in der Milch konzentrationsabhängig.

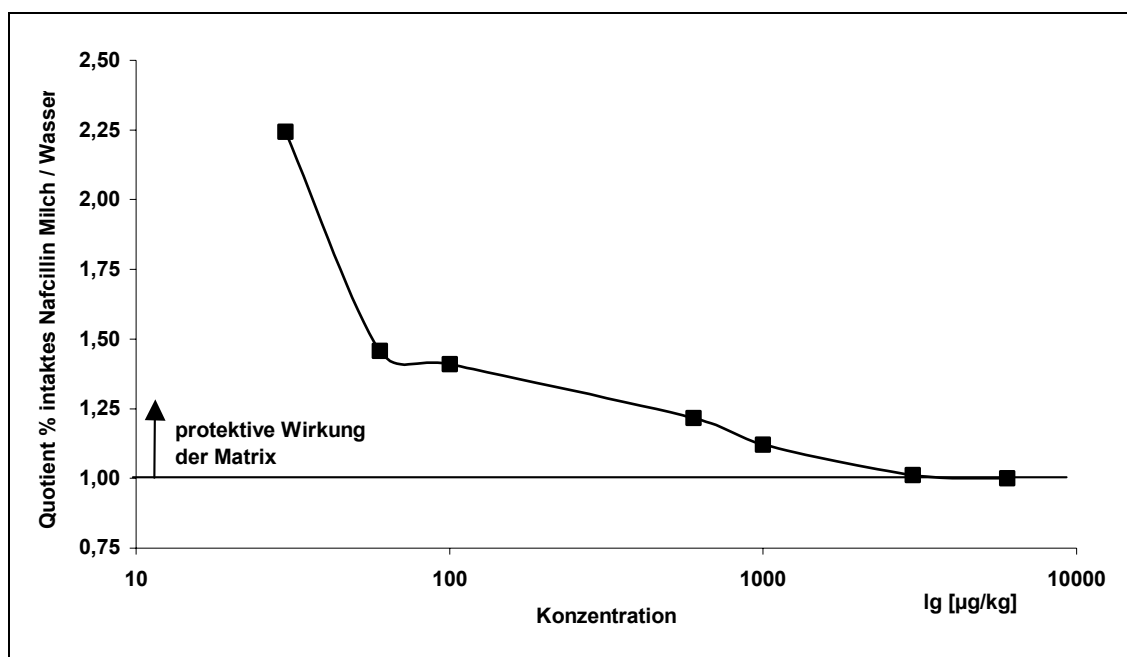
Abbildung 29 zeigt den protektiven Effekt am Beispiel des Nafcillins.



		Anfangskonzentration des Penicillins [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]						
intaktes Penicillin [%]		30	60	100	600	1.000	3.000	6.000
Cloxacillin	in Wasser	36	60	60	74	77	84	85
	in Milch	72	66	66	72	71	74	74
Oxacillin	in Wasser	41	52	56	76	81	88	87
	in Milch	58	67	67	73	81	94	92
Dicloxacillin	in Wasser	30	53	53	69	71	80	85
	in Milch	65	64	69	83	80	81	80
Nafcillin	in Wasser	37	59	61	74	74	82	84
	in Milch	83	86	86	90	83	83	84

**Tabelle 14: Stabilität der Penicilline für 15 Minuten bei 90°C in wässriger Lösung und in Milch**

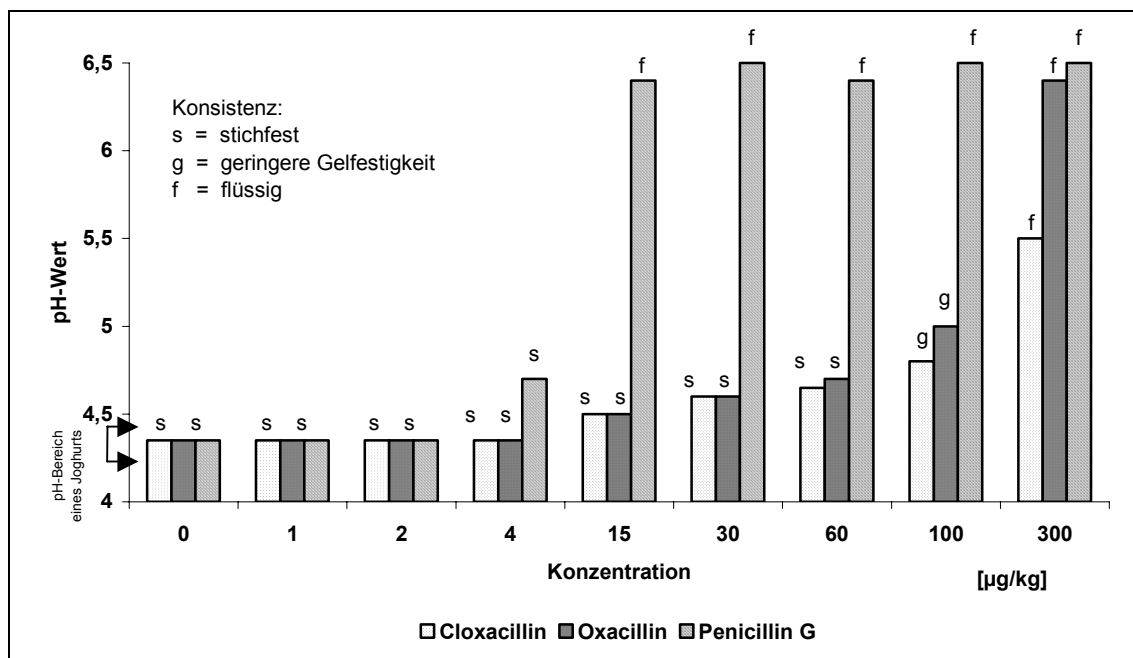
Das HPLC-Ergebnis von Cloxacillin am MRL-Wert in Milch wurde mit dem Charm<sup>®</sup> II-Sequential Assay als Kontrolluntersuchung überprüft. Hierzu wurden Cloxacillin-Proben von 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  wie beschrieben erhitzt und anstelle der HPLC-Methode mit dem Charm<sup>®</sup> II-Test für  $\beta$ -Lactame semiquantitativ bestimmt. Der Charm<sup>®</sup> II-Test bestätigte mit einer Quantifizierung von 69 % Cloxacillin in Milch, also einem Cloxacillinabbau von 31 %, den Wert von 28 % der HPLC-Analyse.



**Abbildung 29: Protektiver Effekt der Milchmatrix am Beispiel von Nafcillin**

### 2.4.2 Antibakterieller Effekt der Penicilline

Als Parameter für einen ordnungsgemäßen Säuerungs- (Fermentations-) verlauf kann der pH-Wert herangezogen werden. Ohne Einfluss antibakterieller Stoffe wird über Wachstum und Stoffwechselaktivität der Joghurtkulturen ein pH-Wert von 4,2-4,4 zum Endpunkt der Fermentation erreicht. Höhere pH-Werte weisen auf die Stärke des antibakteriellen Effektes hin. Zur Bestimmung wurden 20 g Milch in PP-Tubes mit der Starterkulturmischung YC 180 der Firma Chr. Hansen bei 43 °C fermentiert (Punkt 5.4). Nach Abschluss der Nachsäuerung wurden die zumeist festen Proben 1:1 mit Reinstwasser verdünnt, gut gemischt und der pH-Wert am pH-Meter bestimmt. Die Resultate gibt Abbildung 30 wieder.



**Abbildung 30: Antimikrobieller Effekt von steigenden Penicillinkonzentrationen auf die Starterkulturen gemessen als pH-Wert nach der Fermentation**

Die Grafik zeigt deutlich die stärkere Empfindlichkeit der Starterkulturen *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* gegenüber Penicillin G im Vergleich zu den Isoxazolympenicillinen Oxacillin und Cloxacillin. Bei Penicillin G ist schon ab einer Konzentration von > 4 µg/kg keine Fermentation mehr möglich. Die Isoxazolympenicilline beeinflussen die Joghurtproduktion ab 15 µg/kg, verhindern sie aber erst ab 60 µg/kg. Ab diesem pH-

Wert wurde nur ein zwar stärker saures, aber noch flüssiges Produkt erhalten. Der Zusammenhang der Festsetzung der MRL-Werte von 4 µg/kg für Penicillin G und 30 µg/kg für die Isoxazolympenicilline mit den technologischen Eigenschaften ist an diesen Ergebnissen gut zu erkennen, da ab diesen Konzentrationen eine Joghurtherstellung nicht mehr ohne Einschränkungen möglich ist.

Der in der Literatur beschriebene antibakterielle Effekt der Penicilline auf Joghurtkulturen (Punkt 1.3.3) konnte damit auch über die eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

Für die nachfolgenden Untersuchungen unter Punkt 2.4.3 ergibt sich aus den Resultaten dieses Kapitels für Penicillin G also ein Konzentrationsbereich von 2-4 µg/kg und für die Isoxazolympenicilline von 30-60 µg/kg damit die Produkteigenschaften eines Joghurt gewährleistet sind.

## **2.4.3 Einfluss der Joghurtfermentation auf Penicillinrückstände in Milch**

### **2.4.3.1 Überblick**

Zur Feststellung des Einflusses der Starterkulturen *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* auf die Rückstände von Penicillinen in Milch während der Fermentation, wurden Milchproben mit Penicillinen versetzt. Hierbei hatten die bei der Fermentation vorliegenden Parameter Temperatur (43°C) und Zeit (9 Stunden) ebenfalls einen Einfluss auf die Penicillinrückstände. Daher wurden zum Vergleich die Versuche auch mit dotierter Milch ohne Starterkulturen durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen ist die pH-Wert Änderung, die bei der Fermentation eintritt, nicht berücksichtigt, daher wurde sie gesondert untersucht. Die Proteinfällung, welche durch die Änderung des pH-Werts bei der Joghurtproduktion stattfindet, wurde über eine Säurefällung bei pH 4,5 nachgestellt, bei der mit Penicillin G und Cloxacillin dotierten Milchproben gearbeitet wurde. Einen Überblick über die Versuche gibt Tabelle 15.

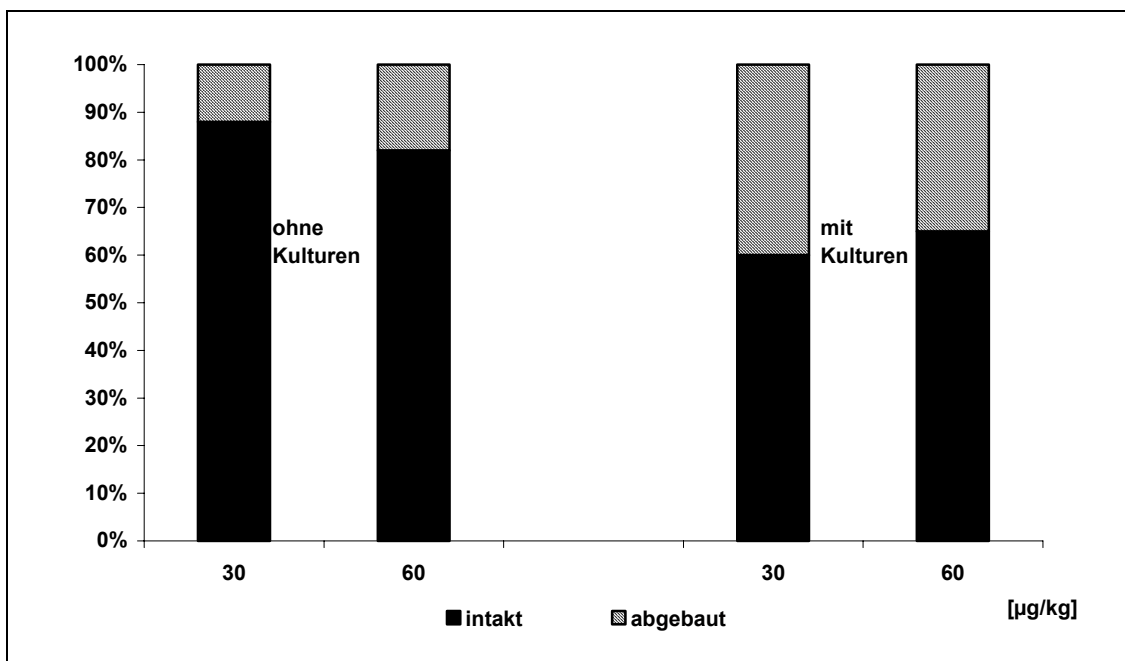
Penicillin	Matrix	Starter- kulturen	Säuerung mit Milchsäure	Analysen- Methode	Kapitel
Cloxacillin	Milch	nein	nein	HPLC	2.4.3.2
Cloxacillin	Milch	ja	nein	HPLC	2.4.3.2
Cloxacillin	Milch	nein	ja	HPLC	2.4.3.3
Cloxacillin	Joghurt	ja	nein	HPLC	2.4.3.5
Cloxacillin	Wasser	nein	ja	HPLC	2.4.3.3
Penicillin G	Milch	nein	nein	Charm II <sup>®</sup>	2.4.3.2
Penicillin G	Milch	ja	nein	Charm II <sup>®</sup>	2.4.3.2
Penicillin G	Milch	nein	ja	Charm II <sup>®</sup>	2.4.3.4
Penicillin G	Joghurt	ja	nein	Charm II <sup>®</sup>	2.4.3.5

**Tabelle 15: Überblick über die untersuchten Proben (ohne penicillinfreie Vergleiche)**

### **2.4.3.2 Einfluss der Starterkulturen, Fermentationszeit und -temperatur auf die Stabilität von Penicillin G und Cloxacillin**

Cloxacillin-Versuche:

Joghurtproben wurden als Doppelbestimmung, wie unter Punkt 5.4 beschrieben, angesetzt und ein Teil der Proben nach Zugabe der Starterkulturen mit Cloxacillin in den Konzentrationen 30 µg/kg (1 x MRL) und 60 µg/kg (2 x MRL) dotiert. In diesem Konzentrationsbereich ist eine Joghurtherstellung gerade noch möglich. In den fertigen Joghurtproben wurden die Penicilline mittels HPLC analysiert. Abbildung 31 zeigt die Unterschiede der resultierenden Cloxacillin-Konzentrationen als Mittelwert von drei Doppelbestimmungen (je Wert 6 Einzelbestimmungen).

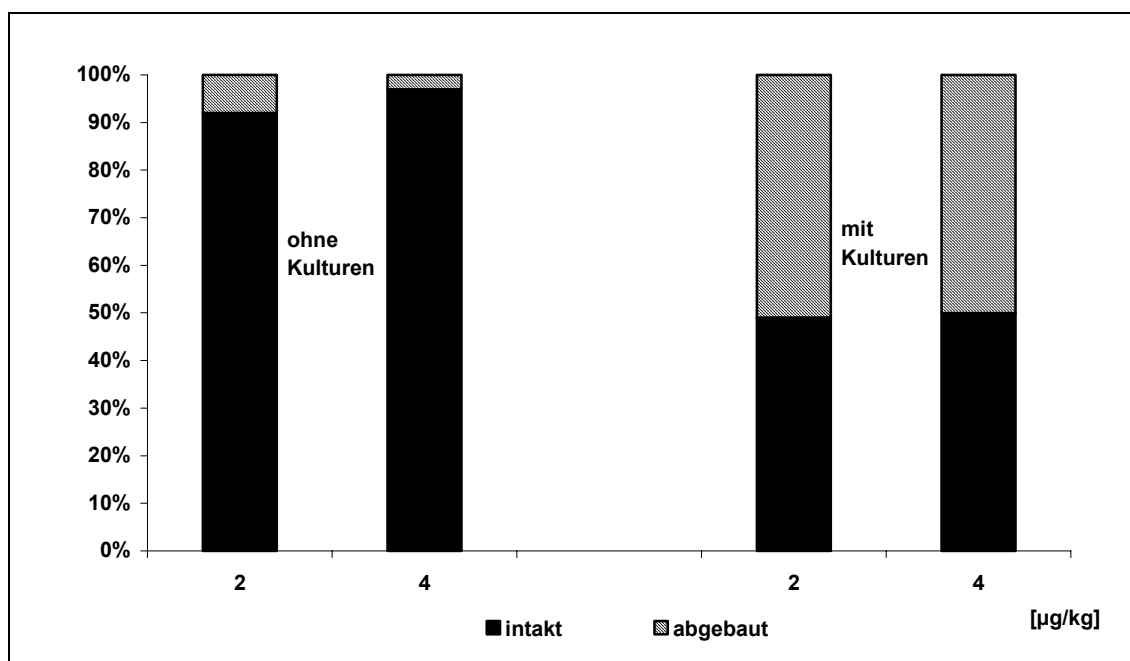


**Abbildung 31: Stabilität von Cloxacillin (30 µg/kg und 60 µg/kg) in Milch mit und ohne Zusatz von Starterkulturen**

Die Abbildung zeigt für die Proben ohne Starterkulturenzusatz am MRL-Wert einen Abbau von 12 % bzw. am doppelten MRL-Wert von 18 %. Bei den Proben mit Kulturen ergaben sich deutlich höhere Abbauwerte von 40 % bzw. 35 %.

Penicillin G-Versuche:

Penicillin G wurde in den Konzentrationen 2 µg/kg (1/2 x MRL) und 4 µg/kg (1 x MRL) zu Joghurtproben dotiert, da am doppelten MRL-Wert keine Joghurtherstellung mehr möglich ist. Die fertigen Joghurtproben wurden mit Charm® II Sequential Assay, wie unter Punkt 5.3 beschrieben, analysiert. Abbildung 32 zeigt die Mittelwerte der resultierenden Penicillin G-Konzentrationen (je 6 Einzelbestimmungen).



**Abbildung 32: Stabilität von Penicillin G (2 µg/kg und 4 µg/kg) in Milch mit und ohne Zusatz von Starterkulturen**

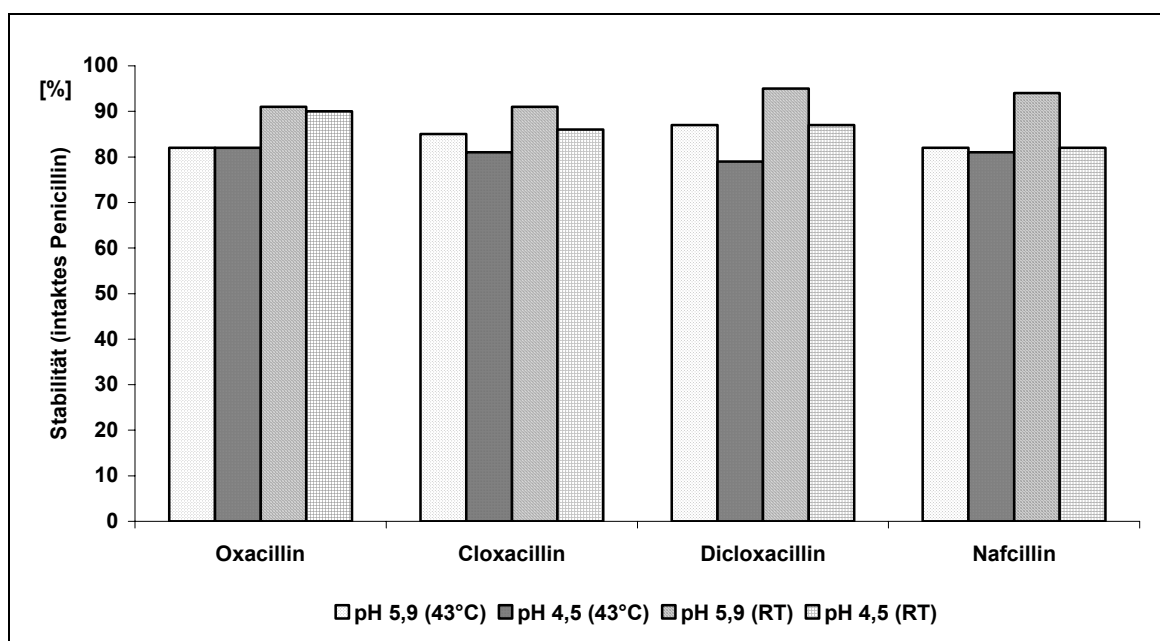
Die Penicillin G-Proben zeigten ohne Starterkulturen einen Abbau von 8 % am halben MRL-Wert und 3 % am einfachen MRL-Wert, mit Starterkulturen ergaben sich Werte von 43 bzw. 47 %.

Für die mit Cloxacillin oder Penicillin G dotierten Milchproben ergaben sich Unterschiede im Abbau mit oder ohne Starterkulturen. Die Abbauwerte mit Kulturen geben den Einfluss der Fermentation wieder, also den Einfluss der Starterkulturen, des pH-Abfalls während der Fermentation, der Temperatur von 43°C und der Zeit von 9 Stunden mit Nachsäuerung. Der Vergleich ohne Kulturen zeigt nur die Werte des Einflusses von Temperatur und Zeit.

#### **2.4.3.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität von Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin ohne Starterkulturen**

Bei der Joghurtherstellung sinkt der pH-Wert der Milch durch den Fermentationsprozess auf pH 4,2 - 4,5. Dadurch kann es zu Abbaureaktionen des Penicillins durch elektrophilen Angriff kommen (Punkt 1.2.2.3.). Auch bei den sogenannten säurefesten Penicillinen kann es zur Degradation kommen. Um diesen Einfluss des pH-Wertes zu bestimmen, wurden wässrige Lösungen von Oxacillin,

Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin am MRL-Wert von 30 µg/kg hergestellt und die Hälfte der Proben mit Milchsäure auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt. Diese Lösungen wurden 8 Stunden bei Raumtemperatur bzw. bei 43°C im Trockenschrank gelagert und sofort per HPLC-Analyse untersucht. Es wurden Doppelbestimmungen für verschiedene Zeitpunkte durchgeführt. Milchlösungen konnten für den Versuch nicht verwendet werden, da bei einem pH-Wert von 4,5 die Milchproteine ausfallen, die zu einem adsorptiven Verlust an Penicillinen führen können. Eine Bestimmung des alleinigen Einflusses des pH-Wertes ist bei Milch daher nicht möglich. Die Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse für Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin nach 8 Stunden Lagerung bei 43 °C und für die Lagerung bei RT. Die Resultate werden in Prozent ausgedrückt, bezogen auf den zum Zeitpunkt 0 Stunden per HPLC gemessenen Wert der Penicilline.

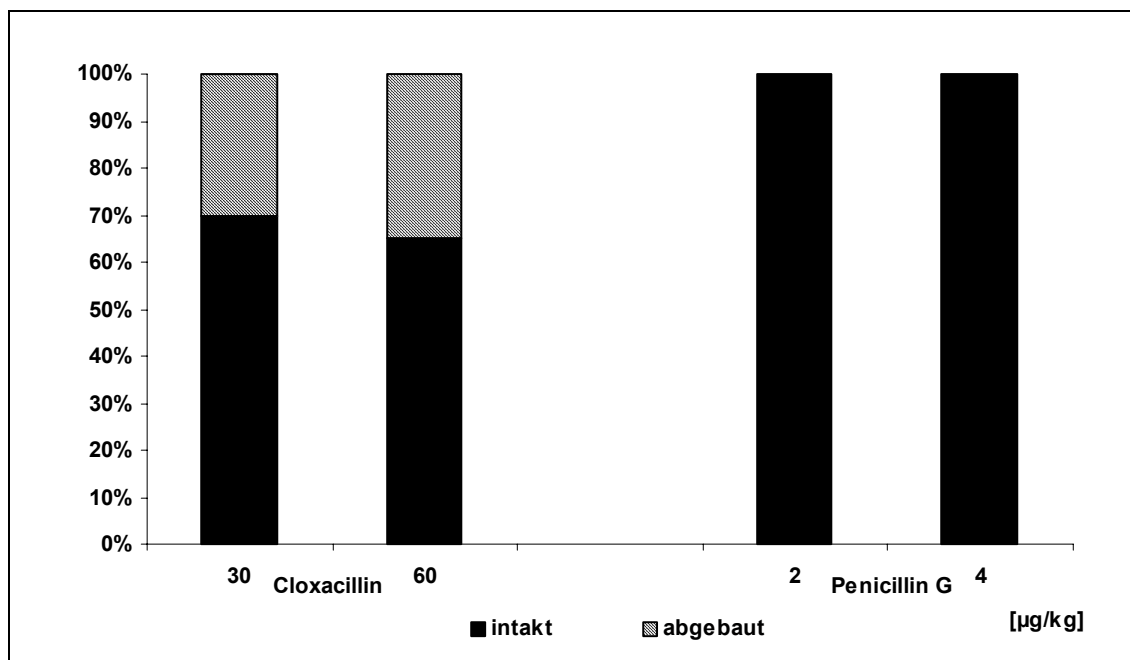


**Abbildung 33: Stabilität der Penicilline (30 µg/kg) bei pH 5,9 (wässrige Lösung) bzw. pH 4,5 (milchsaure Lösung), bei 43°C und Raumtemperatur**

Die Grafik zeigt einen Abbau von bis zu 20 %. Durch die pH-Wert-Absenkung wird die Stabilität der Penicilline nur gering beeinflusst. Die pH-Wert-Einstellung verursacht nur einen Abbau der Penicilline von ca. 10-15 %. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Stabilität konnte zwischen den vier Penicillinen nicht festgestellt werden.

#### 2.4.3.4 Einfluss der Proteinfällung auf die Stabilität von Penicillin G und Cloxacillin ohne Starterkulturen

Um festzustellen welchen Einfluss die Fällung der Milchproteine bei der Joghurtproduktion hat, wurden Milchproben von Cloxacillin in den Konzentrationen 30 und 60 µg/kg dotiert und mit Milchsäurelösung auf einen pH-Wert von 4,3 eingestellt. Sie wurden sofort untersucht, damit nicht der pH, sondern die Proteinfällung als Einflussparameter speziell geprüft wurde. Die Proben wurden weiterhin wie bei der HPLC-Methode aufgearbeitet (Punkt 5.2.4). Penicillin G-Milchproben wurden in den Konzentrationen 2 und 4 µg/kg ( $\frac{1}{2}$  x MRL, 1 x MRL) dotiert und ebenso der pH-Wert eingestellt. Die Cloxacillin-Proben wurden per HPLC, die Penicillin G-Proben per Charm<sup>®</sup> II Sequential Assay bestimmt. Abbildung 34 zeigt für Cloxacillin eine Wiederfindung von 65 – 70 %. Bei Penicillin G traten durch die Proteinfällung keine Wiederfindungsverluste auf.



**Abbildung 34: Wiederfindung von Cloxacillin (HPLC) und Penicillin G (Charm<sup>®</sup> II) in Milchproben nach Präzipitation der Proteine**

Dieses Ergebnis zeigt auch, dass der pH-Wert keinen sofortigen Einfluss auf die Stabilität des säureempfindlichen Penicillin G hat. Cloxacillin zeigt eine geringere Wiederfindung. Dies lässt sich durch die stärkeren Wechselwirkungen mit Proteinen



und die damit verbundenen stärkeren Adsorptionsverluste im Vergleich zum Penicillin G erklären (siehe auch Punkt 2.5).

#### **2.4.3.5 Zusammenfassende Betrachtung**

Der Einfluss einzelner Parameter der Joghurtfermentation und deren Zusammenwirken auf die Penicillinrückstände wurde untersucht. Cloxacillin wurde mit der HPLC-Analyse bestimmt. Die Stabilität des Cloxacillins am MRL-Wert lag für die Bestimmung in dotierter Milch ohne Starterkultur und ohne Lagerung bei 80 % (Methode nach Punkt 5.2), im erst nach der Fermentation dotierten Produkt (Joghurt) bei 70 % und bei 65 - 70 %, wenn ohne Starterkultur durch Milchsäurelösung die Milchproteine gefällt wurden. Nach der Fermentation von vorher dotierter Milch mit Starterkulturen ergab sich eine Stabilität im Joghurt von 60 - 65 %. Es zeigt sich also eine Überlappung der Effekte der Bestimmung der analytischen Wiederfindung des Cloxacillins durch die veränderten Matrixeffekte und des Abbauprozesses des Penicillins durch den Einfluss der Fermentationsparameter. Dies vermindert die Aussagekraft bezüglich des Effektes einzelner Einflussparameter.

Der nach der „Kiel-Methode“ modifizierte Charm<sup>®</sup> II Sequential Assay zeigte keine Verringerung der Wiederfindung aufgrund der Matrixeffekte. Penicillin G zeigte nach der Fermentation eine Stabilität von 50 %, ohne Starterkulturen eine von 92 - 97 %. Die Stabilität in dotierter Milch, dotiertem Joghurt und dotierter Milch mit durch Milchsäurelösung gefällten Milchproteinen lag bei 100 %.

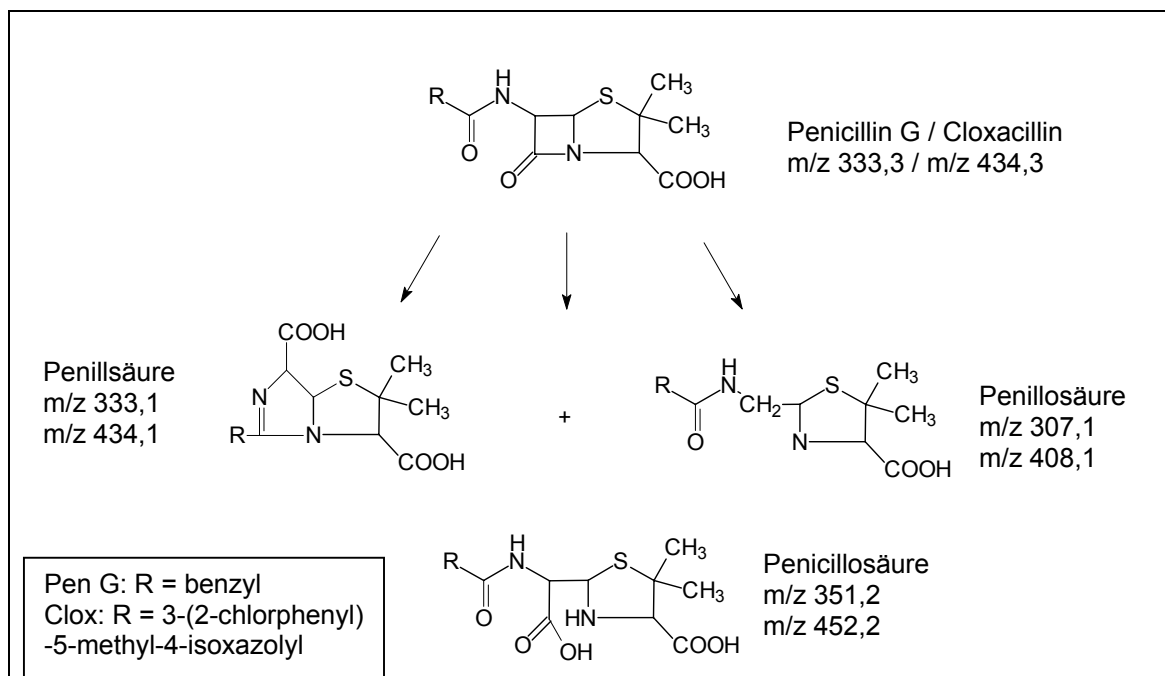
#### **2.4.4 Abbauprodukte aus Penicillinrückständen bei der lebensmitteltechnologischen Behandlung von Milch und in Joghurt**

Wie gezeigt haben bei technologischen Prozessen mit Milch, wie bei der Joghurtproduktion, verschiedene Parameter Einfluss auf die Penicillinrückstände. Aus intakten Penicillinen entstehen verschiedene Derivate. Wie unter Punkt 1.2.2.3 beschrieben, entstehen durch nucleophilen und elektrophilen Angriff Produkte wie Penicillosäure, Penillosäure, Penicillamin oder Penillsäure. Rückstände reagieren mit

Proteinen in der Milch zu unterschiedlichen Proteinverbindungen (Punkt 1.2.6) oder es können durch Polymerisation zunächst Dimere und dann Polymere des Penicillins entstehen (Punkt 1.2.7).

Ziel der Untersuchung war es, Reaktionsprodukte von Rückständen der Penicilline Cloxacillin und Penicillin G mittels LC-MS bzw. LC-MS/MS nachzuweisen. Hierbei wurden dotierte wässrige Lösungen mit dotierter Milch verglichen. Ebenso wurde versucht, Rückstände nach der Fermentation von Milch zu identifizieren. Die Konzentrationen der Penicilline in den verschiedenen Versuchsansätzen wurden verglichen.

Zur Bestimmung von Abbauprodukten wurden zunächst Lösungen von 1 µg/ml Penicillin G und Cloxacillin in Wasser mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 2,3 eingestellt und diese direkt mittels LC-MS (ein Quadrupol) einem Scan der Massen  $m/z$  140-700 unterzogen. Der niedrige pH-Wert sollte einen anteilig größeren Abbau gewährleisten. Als Vergleich wurden Wasser und Ameisensäurelösung ohne Penicillin vermessen. Ameisensäure wurde gewählt, da sie Teil des HPLC-Eluenten war. Abbildung 35 zeigt die gefundenen Abbauprodukte der Proben. Polymere des Penicillins waren nicht zu identifizieren.



**Abbildung 35: Mittels LC-MS identifizierte Produkte von Penicillin G und Cloxacillin im sauren Medium**

Als nächster Schritt wurden Lösungen von Penicillin G und Cloxacillin mit Milchsäure auf pH 4,0 eingestellt und nach HPLC-Trennung massenspektrometrisch untersucht. Als Vergleich dienten Lösungen des Wassers und der Milchsäure in Wasser. Beim Penicillin G zeigte sich in den dotierten Proben die Penillsäure als Hauptabbauprodukt. Bei Cloxacillin bestätigte sich die Säurestabilität. Nur in geringerem Maße wurden hier Penillsäure und Penillosäure gefunden.

Zur Bestätigung, dass es sich bei den Massen tatsächlich um die genannten Substanzen handelt, wurden diese Proben-Lösungen mit Zusatz von Ameisensäure und Milchsäure mittels LC-MS/MS (Triple Quadrupol-Technik) über die Fragmente untersucht.

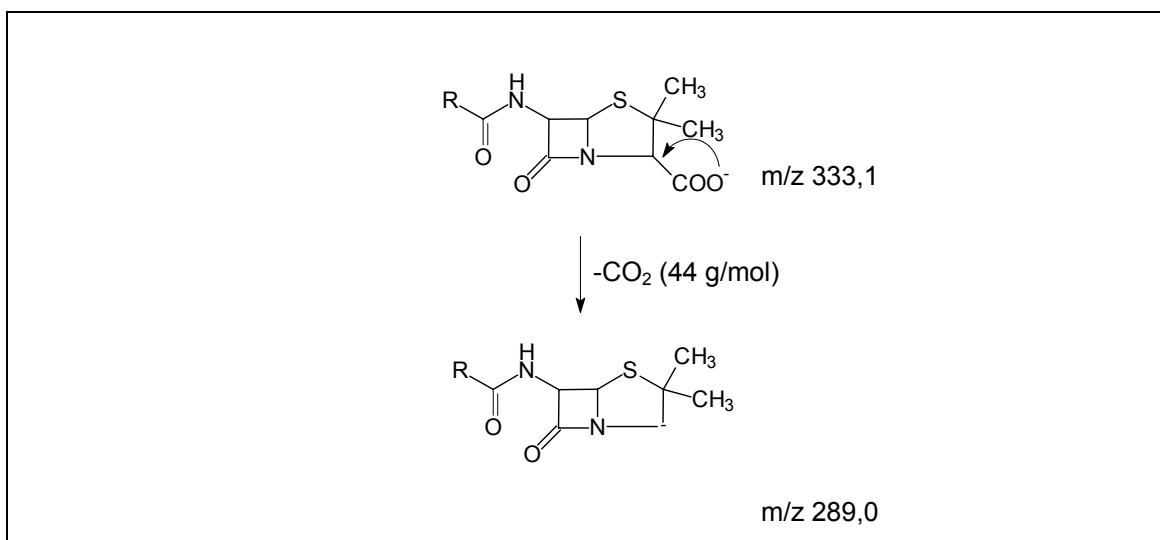


Abbildung 36: Fragmentierung von Penicillin G

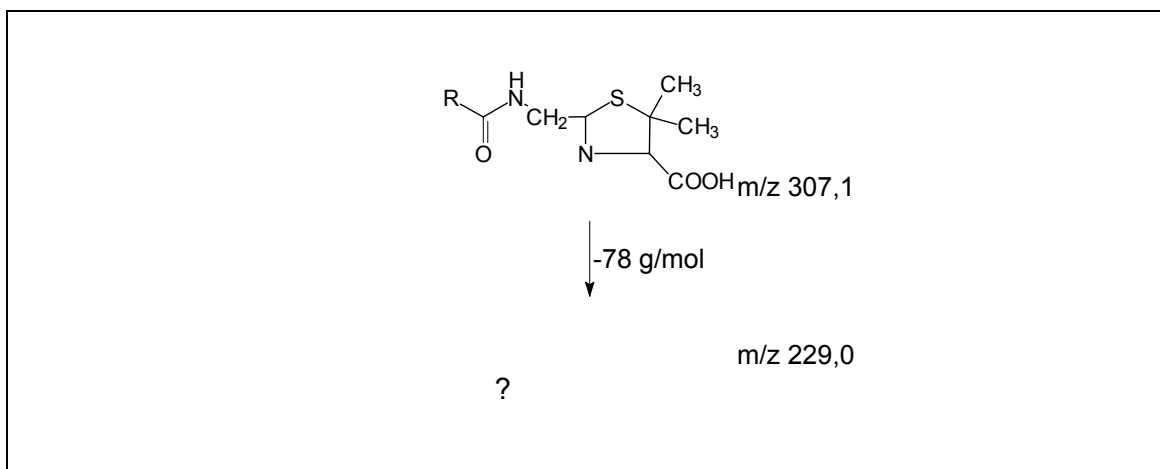


Abbildung 37: Fragmentierung von Penillosäure

Abbildungen 36 bis 39 zeigen die identifizierten Fragmente für Penicillin G und deren vermutete Fragmentierungswege, welche entsprechend auch für Cloxacillin gelten. Die Interpretation der Fragmentierungswege greift auf die Aussagen bei [Ohki et al., 1992; Rabbolini et al., 1998] zurück.

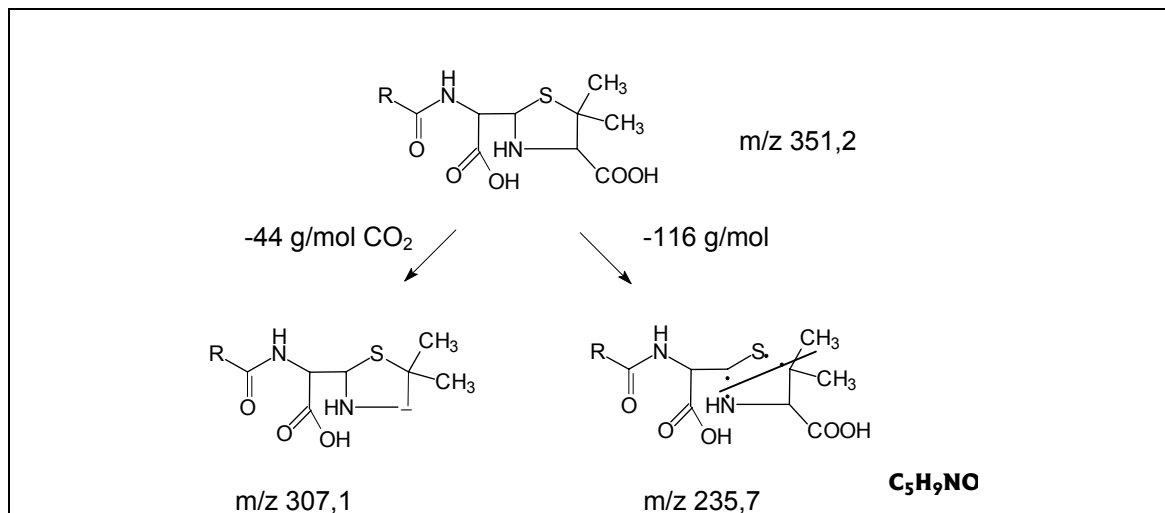


Abbildung 38: Fragmentierung von Penicillosäure

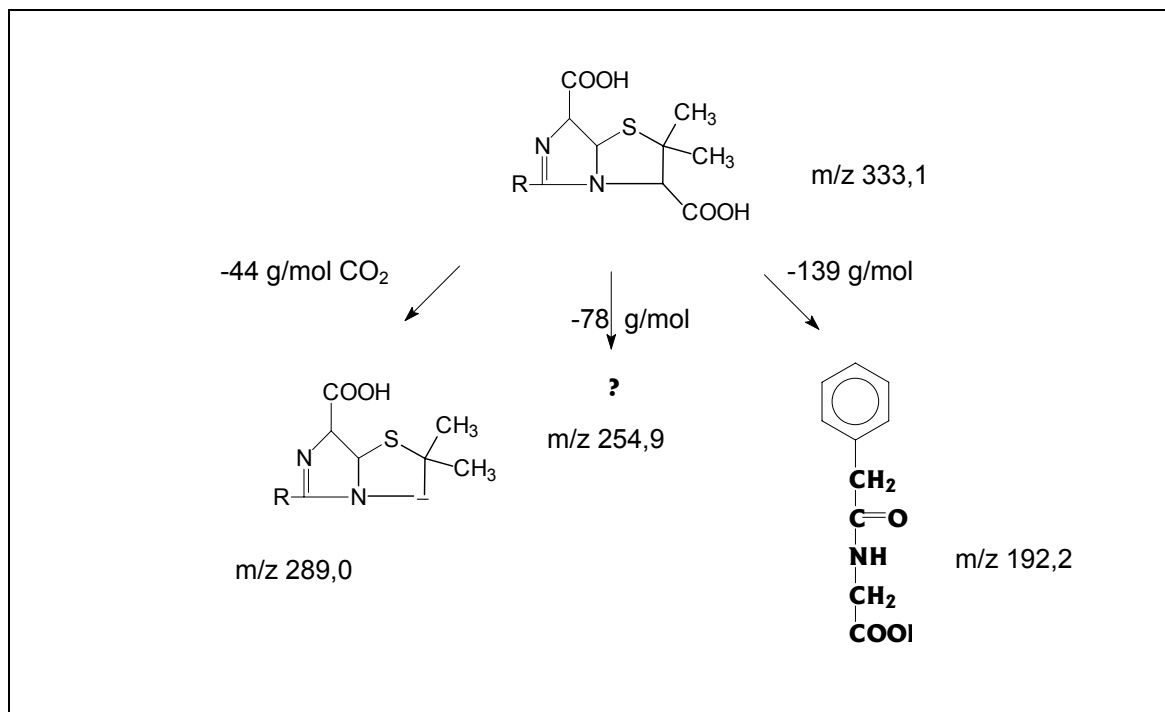
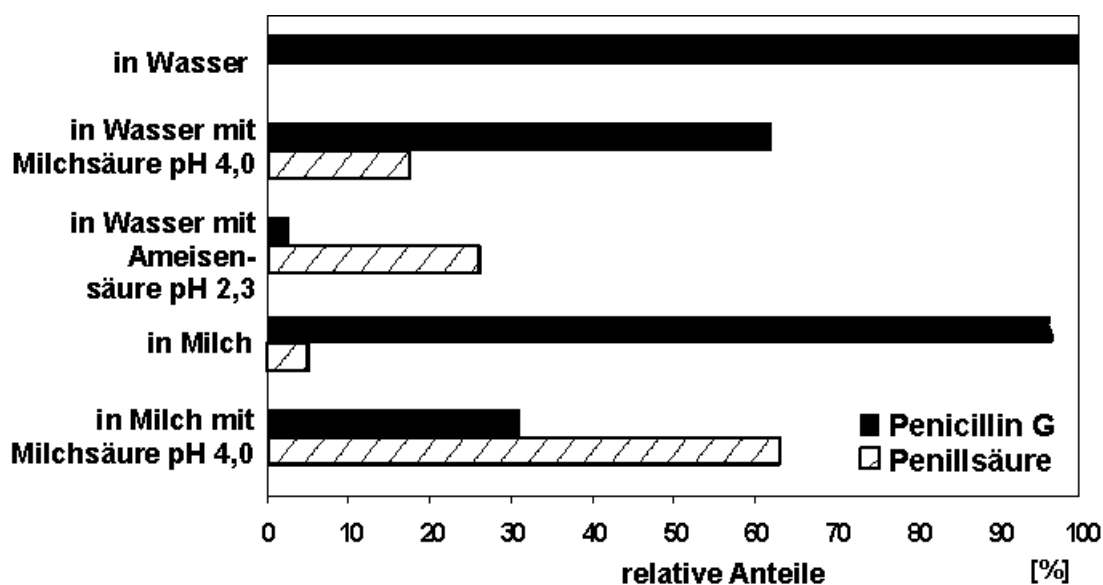


Abbildung 39: Fragmentierung von Penillsäure

Mit Penicillin G bzw. Cloxacillin dotierte Milchproben, mit Milchsäure auf pH 4,0 eingestellt, wurden drei Tage gekühlt gelagert, aufgearbeitet (Punkt 5.5.2) und mittels LC-MS/MS analysiert. Als Vergleich wurde in gleicher Konzentration dotierte Milch bzw. Wasser ohne Veränderung des gegebenen pH-Wertes herangezogen sowie Wasser mit Milchsäurelösung pH 4,0 vermessen. Diese wässrigen Vergleichslösungen wurden im Gegensatz zu den Proben nicht 3 Tage kühl gelagert.

Als Abbauprodukte von Penicillin G in der Milch bei pH 4,0 zeigten sich Penillsäure, Penillosäure und Penicillosäure, wobei der Anteil der Penicillosäure sehr gering und der Anteil der Penillsäure besonders groß war. Einen Vergleich der Konzentrationen in den Versuchsansätzen zeigt Abbildung 40, berechnet aus den Flächen der Hauptfragmente der Substanzen. Die Hauptfragmente von Penicillin G (m/z 289) und Penillsäure (m/z 289) waren in ihrer Retentionszeit von 26,9 bzw. 22,7 Minuten deutlich zu unterscheiden.



**Abbildung 40: Vergleich der LC-MS/MS Werte von Penicillin G und Penillsäure in Wasser und Milch bei verschiedenen pH-Werten**

(Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, Milch nach 3 Tagen bei 5°C untersucht, Wasser direkte Untersuchung nach 100-180 Minuten)

Die Grafik gibt einen angenäherten Überblick über das Abbauverhalten von Penicillin G, da in Milch bereits ohne pH-Wert-Einfluss Penillsäure entsteht und somit kein 100%-Wert vorliegen kann. Eine Berechnung der Konzentrationen war aufgrund der fehlenden Kalibrierung nicht möglich. Die Einbeziehung weiterer Fragmente wurde aufgrund ihrer geringen Signalstärke vernachlässigt.

Im Vergleich ist zu erkennen, dass bereits in Milch mehr als 5 % Penillsäure im Verhältnis zum Penicillin G entstanden sind. Senkt man den pH-Wert auf 4, erhöht sich der Anteil der entstehenden Penillsäure auf über 60 %, die Konzentration an Penicillin G sinkt auf ca. 30 %. Bei einer milchsäuren, wässrigen Lösung pH 4, liegt der Anteil an Penicillin G noch bei 60 %, der der Penillsäure bei 20 %, was auf die Matrix und die unterschiedliche Reaktionszeit von wenigen Stunden bzw. 3 Tagen zurückzuführen sein kann. Senkt man den pH-Wert weiter auf pH 2, in diesem Fall mit Ameisensäure, zeigt sich innerhalb weniger Stunden ein fast vollständiger Abbau von Penicillin G (< 5 %). Auch die Penillsäure wurde weiter abgebaut, hier konnten noch ca. 25 % bestimmt werden. Der Anteil weiterer bekannter Abbauprodukte erhöhte sich in der Lösung aber nicht.

Cloxacillinproben in Milch wurden in gleicher Weise behandelt. Cloxacillin baut sich jedoch nur zu < 10 % ab. Hauptabbauprodukte sind hierbei die entsprechende Penillsäure und Penillosäure, wobei dieser Abbau auch im geringeren Maße ohne Milchsäure stattfindet.

Zur Bestimmung von Abbauprodukten in Joghurt wurde Joghurt mit Konzentrationen von Penicillin G und Cloxacillin am MRL-Wert hergestellt (4 µg/kg bzw. 30 µg/kg). Diese Proben mussten, um in diesem Konzentrationsbereich noch Substanzen identifizieren zu können, bei der Aufarbeitung aufkonzentriert werden. Es wurde eine wässrige Extraktion und eine Extraktion mit Acetonitril durchgeführt (Punkt 5.5.2).

Mittels LC-MS/MS wurden zunächst vor der Fermentation mit Penicillin G bzw. Cloxacillin dotierte Joghurtproben und in einem zweiten Versuch, als Vergleich, 1.) nach der Fermentation mit Penicillin dotierter Joghurt, 2.) Joghurt ohne Dotierung und 3.) dotierte Milchproben, ohne Fermentation, die wie Joghurt aufgearbeitet wurden, vermessen.

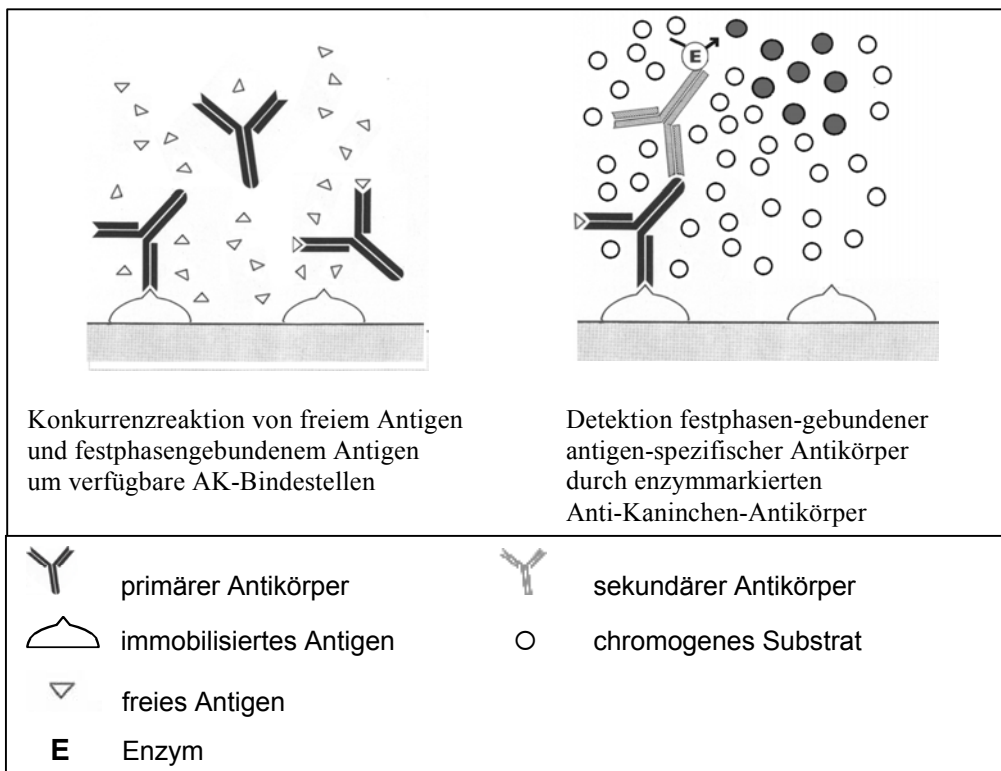
Bei der LC-MS/MS Messung der Joghurtproben, die während der Fermentation Penicillin G enthielten, lassen sich über die Fragmente bzw. die Retentionszeiten, das

Penicillin G selbst nach beiden Extraktionsarten wiederfinden, bei der Acetonitrilextraktion in geringem Maße auch Penicillosäure. Diese ist aufgrund der geringen Signalstärke nicht eindeutig zu identifizieren. Bei den Cloxacillin-Proben ist nur das Cloxacillin eindeutig in den Joghurtproben zu identifizieren. Die Proben und Vergleiche (1-3) erbrachten bei Wiederholung des Versuches keine aussagekräftigen Werte. Somit kann aus den Werten geschlossen werden, dass entweder die Aufarbeitung zu größeren Verlusten an Penicillinen führt oder im Prozess der Fermentation eine größere Menge Penicillin zu Abbauprodukten reagiert als in gelagerter Milch.

## **2.5 Bestimmung des Bindungsanteils von Penicillinen an Milchproteine**

Um das Ausmaß der Bindung von Penicillinen an Milchproteine bestimmen zu können, wurde eine Dialyse zur Trennung von freiem und gebundenem Penicillin eingesetzt. Milch und Caseinlösungen, deren Konzentration an Casein dem Anteil in der Milch entsprechen, wurden mit Penicillin G, Ampicillin oder Cloxacillin dotiert (1 mg/g Milch) und 3 Tage bei 4 - 6 °C gelagert. 20 ml der Lösungen wurden in Dialyseschläuche (Donorlösung) gegeben und gegen 5 l PBS-Puffer (Akzeptorlösung) dialysiert. Die Akzeptorlösungen wurden 3 x täglich gewechselt und verworfen. In der Donorlösung lag nach 5 Tagen kein freies Penicillin vor ( $< 30 \mu\text{g/kg}$ ). Als Untersuchungsmethoden wurde der Penzym<sup>®</sup>-Test bzw. eine HPLC-Methode gewählt (Punkt 5.6.3). Das an Protein gebundene lag damit frei von intaktem Penicillin in der dialysierten (Donor-) Lösung vor.

Zur Bestimmung dieser Lösungen wurde die ELISA-Technik angewendet. Da sich durch die kovalente Bindung der Penicilline an Proteine der  $\beta$ -Lactamring öffnet, entsteht ein Penicilloylderivat. Dieser Penicilloylrest konnte mit einem dafür spezifischen Antikörper im indirekt kompetitiven ELISA quantifiziert werden.



**Abbildung 41: Indirekter ELISA [Abbildung entnommen aus: Schlösser, 2000]**

Zur Durchführung wurde das Antigen (Glucoseoxidase - Penicillin G - Konjugat) auf der ELISA-Platte immobilisiert. Durch den Kopplungsprozess unter alkalischen Bedingungen besitzt das Penicillin einen geöffneten  $\beta$ -Lactamring (Benzylpenicilloylderivat). Im zweiten Reaktionsschritt fand eine Konkurrenzreaktion zwischen immobilisiertem Antigen und dem in der zugegebenen Probe befindlichen freien Penicilloylderivat um die ebenfalls zugegebenen Antikörper statt (Primärantikörper, Antipenicillin-AK). Zur Detektion wurde ein indirekter Nachweis der gebundenen Antikörper mittels enzymmarkierter Sekundärantikörper (Peroxidase-markiertes Antikaninchen IgG) und anschließender Enzymreaktion durchgeführt [Bally und Gribnau, 1989; Usleber et al., 1994; Schlösser, 2000]. Eine grafische Darstellung des Prinzips zeigt Abbildung 41.



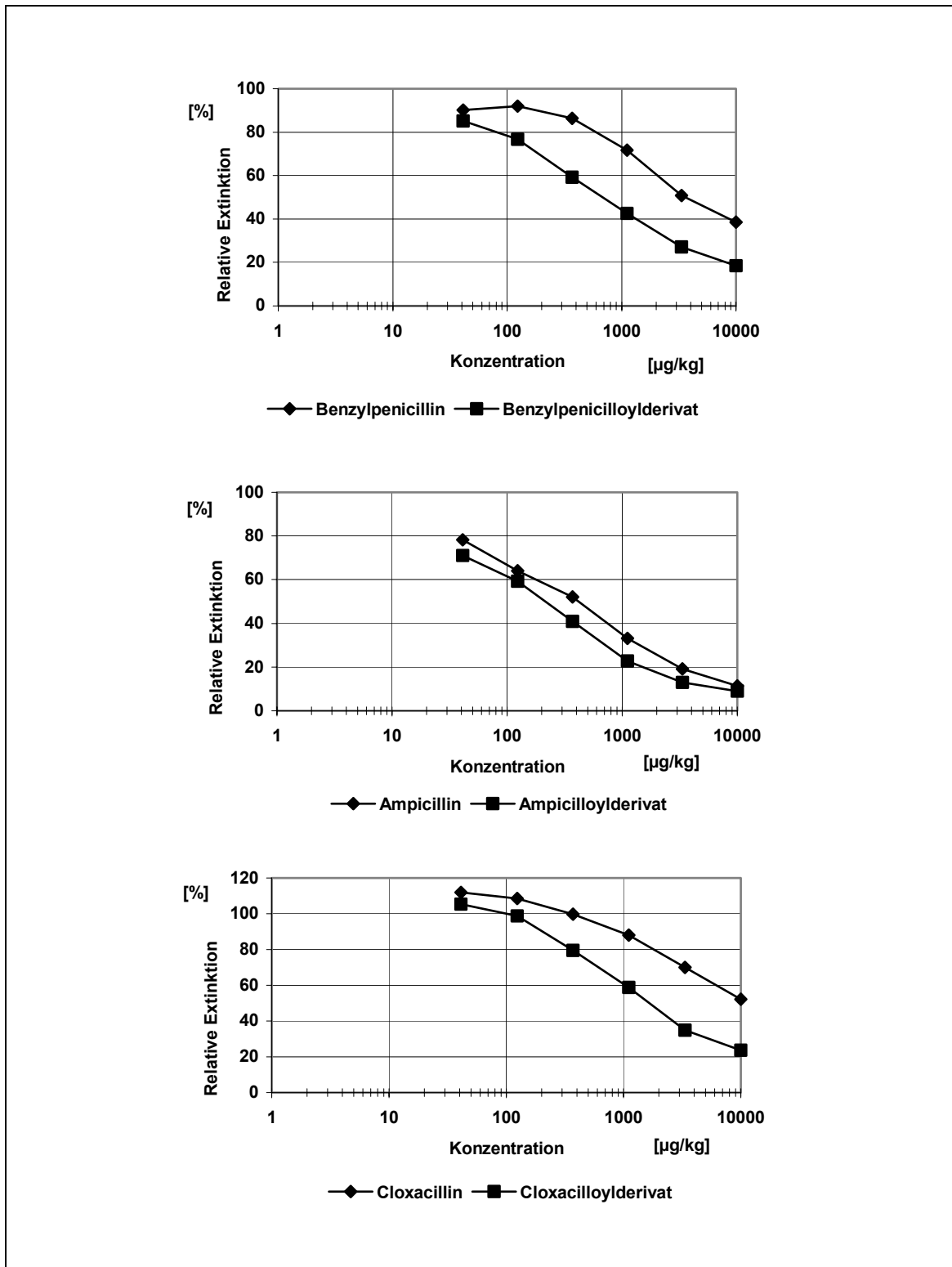


Abbildung 42: Standardkurven für die Penicilline und Penicilloidderivate

Zur Feststellung der Eignung des gewählten Systems wurden die Kompetitoren Penicillin und Penicilloylderivat in verschiedenen Verdünnungen (41 µg/kg-1.000 µg/kg) zur Aufnahme einer Standardkurve vermessen. Die resultierenden Extinktionskurven zeigt Abbildung 42. Sie zeigen die für die Auswertung verwendeten Bereiche von 30 - 70 % relativer Extinktion. Die 50 % - Dosis (Konzentration, die das Messignal zu 50 % hemmt) kann als Maß für die Affinität des Antikörpers herangezogen werden. Es ist in allen drei Grafiken zu erkennen, dass die Affinität zum Penicilloylderivat größer ist als zum intakten Penicillin.

Als Alternativmethode für die Bestimmung des Cloxacillin bzw. Cloxacilloylderivates wurde der semiquantitative Charm<sup>®</sup> II Competitive Assay für Cloxacillin herangezogen. Der Charm<sup>®</sup> II Competitive Assay benötigt für ein positives Rezeptortestresultat im Gegensatz zum Charm<sup>®</sup> II Sequential Assay für β-Lactame nicht den intakten β-Lactamring. In Versuchen zur Testspezifität konnte gezeigt werden, dass der kompetitive Charm<sup>®</sup> II-Test auch bei erhitzten Cloxacillinlösungen ein positives Resultat lieferte und damit einen anderen Erkennungsmechanismus besitzt (z.B. Isoxazolylrest (keine näheren Angaben vom Hersteller zu erhalten)); Versuch siehe unter Punkt 5.3.4.1.1). Deshalb erschien der Test für die Bestimmung von proteingebundenem Cloxacillin geeignet. Als Proben wurden dieselben dialysierten Proben verwendet wie beim ELISA-Test.

Die Ergebnisse für die ELISA-Tests zeigten eine gute Übereinstimmung der Dreifachbestimmungen der einzelnen Proben, welche doppelt auf einer Mikrotiterplatte bestimmt wurden. Die durchgeführten drei Mikrotiterplatten je Penicillin zeigten ebenfalls eine gute Übereinstimmung der Resultate. Die Ergebnisse, dargestellt in den Tabellen 16 und 17, zeigen eine nicht unerhebliche Bindung von Penicillinen an Milchbestandteile. So liegen die Resultate bei bis zu 20 % der eingesetzten Penicillinmenge (1 g/kg Milch), für Penicillin G bei 50 mg, für Ampicillin bei 15 mg und für Cloxacillin bei 200 mg pro kg Milch.

Die Zusammenfassung der Werte in Tabelle 16, angegeben in Prozent bezogen auf die Menge des vor der Dialyse eingesetzten Penicillins, zeigt Unterschiede zwischen Milch und Caseinlösungen vor allem beim Cloxacillin. Während beim Penicillin G und beim Ampicillin diese Unterschiede bei unter 1 % bzw. 3 % liegen, ist der Unterschied beim Cloxacillin bei 12 %. Tabelle 17 gibt die Unterschiede als Massen an, welche an Milch in kg bzw. Casein in g gebunden haben.

	Milch	Caseinlösung
	Gebundene Rückstände (%)	
<b>ELISA</b>		
Ampicillin	1,5	1
Penicillin G	5	8
Cloxacillin	20	8
<b>Charm® II Test</b>		
Cloxacillin	0,3	0,2

**Tabelle 16: ELISA- und Charm® II-Testergebnisse zur Bindung von Penicillin G und Cloxacillin an Milchproteine in % der ursprünglich eingesetzten Menge Penicillin**

	Milch	Casein
	Gebundene Rückstände	
	(mg Penicillin / l Milch)	(mg Penicillin / g Casein)
<b>ELISA</b>		
Ampicillin	15	0,4
Penicillin G	50	3
Cloxacillin	200	3
<b>Charm® II Test</b>		
Cloxacillin	3	0,05

**Tabelle 17: ELISA- und Charm® II-Testergebnisse zur Bindung von Penicillin G und Cloxacillin an Milchproteine bezogen auf die Masse an Milch bzw. Casein**

Dabei zeigen sich die Unterschiede beim Cloxacillin deutlich. Rechnet man die 200 mg proteingebundenes Cloxacillin in Milch auf Casein um, erhält man 8 mg gebundenes Cloxacillin pro g Casein. Beim Cloxacillin scheinen andere Milchproteine einen größeren Anteil an der Bindung zu haben als beim Ampicillin oder Penicillin G.

Bei der Bewertung der Daten ist zu berücksichtigen, dass es sich um orientierende Werte handelt, da eine vergleichende HPLC-Analyse nicht möglich war. Ebenso ist mit einzubeziehen, dass die Werte den unteren Bereich der möglichen gebundenen Penicilline angeben, da beim ELISA-Test proteingebundene Penicilline wie freie Penicilline ausgewertet wurden.

Der Vergleich der Ergebnisse des Charm<sup>®</sup> II Competitive Assay zum ELISA-Test zeigt deutliche Abweichungen bei der Quantifizierung. Die Resultate lagen für die gebundenen Rückstände in Milch beim ELISA-Test bei 20 % und im Charm<sup>®</sup> II-Test bei 0,3 %. Die Diskrepanzen für die Caseinlösungen liegen in der gleichen Größenordnung. Auch wenn falsch positive ELISA-Werte nicht völlig ausgeschlossen werden können, legen die Werte den Schluss nahe, dass der Charm<sup>®</sup> II-Test für diese Messung nicht geeignet ist.

### 3 Diskussion

#### 3.1 Vergleich unterschiedlicher Screening-Methoden mit quantitativer HPLC für die Penicillinanalytik

Die Fragestellung dieser Studie war die Eignung von Screening-Tests und der Vergleich mit einer HPLC-Methode zur Bestimmung von Isoxazolympenicillinrückständen in Milch. Des Weiteren war die vorgeschriebene Wartezeit bis zur Rückstandsfreiheit der Milch für das verwendete Präparat zu überprüfen. Hierbei war der Vergleich des Ausscheidungsverhaltens gesunder und kranker Tiere von Interesse. In der Literatur sind Studien zur Mastitistherapie mit Isoxazolympenicillinen wie für Cloxacillin [Davis et al., 1975] oder Dicloxacillin [Roncada et al., 2000] beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde das gleiche Präparat (Wirkstoff: Cloxacillin) in gleicher Konzentration an kranke Tiere verabreicht, wie in einer früheren Studie an gesunde [Ibach, 1999]. Zu Rasse und Alter der Kühe lagen keine Daten vor. Mercer et al. kommen in ihrer Veröffentlichung zu dem Ergebnis, dass es am kranken Euter zu einer langsameren Ausscheidung der Antibiotika kommt [Mercer et al., 1974]. Dieses Resultat lässt sich durch den Vergleich der durchgeführten Studie mit den Ergebnissen der früheren Studie [Ibach, 1999] nicht bestätigen. Sowohl bei den erkrankten Kühen als auch bei den gesunden Kühen sind nach Melkzeit 5 bzw. 6 und somit spätestens nach drei Tagen mit der HPLC-Methode keine Cloxacillinrückstände mehr zu detektieren, obwohl die erkrankten Kühe eine zweite Injektion nach 24 Stunden erhalten haben. Bestätigt werden können aber die Angaben, dass das Ausmaß der Ausscheidung der Penicilline am gesunden Euter leicht höher ist als am kranken Euter [Egan und Meaney, 1985; Gedek und Kaup, 1973; Jacobs et al., 1971]. Dies wird im Vergleich von gesunden und erkrankten Tieren anhand von Melkzeit 2 deutlich (Punkt 2.1). Der Gesundheitszustand des Euters hat damit Einfluss auf das Verhalten der Penicilline als schwache Säuren. Durch den steigenden pH-Wert der Milch (ca. pH 6,6) im Verhältnis zum pH-Wert des Blutes (pH 7,4) ändert sich die Retention der Penicilline im Euter [Debackere, 1995; Kroker, 1997; Tyler et al., 1992]. Einen Nachweis für Änderungen dieser Art in der Elimination der Penicilline konnte über die durchgeführte Studie nicht erbracht werden. In mehreren anderen Studien wird über den Übergang von Rückständen aus dem behandelten, infizierten Euter in das gesunde,

unbehandelte Euterviertel berichtet [Cosgrove und Etgen, 1960; Egan und Meaney, 1985; Evans und Stern, 1960; Ibach, 1999], wobei dieser Übergang abhängig von der Kuh (Alter, Rasse etc.), unterschiedlich ausfällt. Diese Effekte können bei den vorliegenden Versuchen unberücksichtigt bleiben, da es sich bei dem Vergleich jeweils um Gesamtgemelke handelt. Der Zeitraum der Ausscheidung nach der Applikation ist abhängig von der Formulierung des Präparates sowie von der Dosierung [Debackere, 1995; Moretain und Boisseau, 1989]. Ebenso ist der zeitliche Verlauf der Eliminationsdauer abhängig von Rasse, Alter und Individuum [Seymour et al., 1988]. Die Eliminationsdauer von 2-3 Tagen für Isoxazolympenicilline nach der letzten Injektion, die sich bei den Versuchen ergab, sind vergleichbar mit den Angaben der Literatur [Egan und Meaney, 1985; Roncada et al., 2000]. Die für die gesunden Tiere ermittelten Wartezeiten für das Präparat Eumacid<sup>®</sup> von sechs Tagen [Petrausch, 2000] sind also ausreichend. Die festgesetzte Höchstmenge ist selbst bei wiederholter Injektion zuverlässig unterschritten.

In der durchgeführten Studie lässt sich im Vergleich der Screening-Tests auf Cloxacillin in Milch zur quantitativen HPLC-Methode eine gute Korrelation der Ergebnisse feststellen. Wenn bei der HPLC-Methode die Analysenwerte über dem MRL-Wert lagen, zeigten die Schnelltests positive Ergebnisse.

Leichte Unterschiede zeigten sich nur an der Höchstmenge von 30 µg/kg. So ergaben die Screening-Tests bei Kuh Nr. 2 zur Melkzeit 5 alle negative Ergebnisse, während über die HPLC-Analyse Werte über dem MRL ermittelt wurden. Bei Kuh Nr. 4 zur Melkzeit 3 ergab die HPLC-Analyse Werte um den MRL-Wert, die Screening Tests waren alle positiv.

Die deutlichen Differenzen in den HPLC-Analysenwerten scheinen durch Fehler in der Analytik nicht erklärbar. Dies zeigen die divergierenden Ergebnisse für zwei Proben des gleichen Gemelkes, da die einzelnen Werte der Doppelbestimmungen gut übereinstimmen. Durch die Lagerung lyophilisierter Proben sind bei früheren Versuchen minimale Effekte aufgetreten. So werden sich ändernde Matrixeffekte bei der Lagerung gefriergetrockneter Milch mit Isoxazolympenicillinrückständen beschrieben, die Abweichungen hierbei lagen aber nur bei ca. 5 % [Ibach, 1999]. Die Ursachenanalyse ist schwierig, da die Proben bereits getrennt und gefriergetrocknet geliefert wurden. Hier ist nur die Analytikkontrolle möglich, da die Behandlung der Proben nach dem Melkvorgang unbekannt ist.

Bei anderen niedrigen Gehalten für Cloxacillin in Milch, wie Kuh Nr. 1 zur Melkzeit 1 mit 64 µg/kg und Kuh Nr. 4 zur Melkzeit 5 mit 39 µg/kg, zeigte in der Studie nur der Penzym S<sup>®</sup>-Test Schwächen. Nach der Literatur [Suhren et al., 1996; Boison, 2001] hat der Penzym S<sup>®</sup>-Test eine Nachweisgrenze von ca. 55 µg/kg für Cloxacillin, was die schlechteren Resultate bestätigen würde. Die Herstellerangabe für die Nachweisgrenze des Penzym S<sup>®</sup>-Tests liegt bei 60-100 µg/kg [Chr. Hansen, 2001].

Die Nachweisgrenzen für die anderen Screening-Tests wurden wie folgt ermittelt: Delvotest SP<sup>®</sup> 22,5-30 µg/kg [Jones, 1999; Suhren und Beukers, 1998], Snap<sup>®</sup> Test 30 µg/kg [Kroll et al., 2000; Suhren und Reichmuth, 1998; Anonymous, 1994] BR AS spezial<sup>®</sup> 30 µg/kg [Suhren und Reichmuth, 1998; Zaadhof et al., 1997]. Die Ergebnisse der Studie bestätigen also die Werte für die Nachweisgrenzen der Schnelltests in der Literatur. Ein unterschiedlicher Einfluss der verschiedenen Erreger auf die Test konnte nicht festgestellt werden. Insgesamt sollte bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass es sich um eine kleine Pilotstudie handelt.

Die Studie konnte die Eignung der HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung der Isoxazolylpenicilline und der Screening-Tests für einen qualitativen Nachweis belegen.

### **3.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von Penicillinen mittels elektrochemischer Detektion**

Die Entwicklung einer HPLC-Methode mit amperometrischer Detektion zur Bestimmung von Penicillinrückständen in Milch sollte eine Steigerung der Empfindlichkeit und Selektivität erbringen sowie möglichst alle veterinärmedizinisch zugelassenen Penicilline erfassen.

In der Literatur sind zur Detektion von Antibiotika mittels amperometrischer Detektion nur wenige Methoden beschrieben, wobei die Analyten, wenn sie die Oberfläche der Arbeitselektrode erreichen, oxidiert oder reduziert werden. Neuere Veröffentlichungen arbeiten zur Detektion von Penicillinen mit gepulster amperometrischer Detektion (PAD). Hierbei hat sich die Goldelektrode im Vergleich zu anderen Elektrodenmaterialien als besonders geeignet erwiesen [Dasenbrock und LaCourse, 1998; Koprowski et al., 1993; Kirchmann et al., 1994], wobei die Oxidation nicht durch das angelegte Potential, sondern durch den katalytischen Effekt des gebildeten

Goldoxides bzw. Goldhydroxides stattfindet [LaCourse und Dasenbrock, 1998]. Diese Methoden erreichen jedoch ohne Aufkonzentrierung der Probe nicht die für die Rückstandsanalytik nötige Empfindlichkeit, so dass Untersuchungen mit vorheriger photochemischer Derivatisierung durchgeführt wurden.

In den eigenen bei konstantem Potential durchgeführten Versuchen mit photochemischer Derivatisierung erwies sich ebenfalls die Goldelektrode im Vergleich zu Platin, Kupfer und Graphit als besonders geeignet für die Penicillinanalytik.

Die in den Versuchen in der Penicillinanalytik erstmals eingesetzte innovative „wall jet“-Messzelle mit Dickschichtelektrode hat den Vorteil, dass das Wechseln der Elektroden durch den Sensorchip problemlos möglich ist. Der Wechsel zwischen Platin, Gold, Kupfer oder Graphit ist schnell ausführbar, auch das Arbeiten mit aggressiven Medien und dadurch angegriffener Elektroden-Oberfläche wird durch den einfachen Tausch des Elektrodenchips ermöglicht. Der Einsatz des Sensorchips hat zudem den Vorteil kürzerer Einschwingzeiten und einer erhöhten Empfindlichkeit und Selektivität. Die Vorteile liegen im Aufbau der Zelle begründet, welche eine optimale laminare Strömung an den Sensoren gewährleistet [TRACE-Biotech, 2000]. Eine Messung ist ohne den Wechsel des Potentials (gepulst) zur Reduzierung des Goldes möglich. Durch den Aufbau der Messzelle wurde, anders als bei konstantem Potential bisher bekannt, keine verringerte Signalintensität durch die Verschmutzung der Elektrode festgestellt.

Bei der amperometrischen Detektion stellt die Auswahl des richtigen Potentials einen wichtigen Faktor dar. Je höher das Potential ist, desto größer ist der Response. Ab einer bestimmten Potentialhöhe nimmt das Analytsignal nicht mehr zu. Der Grundstrom dagegen, also das Grundrauschen, steigt an und damit nimmt die Selektivität ab [Rocklin, 1993]. Um das geeignete Potential zu finden, wurden Voltammogramme der einzelnen Elektrodenmaterialien für die Isoxazolympenicilline aufgenommen. Der Stromfluss wurde gegen das Potential aufgetragen. Als zu testendes Elektrodenmaterial wurde Gold, Platin, Kupfer und Graphit gewählt. Die Kupferelektrode war für weitere Versuche aufgrund eines hohen und schwankenden Grundstroms nicht verwendbar. Als geeignetes Elektrodenmaterial erwies sich das Gold, da bei ca. 400 mV ein gutes Grundstrom-Analytstrom-Verhältnis zu beobachten war. Platin erbrachte nur einen geringen Analytstrom, während bei der Graphitelektrode bei einem Potential von ca. 800 mV ein Optimum zur Detektion erreicht war. Bei diesen höheren Potentialen war aber das Problem der vermehrten



Detektion von Matrixbestandteilen gegeben und damit die Analytquantifizierung gestört.

Zur Möglichkeit der Quantifizierung weiterer Penicilline mit amperometrischen Detektion wurden unter Verwendung der Goldelektrode die Penicilline Ampicillin, Amoxicillin, Methicillin, Penicillin V, Penicillin G, Flucloxacillin und Nafcillin mittels des HPLC-System nach Ibach [Ibach, 1999] einzeln detektiert. Ampicillin und Amoxicillin ließen sich wie erwartet mit dem HPLC / ECD-System nicht detektieren. Dies lag in der fehlenden Anreicherung an der C<sub>18</sub> - LiChrospher ADS-Kartusche begründet. Die amphoteren Penicilline haben aufgrund ihrer NH<sub>2</sub>-Gruppe eine geringere Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial und gingen somit bei der on-line Anreicherung verloren. Bei Methicillin und Penicillin G wurde nur ein kleines Signal erhalten, was in der ebenfalls nicht ausreichenden Anreicherung begründet lag, da diese für die Isoxazolylpenicilline optimiert war. Penicillin V lies sich, obwohl es eine durch den Sauerstoff der Phenoxygruppe bedingt höhere Polarität besitzt, besser als Penicillin G auf der C<sub>18</sub> - LiChrospher ADS-Kartusche anreichern. Dieses Verhalten bestätigten auch Versuche zur Elutionsreihenfolge der Penicilline an einer C<sub>18</sub>-Phase [Lihl et al., 1996]. Penicillin V, Nafcillin und Flucloxacillin konnten mit der Methode erfasst werden. Das Potentialoptimum für Flucloxacillin lag in der Größenordnung der anderen Isoxazolylpenicilline. Nafcillin und Penicillin V zeigten bei ca. 600 mV ein geeignetes Messpotential. Die Quantifizierung von Standardlösungen war für die Penicilline Penicillin V, Oxacillin, Cloxacillin, Flucloxacillin, Nafcillin und Dicloxacillin möglich.

Bei den Versuchen in Milchmatrix ergaben sich Probleme durch auftretende Störpeaks zur Retentionszeit von Penicillin V und Oxacillin, die aus der Oxidation bzw. Reduktion der Matrixbestandteile bei dem gegebenen Potential resultierten. Eine Validierung und weitere Optimierung der Methode zur Analyse anderer Penicilline wurde nicht durchgeführt. In der amtlichen Praxis werden mittlerweile überwiegend LC-MS-Untersuchungen durchgeführt, über die ein breites Spektrum von Antibiotikarückständen quantifiziert und identifiziert werden kann. Die „wall jet“-Messzelle verbesserte die Empfindlichkeit der Messung nicht in einem Maße, wie es für die Penicillinanalytik wünschenswert gewesen wäre.

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass eine Penicillinanalytik mittels amperometrischer Detektion bei einem konstanten Potential über die Kombination von photochemischer Derivatisierung und Messung über eine Goldelektrode möglich ist.

### 3.3 Methode zur Bestimmung von Nafcillin und Flucloxacillin in Milch

Bei dem semisynthetischen Antibiotikum Nafcillin handelt es sich um ein penicillinase- und säurestabiles Penicillin, das gegen Gram-positive Bakterien wirkt. Damit lässt es sich veterinärmedizinisch wie die Isoxazolylpenicilline einsetzen. Nafcillin kann zur Mastitisbehandlung intramammär injiziert werden und wird zum größten Teil wieder über die Milch ausgeschieden. Das Allergierisiko, das auch beim Nafcillin durch den geöffneten  $\beta$ -Lactamring hervorgerufen wird, ist geringer einzustufen als beim Penicillin G. Studien zum Ausscheidungsverhalten von Nafcillin in Kuhmilch nach Behandlung von Eutern ergaben eine Konzentration in der Milch von unter 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nach der vierten Melkzeit [Committee for Veterinary Medicinal Products, 2001]. Da aber das Ausscheidungsverhalten von vielen Faktoren, wie z.B. der Zubereitung des Präparates, bspw. ölig oder wässrig, abhängig ist, kann dieses Konzentrations-Zeit-Verhältnis stark schwanken [Kroker, 2002]. Veterinärmedizinische Präparate sind z.B. „Nafpenzal L<sup>®</sup>“ oder „Nafpenzal T<sup>®</sup>“ der Firma Intervet International [Petrausch, 2000]. Nafcillin wurde im April 2001 in den Anhang I der Verordnung EWG/2377/90, dem Verzeichnis der pharmakologisch wirksamen Stoffe, für die Höchstmengen für Rückstände festgesetzt sind [Verordnung EWG/2377/90, 1990], mit einem MRL-Wert von 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  für Milch und 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in Muskel, Fett, Leber oder Nieren von Rindern aufgenommen und findet seitdem in der Veterinärmedizin Anwendung.

Zur Bestimmung von Nafcillin in Kuhmilch sind in der Literatur nur wenige Verfahren beschrieben [Becker et al., 2001; Daeseleire et al., 2000; Taguchi et al., 1999]. Bei den ersten beiden handelt es sich dabei um LC-MS/MS Methoden. Für große Probenserien bei speziellen wissenschaftlichen Studien sind einfache LC-Methode jedoch oft von Vorteil.

Das Humanantibiotikum Flucloxacillin ist ein Isoxazolylpenicillin, welches ebenfalls penicillinase- und säurestabil ist. Flucloxacillin wird überwiegend bei Infektionen eingesetzt, die durch Staphylokokken verursacht werden. Dies können Infektionen der Haut, Schleimhäute und Weichteile, wie bspw. Brustentzündungen sein. Handelspräparate sind z.B. „Staphylex 250<sup>®</sup>“ von der Firma Smith Kline Beecham Pharma oder „AB-Flucloxacillin 1000<sup>®</sup>“ von der Firma Curasan / Astrapin [Rote Liste, 2002]. Da beim Antibiotikum Flucloxacillin nicht auszuschließen ist, dass es bald auch in der Veterinärmedizin angewendet wird oder schon zur Zeit illegal Anwendung findet,

wurde eine Methode zur Bestimmung sowohl von Nafcillin als auch Flucloxacillin neben Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin entwickelt. Da beide Substanzen Nafcillin und Flucloxacillin ähnliche Eigenschaften wie die Isoxazolympenicilline Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin aufwiesen, konnte davon ausgegangen werden, dass sie sich bei Aufarbeitung, Trennung, Derivatisierung und Detektion leicht in die Methode einfügen lassen.

Die mittels DAD aufgenommenen UV-Absorptionsspektren der photochemisch derivatisierten Produkte bestätigen diese Erwartungen (Punkt 2.3.1). Das Absorptionsmaximum für das Flucloxacillin liegt bei 300 nm. Für das Nafcillin ergibt sich ein Maximum bei der etwas geringeren Wellenlänge von 280 nm, aber auch bei 300 nm ist eine Detektion, wenngleich mit etwas geringerer Empfindlichkeit, möglich.

Nafcillin und Flucloxacillin zeigten im Chromatogramm ähnliche Retentionszeiten. Eine Trennung der beiden Analyten (Punkt 2.2) konnte nach dem Wechsel einer unbrauchbar gewordenen, mit vielen Matrixproben genutzten, alten Säule durch eine Säule gleichen Typs nicht wiederholt werden. Auch durch eine Modifizierung der HPLC-Analyse konnte keine bessere Trennung erreicht werden, ohne die Trennung und Detektion der anderen Isoxazolympenicilline zu verschlechtern.

Die bestimmten Verfahrenskennndaten wurden im Bereich von 15 µg/kg (1/2 x MRL), 30 µg/kg (1 x MRL) und 60 µg/kg (2 x MRL) ermittelt, da in diesem Arbeitsbereich auch die zu erwartenden Rückstandskonzentrationen liegen. Tabelle 18 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Penicillin	Wiederfindung [%]*	Variations- koeffizient [%]*	Nachweisgrenze [µg/kg]*	Verfahrensvariations- koeffizient [%]*
Nafcillin	67	9	10	9
Flucloxacillin	67	5	8	6

\*Gemittelte Werte aus jeweils 36 Bestimmungen.

**Tabelle 18: Zusammenfassung der ermittelten Verfahrenskennndaten**

Die ermittelten Verfahrenskennndaten entsprechen, wie unter Punkt 2.3.2 ausgeführt, den von der EU geforderten Standards [Entscheidung der Kommission 93/256/EWG, 1993].

Durch die ähnlichen Eigenschaften der Analyten Nafcillin und Flucloxacillin mit den drei Isoxazolympenicillinen, kann davon ausgegangen werden, dass die Analyse auch für Milch von behandelten Tieren mit Rückständen von Nafcillin und Flucloxacillin geeignet ist. Hierzu wurde ein Vergleich der wässrigen Probenaufarbeitung mittels Ultrafiltration und einer herkömmlichen Acetonitril-Lösemittelextraktion an dotierten und gewachsenen Milchproben mit den Isoxazolympenicillinen Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin durchgeführt, über den gezeigt werden konnte, dass sich die Extraktionsausbeuten nach den beiden Extraktionsverfahren für die drei Penicilline nicht nennenswert unterscheiden [Ibach, 1999].

Zur Bestimmung von Flucloxacillin in Humanmilch liegen in der Literatur kaum Studien vor. So ist in einem zu dieser Thematik erst kürzlich neu aufgelegtes Standardwerk Flucloxacillin mangels vorliegender Daten gar nicht bewertet [Briggs et al., 2002].

Für die Analytik von Flucloxacillin in Frauenmilch stand nur wenig Muttermilch zur Verfügung. Es handelte sich hierbei um Milch einer seit 3 Monaten stillenden Mutter. Da sich die Konzentrationen der Bestandteile in der Muttermilch im Verlauf der Laktation ändern [Dockter und Grundler, 1995], ist eine Probenmilch aus der Mitte der empfohlenen Stillzeit zum Test herangezogen worden. Die Analyse im gewählten Konzentrationsbereich von 60 µg/kg und in höheren Konzentrationsbereichen ist für Flucloxacillin in Frauenmilch möglich, auch wenn für die zugrundeliegenden Versuchsergebnissen nur eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde und die Aussagekraft der Ergebnisse damit gering ist.

---

## 3.4 Einfluss von technologischen Prozessen auf Penicillinrückstände in Milch und Joghurt

### 3.4.1 Darstellung der Problematik

Für Penicillinrückstände in Milch wurden in der EU MRL-Werte festgesetzt [Verordnung EWG/2377/90, 1990]. Diese Höchstmengen sind nicht aufgrund des toxikologischen Risikos der Penicilline festgelegt, da dieses eher als gering einzustufen ist (siehe auch unter Punkt 1.2.4), sondern wegen der immunphatologischen Wirkung, wie unter Punkt 1.2.5 ausgeführt wurde, und wegen des Einflusses der Penicilline auf technologische Prozesse, z.B. die Hemmung der wirksamen Bakterien in Fermentationsprozessen wie der Joghurtproduktion [Tamime und Robinson, 1999]. Bisher ist nur wenig zum Einfluss verarbeitender Prozesse auf Penicillinrückstände bekannt [Becker, 1966; Rose et al., 1997b; van Egmond et al., 2000]. Haagsma gab auf der EuroResidue Konferenz II 1993 einen Überblick über die Stabilität verschiedener Antibiotika in Lebensmitteln [Haagsma, 1993] und Moats veröffentlichte 1999 einen Review-Artikel zu Effekten auf Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln durch technologische Verfahren [Moats, 1999]. Bei diesen Arbeiten wurde aber nur auf die Lagerstabilität und Erhitzungsprozesse in Bezug auf die Milchverarbeitung eingegangen. So mahnte das Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food im Jahr 2001 das Fehlen von Studien für die Effekte der Lebensmittelverarbeitung auf die Rückstände an. Die Kommission stellte fest, dass die meisten Verarbeitungsprozesse der Milch einen Einfluss auf das Konzentrationsniveau der Tierarzneimittelrückstände haben und über deren Verbleib bisher nur unzureichende Forschungsergebnisse vorliegen [Codex Alimentarius Commission, 2001].

Anhand der Joghurtherstellung sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, wie sich Penicillinrückstände in Milch verhalten. Dazu greift die Arbeit jene Prozessparameter der Produktion heraus, welche für die Veränderung der Penicillinrückstände und Konzentrationen verantwortlich sein können: die Erhitzung auf 90 °C, die Lagerung, der Zusatz von Starterkulturen und damit die Veränderung der Proteinstruktur der Milch.

Ein weiterer Aspekt ist die Reduzierung der Penicillinrückstände in Milch unter den MRL-Wert durch Verarbeitungsschritte wie dem Fermentationsprozess. Nach Codex Alimentarius darf ein Betrieb Rohstoffe, in diesem Fall Milch, annehmen, wenn bekannt ist, dass er die enthaltenen Tierarzneimittelrückstände durch Verarbeiten auf ein

annehmbares Maß reduzieren kann [Codex Alimentarius, 1997]. Nach §3 I Nr. 1 Milchverordnung, ist dies in der EU nicht erlaubt, da Rohmilch, die zur Abgabe an andere bestimmt ist, nur von Tieren gewonnen werden darf, die keine Anzeichen einer Störung des allgemeinen Gesundheitszustandes aufweisen [Milchverordnung, 1995]. Mit Penicillinen behandelte Tiere sind aber in der Regel erkrankt. Außerhalb der EU ist also je nach nationalen Gesetzen die Reduzierung der Tierarzneimittelrückstände in Milch über technologische Prozesse erlaubt. Die vorliegende Arbeit zeigt die Möglichkeit des Einsatzes der Fermentation hierfür auf.

### **3.4.2 Stabilität von Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin bei der Erhitzung von Milch**

Ein Prozessparameter der Joghurtproduktion ist die zweite Erhitzung der zu verarbeitenden Milch. Die erhöhte Temperatur dient nicht nur zur Denaturierung der Molkenproteine und damit zur Herstellung einer besseren Joghurttextur, sondern auch zum Abtöten pathogener Mikroorganismen, Veränderung der Aromakomponenten über Aminosäurereaktionen und der Inaktivierung von Enzymen. Die Wahl des Verfahrens hängt von der vorherigen Behandlung der Milch ab, oft eine UHT-Behandlung. Zur Erhitzung der Milch sind mehrere Varianten üblich. Tamime und Robinson [Tamime und Robinson, 1999] geben in ihrem Standardwerk zur Joghurtproduktion Zeiten von 5 Minuten bei 95 °C bis 30 Minuten bei 85 °C an. Für die Praxis in Deutschland ergaben Anfragen bei den Firmen Bauer (Wasserburg/Inn) und Tuffi-Campina (Köln), dass dort Verfahren von 10 Minuten bei 90-95 °C bzw. 15 Minuten bei 85-90 °C im Einsatz sind, so dass für die eigenen Versuche eine Zeit von 15 Minuten bei 90 °C gewählt wurde. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde der industriellen Praxis folgend UHT-Milch eingesetzt. Die Versuche sollten neben der Quantifizierung des Abbaus auch zeigen, welche Unterschiede zwischen Milch und wässrigen Lösungen bestehen, also welchen Einfluss die Milchmatrix bei hohen Temperaturen auf die Penicillinrückstände nimmt.

Die Ergebnisse zeigen einen Abbau der Penicilline in Milch zwischen 5 und 42 % je nach Penicillin und Ausgangskonzentration. Im Konzentrationsbereich der MRL-Werte von 30 µg/kg liegt die Stabilität der bestimmten Penicilline bei 58-83 %. Nafcillin erwies

sich als deutlich stabiler in diesem Konzentrationsbereich (83 %) als die drei Isoxazolympenicilline (58-72 %) und zeigte auch bei höheren Konzentrationen keine signifikante Änderung im Abbauverhalten bezogen auf die Ausgangskonzentration. Dieser Unterschied ist mit dem gegenüber den Isoxazolympenicillinen anderen chemischen Aufbau und den damit geänderten Eigenschaften zu begründen. Die Isoxazolympenicilline zeigen eine Zunahme der Stabilität mit der Konzentration. Im Vergleich der Matrices, Wasser oder Milch, zeigte sich ein stabilisierender Effekt der Milchmatrix bei niedrigen Konzentrationen. In Wasser blieben am MRL-Wert 30-37 % der Penicilline stabil, in Milch dagegen zwischen 58 und 83 %. Dieser stabilisierende Effekt der Milchmatrix wird im Vergleich zu den wässrigen Proben mit zunehmender Penicillinkonzentration geringer. Eine Begründung könnte sein, dass die Milchmatrix, z.B. die Proteine, durch ihre Bindung der Penicilline einen Schutz aufbauen, der mit der Zunahme der Penicillinkonzentration in geringerem Maße gegeben ist.

In der Literatur ist zu dieser Thematik wenig beschrieben. So wird berichtet, dass in Milch mit einem Gehalt von 1,5 mg/kg Penicillin G der Rückstandsgehalt an frei verfügbarem Penicillin um 30 % durch eine 20-minütige Heißhaltezeit bei 90 °C sinkt [Konecny, 1978]. Hierbei wird das Verhalten der Penicilline weit über dem MRL-Wert betrachtet. Andere Versuche wurden bei einer Konzentration an Penicillin G von 10 µg/kg durchgeführt und kommen bei einer Erhitzung von 100 °C über 30 Minuten zu einem Abbau von bis zu 40 % [Pilet et al., 1969]. Solche Temperaturen und Zeiten sind bei der Joghurtproduktion jedoch unüblich. Studien zu den häufig in der Mastitisbehandlung und damit als Rückstände in der Milch wieder zu findende Isoxazolympenicilline liegen nicht vor. Die obengenannten Studien bestätigen aber die Größenordnung der Ergebnisse der durchgeführten Versuche für Penicilline.

### **3.4.3 Einfluss der Joghurtkulturen auf Penicillinrückstände in Milch**

Als Analyten wurden die Penicilline Cloxacillin und Penicillin G gewählt, welche beide für die Therapie von milchliefernden Kühen häufig angewandt werden. Sie weisen unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf die Säurestabilität auf und konnten mit zwei verschiedenen analytischen Methoden, HPLC bzw. Charm® II-Test, bestimmt werden.

Bei der Bestimmung des Cloxacillins ergaben sich Probleme bei der Interpretation der Ergebnisse. Die durch den technologischen Prozess geänderte Matrix beeinflusste nachteilig die analytische Wiederfindung der Methode und damit die Quantifizierung der Effekte der Fermentationsparameter. Daher wurden als Vergleich die Werte für die Bestimmung von Cloxacillin 1.) in dotierten Lösungen bei pH 4,5 (wässrig ohne Milch), 2.) in dotierter Milch, 3.) in dotiertem fertigen Joghurt, 4.) in dotierter Milch mit anschließend über den pH-Wert gefällten Proteinen und 5.) in dotierter und anschließend fermentierter Milch, durchgeführt (siehe Tabelle 15 unter Punkt 2.4.3.1 und Tabelle 19). Der Vergleich der Resultate zeigte einen stärkeren Abbau an Cloxacillin bzw. eine geringere Wiederfindung in der Reihenfolge von 1.) nach 5.). Dies lässt die Interpretation zu, dass nicht nur die Parameter pH-Wert, Temperatur und Zeit einen Einfluss auf die Stabilität der Penicilline hatten, sondern auch die Joghurtkulturen einen Abbau von Cloxacillin bewirkten.

Penicillin	Matrix	Starter- kulturen	Säuerung mit Milchsäure	Analysen- Methode	Wieder- findung
Cloxacillin	Wasser	nein	nein	HPLC	100 %
Cloxacillin	Wasser	nein	ja	HPLC	80 – 85 %
Cloxacillin	Milch	nein	nein	HPLC	80 – 85 %
Cloxacillin	Joghurt	ja	nein	HPLC	70 %
Cloxacillin	Milch	nein	ja	HPLC	65 – 70 %
Cloxacillin	Milch	ja	nein	HPLC	60 – 65 %

**Tabelle 19: Überblick über die Stabilität der untersuchten Cloxacillin-Proben**

Dies bestätigten auch die Bestimmungen von Penicillin G mittels Charm<sup>®</sup> II Test. Hier ergaben sich keine, durch die verschiedenen Matrices hervorgerufenen, methodenbedingten Probleme. Die Ergebnisse zeigen einen Einfluss der Starterkulturen auf die Rückstände.



Penicillin	Matrix	Starter- kulturen	Säuerung mit Milchsäure	Analysen- Methode	Wieder- findung
Penicillin G	Milch*	nein	nein	Charm II®	92-97 %
Penicillin G	Joghurt	ja	nein	Charm II®	100 %
Penicillin G	Milch	nein	ja	Charm II®	100 %
Penicillin G	Milch	ja	nein	Charm II®	50 %

**Tabelle 20: Überblick über die Stabilität der untersuchten Penicillin G-Proben**

(\*Die Milch wurde behandelt und gelagert wie bei einem Fermentationsvorgang, siehe Punkt 2.4.3.2)

Es war mit dieser Arbeit also erstmals möglich, nicht nur die negativen Einflüsse der Penicilline auf die Joghurtproduktion zu zeigen, die bei der Fermentation das Wachstum der Starterkulturen hemmen, sondern auch, dass Antibiotikarückstände von den verschiedenen Produktionsparametern beeinflusst werden. Hierbei ist der Einfluss der pH-Wert-Veränderung gering. Die Faktoren Temperatur, Zeit und auch die Starterkulturen spielen eine Rolle bei dem Abbauprozess der Penicilline.

Die Ergebnisse legen dar, dass die Kulturen einen Einfluss auf den Abbau und die Proteinbindung der Penicilline haben. Dabei ist anzunehmen, dass von den frisch injizierten Penicillinen im Euter der erkrankten Kuh, durch Stoffwechselaktivität der Bakterien, Abbauprodukte bereits vor dem Melken gebildet werden. Dies muss nicht auf den in der Literatur beschriebenen Reaktionswegen erfolgen.

Rohner, Schällibaum und Nicolet haben zu Penicillinrückständen und deren Abbauprodukten in Milch bereits 1984 eine Studie durchgeführt [Rohner et al., 1985]. Hierbei untersuchten sie mittels ELISA die Konzentrationen an Penicillin G und Benzylpenicilloyl in frisch gemolkener Kuhmilch nach intramammärer Applikation und stellten einen zügigen Abbau beider Produkte nach wenigen Tagen fest. Sie zeigten, dass das Derivat nicht länger nachweisbar war als Rückstände von intaktem Penicillin. Rohner et al. schließen daraus ein geringes Allergierisiko für den Verbraucher. In

diesem Artikel wird frisch gemolkene Milch (Rohmilch) untersucht, nicht wie in der eigenen Arbeit gelagerte oder verarbeitete.

Beide Untersuchungen zeigen, dass das Allergierisiko für den Verbraucher gering ist. Die eigenen Versuche konnten zeigen, dass sich bei der Verarbeitung von Milch verschiedene Abbauprodukte bilden und Anteile des Penicillin G an Proteine binden, dass intaktes Penicillin G jedoch immer im Überschuss vorliegt. Da der größte Teil des applizierten Wirkstoffs über die Milch und den Urin (Punkt 1.2.4) wieder ausgeschieden wird, ist ein Allergierisiko nur bei nicht Einhalten der vorgeschriebenen Wartezeit für das jeweilige Präparat, z.B. bei „Ab-Hof-Milch“ aufgrund des fehlenden Verdünnungseffektes, zu erwarten.

Eine Reduktion von Penicillinrückständen in Milch unter den gesetzlich vorgeschriebenen Höchstwert mit Hilfe der beschriebenen technologischen Prozesse ist prinzipiell möglich. Durch den Fermentationsprozess kann bspw. der Penicillin G - Gehalt unter den nach Codex Alimentarius festgelegten MRL-Wert von 4 µg/kg [Codex Alimentarius, 1995] gesenkt werden. Für die Milchindustrie würde dies jedoch zu technologischen und finanziellen Nachteilen führen, da eine Fermentationsverzögerung die Folge wäre. Ebenso sind zusätzliche Probleme wie schlechte Textureigenschaften zu erwarten. In afrikanischen Ländern mit wenig Milchproduktion, kann diese technologische Reduktion, auch aufgrund der fehlenden Verdünnungsmöglichkeit, durchaus sinnvoll sein, wobei eine geringe Penicillinkonzentration in der Milch bekannt sein muss. Innerhalb der EU ist die Verwendung penicillinhaltiger Milch nicht zugelassen (Punkt 3.4.1).

#### **3.4.4 Entstehung von Abbauprodukten von Penicillinrückständen in Milch durch technologische Prozesse**

Die Codex Alimentarius Kommission hat, wie bereits beschrieben, die Untersuchung zur Veränderung der Tierarzneimittelrückstände in Milch angemahnt. Für die Penicilline sind aus der Literatur die Reaktionswege gegenüber nucleophilem und elektrophilem Angriff (Punkt 1.2.2.3), die Reaktionen mit Proteinen (Punkt 1.2.6) sowie die Reaktionen zu Dimeren und Polymeren (Punkt 1.2.7) bekannt. Es wurden also

---

Penicillosäure, Penicillensäure, Penillsäure, Penillosäure, Penicillamin, und Polymere des Penicillins als Abbauprodukte erwartet.

Als Methode zur Bestimmung dieser Produkte war die LC-MS/MS mit Elektrospray-Ionisation und Triple-Quadrupol-Technik als Massenspektrometer geeignet, da bei der Elektrospray-Technik die Massen auch unzersetzt in den Massenspektrometer gelangen können. Dies war für einen Scan auf die erwarteten Masse / Ladungs-Zahlen sowie dem Scan auf weitere unbekannte Substanzen wichtig, da für Fragmente keine Vergleichsspektren vorlagen. Des Weiteren hat sich diese Technik für die Analytik der Penicilline durchgesetzt (Punkt 1.2.9.2), so dass Methoden zur Bestimmung von intakten Penicillinen vorlagen [Becker et al., 2001].

Als Tierarzneimittelrückstände wurden die Penicilline Penicillin G und Cloxacillin, als in die Mastitisbehandlung häufig eingesetzte und damit in der Milch zu identifizierende Substanzen, untersucht. Die beiden Penicilline unterscheiden sich in ihrer Eigenschaft der Säurestabilität, Cloxacillin gilt als säurestabil [Schröder et al., 1982]. Die Penicilline sind damit in Bezug auf den zu erwartenden elektrophilen Angriff und damit dem Abbau, besonders interessant.

Es wurden Versuche in Ameisensäurelösung sowie Milchsäurelösung durchgeführt. Ameisensäure wurde gewählt, da bei einem niedrigen pH-Wert (pH 2) ein deutlicherer Abbau und damit die bessere Identifizierung der Produkte erwartet wurde. Ameisensäure ist auch Bestandteil des LC-MS-Eluenten und erbringt somit keine Probleme bei der Ionisation der Substanzen. Milchsäure wurde als bei der Joghurtproduktion entstehende Säure zum Vergleich des technologischen Prozesses (pH 4) gewählt. Als Produkte wurden in diesen Lösungen, neben den Ausgangsverbindungen Penicillin G und Cloxacillin, Penicillosäure, Penillosäure und vor allem Penillsäure gefunden. Der hohe Anteil an Penillsäure nach saurem Abbau bestätigt die Angaben aus der Literatur [van Krimpen, et al., 1987], die einen Abbau von Penicillin G zu 37 % zu Penillsäure angeben. Weitere 10 % Penillsäure entstehen nach van Krimpen über die zu 50 % entstandene Penicillensäure, welche sich zu 20 % zu Penillsäure umwandelt. Eine graphische Darstellung zeigt Abbildung 5 (unter Punkt 1.2.2.3). Deutliche Unterschiede zeigen sich in der Intensität des Abbaus, abhängig vom pH-Wert. Bei pH 2 (Ameisensäurelösung) zeigt sich ein weitergehender Abbau über die Penillosäure hinaus, zu Substanzen mit kleineren Massen, von denen im LC-MS-Versuch keine mehr zu identifizieren waren. Bei pH 4 (Milchsäurelösung) sind die

---

Ausgangssubstanzen sowie die in Abbildung 5 aufgeführten Abbauprodukte wesentlich stabiler.

Cloxacillin erwies sich, wie erwartet, als säurestabiler als Penicillin G. Bei pH 2 war Cloxacillin zu 50 % stabil, Penicillin G war fast vollständig abgebaut; bei pH 4 war Cloxacillin zu 90 % stabil (Penicillin G zu 50 %), wobei die Abbauprodukte die entsprechenden zum Penicillin G waren.

In den dotierten Milchproben bestätigten sich die in wässrigen Lösungen gemachten Erfahrungen. Die Lagerung der mit Penicillin G dotierten Milchproben über 3 Tage zeigte beim natürlichen pH-Wert einen 10 %-Anteil von Penillsäure bezogen auf das intakte Penicillin G. Bei den Lösungen von pH 4 entstand Penillsäure als Hauptabbauprodukt. Die Cloxacillin-Proben enthielten im Verhältnis zur Penillsäure einen höheren Anteil an Penillosäure. Der abgebaute Anteil in den Cloxacillinproben ist jedoch aufgrund der Säurestabilität gering. Der Abbau der Penicillensäure zu Penillosäure scheint im Gegensatz zum Abbau zur Penillsäure bei Penicillin G bevorzugt zu sein. Ein weiterer Grund könnte die Umwandlung von Penillsäure zu Penillosäure sein.

Bei Joghurtproben ergab sich das Problem der Unterscheidung von Matrix und Analyt aufgrund der geringen Konzentrationen an Penicillin. Um einen noch intakten Joghurt bei der Fermentation zu erhalten, wurden die Proben am MRL-Wert dotiert. Wegen der geringen Konzentrationen an Penicillin wurden die Proben durch wässrige oder Acetonitril-Extraktion aufkonzentriert (Punkt 5.5.2). Durch diese unterschiedlichen Aufarbeitungsschritte ergaben sich voneinander abweichende Ergebnisse, so dass keine aussagekräftigen Resultate vorliegen. Neben dem intakten Penicillin G bzw. Cloxacillin konnte nach der Fermentation nur bei einem Ansatz Penicillosäure identifiziert werden, aufgrund der geringen Ausgangskonzentration gelang es ansonsten nicht, andere Produkte zu identifizieren.

Über die durchgeführte Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass es sich bei den Hauptabbauprodukten in Milch um Penillsäure, Penicillosäure und Penillosäure handelt. Der Abbau von Penicillinen in Milch findet auch ohne einen technologischen Prozess der Säuerung wie der der Fermentation bereits statt.

### 3.5 Bindung von Penicillinen an Milchproteine

Penicilline haben die pharmakologische Eigenschaft, zu großen Teilen an Proteine, bspw. Serumproteine, zu binden. So sind in der Literatur vor allem Bindungen zu Albumin beim Menschen beschrieben. Die Penicilline untereinander zeigen beim Anteil der Bindung große Unterschiede. Die prozentuale Bindung an Blutplasmaprotein des Menschen [Chambers und Neu, 1995] und der Kuh [Baggott, 1977] zeigt Tabelle 21. Für die Bindung an Milchproteine liegen in der Literatur keine Zahlen vor. Beim Hauptprotein des Blutplasma handelt es sich mit 55-65 % um Serumalbumin [Jakubke und Jesschkeit, 1975]. Auch bei den Milchproteinen sind mit Lactalbumin (4 % bezogen auf Gesamtmilchprotein) bzw. Serumalbumin (1 %) unter den Molkenproteinen ähnliche Proteine vorhanden. Hauptvertreter der Molkenproteine ist das  $\beta$ -Lactoglobulin mit 9 % der Milchproteine. Die mengenmäßig wichtigsten Proteine in der Milch sind die Caseine mit 80 %, wobei die Hauptanteile mit 34 % auf  $\alpha_{S1}$ -Casein und mit 25 % auf  $\beta$ -Casein entfallen. Der Vergleich zeigt für  $\alpha_{S1}$ -Casein eine Peptidkette mit 199 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 23.600 Da,  $\beta$ -Casein besitzt 209 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 24.000 Da; beiden fehlt die Aminosäure Cystein [Belitz et al., 2001]. Serumalbumin besteht aus 583 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 66.400 Da [Jakubke und Jesschkeit, 1975].

Penicillin	Proteinbindung	Proteinbindung	Proteinbindung	Proteinbindung
	(%) Mensch *	(%) Kuh **	(%) Milch ***	(%) Caseinlg. ***
Dicloxacillin	97			
Cloxacillin	94	71	20	8
Oxacillin	93			
Nafcillin	87			
Penicillin G	55	48	5	8
Ampicillin	17		1,5	1
Amoxicillin	17			

**Tabelle 21: Bindung von Penicillinen an Blutplasma des Menschen und der Kuh im Vergleich zu den ermittelten Bindungen in der Milch**

\* Chambers und Neu, 1995, \*\* Baggott, 1977, \*\*\* eigene Werte, 2002

Der Vergleich der Literaturwerte der Bindungen an Blutplasmaproteine mit denen in dieser Arbeit bestimmten Bindungen an Milchproteine, bestätigt die Unterschiede der Penicilline. Auch in der Milch bindet Cloxacillin am stärksten und die Aminopenicilline (Ampicillin) am schwächsten. Dies kann mit der Struktur der Penicilline erklärt werden, hierbei scheint die Hydrophobität entscheidend. Die Bindungen an Proteine sind bei einem unpolaren Acylrest stärker als bei Verbindungen mit polarer Seitenkette [Schröder et al., 1982]. Dies bestätigen auch die erarbeiteten Ergebnisse für Penicillin G (mittelpolar) und Ampicillin (polar). Nach Ruso et al. sind adsorptive Bindungen durch negative Ladungen an kationische Aminosäureseitenketten wahrscheinlich [Ruso et al., 2001]. Es handelt sich bei der Bindung an die Proteine um hydrophobe Wechselwirkungen; dabei bilden sich micellenartige Strukturen der Penicilline aus. Die Wechselwirkung besteht zu den hydrophoben Kavitäten im Protein. Dabei scheinen Chloratome die hydrophobe Wechselwirkung zu verstärken [Taboada et al., 2000b]. Die Isoxazolympenicilline zeigen deutlich stärkere Wechselwirkungen mit Proteinen als andere Penicilline. Dicloxacillin bindet laut Tabelle 21 auch besser an humanes Serumalbumin als Cloxacillin. Cloxacillin bindet in den durchgeführten Arbeiten besser als Penicillin G. Dieses Resultat ist gut vereinbar mit den Angaben der Literatur.

Der geringere Anteil der Proteinbindung in der Milch gegenüber der Bindung an Plasmaproteine kann durch die unterschiedliche Proteinzusammensetzung, vor allem durch den hohen Anteil der Caseine, erklärt werden. Die ELISA-Ergebnisse für Ampicillin und Cloxacillin fallen für Milch und Caseinlösung unterschiedlich aus. Beim Cloxacillin bindet in der Milch 20 % des Penicillins, in der Caseinlösung nur 8 %, daraus folgt die Annahme, dass die „fehlenden 12 %“ gegenüber Milch am Molkenprotein gebunden sind. Eine Erklärung hierfür wäre das Fehlen von Cystein in  $\text{Alpha}_{S1}$ -Casein und  $\beta$ -Casein. Die SH-Gruppen des Cysteins bilden Disulfidbrücken mit den  $\beta$ -Lactamen aus (Punkt 1.2.6) und binden so das Penicillin. Casein bindet Penicilline hauptsächlich über die Aminosäure Lysin [Guay et al., 1987].

Zwischen den ELISA- und Charm<sup>®</sup> II-Test-Resultaten liegt eine große Diskrepanz. Möglich wäre, dass der Charm<sup>®</sup> II-Test entweder durch die Proteine in der Detektion der abgebauten Penicilline gestört ist oder der Rezeptor zur Detektion doch ein intakteres Penicillinmolekül benötigt, anders als durch die Versuche mit dem kompetitiven Assay angenommen. Ebenso ist es möglich, dass der Rezeptor des

Charm<sup>®</sup> II-Tests spezifisch auf den Isoxazolylrest ist, dieser „Bindeort“ aber Reaktionen mit den Proteinen eingeht.

Bei den Ergebnissen zur Proteinbindung der Penicilline handelt es sich um orientierende Werte, da die verwendeten Methoden semiquantitative Verfahren mit entsprechender Streuung der Messwerte darstellen. Aufgrund der Systematik des ELISA-Tests wären aber eher höhere als niedrigere Anteile gebundener Rückstände zu erwarten, da die proteingebundenen Penicilline wie freie Penicilline ausgewertet wurden.

## 4 Zusammenfassung

Penicilline gehören zu den am häufigsten verwendeten Antibiotika in der Tiermedizin. Allein in der Europäischen Union werden im veterinärmedizinischen Bereich 225 t pro Jahr verbraucht. Ein Anwendungsschwerpunkt für Penicilline ist die Behandlung von Euterentzündungen (Mastitis) bei Milchvieh, was zu Penicillinrückständen in der Milch behandelte Tiere führt.

Für die Zulassung von Tierarzneimitteln, die zur Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren vorgesehen sind, müssen in der EU den Zulassungsbehörden Rückstandsdaten nur von gesunden Tieren geliefert werden, die mit dem betreffenden Arzneimittel behandelt worden sind. Literaturhinweisen zufolge kann eine Entzündung des Euters jedoch zu einer verzögerten Ausscheidung z.B. von Antibiotika über die Milch führen, so dass in Frage steht, ob die für gesunde Tiere vorgeschriebenen Wartezeiten auch für erkrankte Tiere hinreichend sind und die festgesetzte Höchstmenge innerhalb der Wartezeit zuverlässig unterschritten wird.

In einer Pilotstudie zu dieser Fragestellung wurden vier an Mastitis erkrankte Kühe intramammär mit dem in Deutschland mit einer Wartezeit von sechs Tagen zugelassenen Tierarzneimittel Eumacid, das als antibiotisch wirksame Komponente das penicillinasefeste Isoxazolympenicillin Cloxacillin enthält, behandelt. Die von diesen Kühen erhaltenen Gesamtgemelke wurden mittels vier qualitativer mikrobiologischer bzw. immunchemischer Screening-Verfahren (Delvotest SP<sup>®</sup>, BR-AS spezial<sup>®</sup>, Penzym S<sup>®</sup>-Test und Snap<sup>®</sup>test) auf die Anwesenheit von Rückständen geprüft und die dabei erhaltenen Befunde mit den über eine quantitative HPLC-Methode erhaltenen Daten verglichen. Im Vergleich der vier qualitativen Tests und der quantitativen HPLC-Methode zeigte sich eine ausgezeichnete Korrelation. Zur Fragestellung einer ausreichenden Wartezeit konnte festgestellt werden, dass die vorgeschriebene Wartezeit eine gute Sicherheit bezogen auf die Einhaltung des MRL-Wertes gewährleistet.

Eine etablierte Methode zur Bestimmung von drei Isoxazolympenicillinen in Milch mittels on-line SPE und photochemischer Nachsäulenderivatisierung wurde als Grundlage zur



---

Entwicklung einer Quantifizierungsmethode für Penicilline, unter Einsatz einer innovativen „wall jet“-Messzelle, zur elektrochemischen Detektion verwendet.

Das Penicillin Nafcillin ist im April 2001 für die intramammäre Anwendung in der Veterinärmedizin bei Rindern mit einer Höchstmenge von 30 µg/kg in Milch zugelassen worden. Daher wurde eine einfache und schnelle HPLC-Methode zur Bestimmung von Nafcillin neben den Isoxazolympenicillinen Cloxacillin, Oxacillin und Dicloxacillin in Milch entwickelt und validiert. In die Analytik wurde zusätzlich Flucloxacillin, ein in der Humanmedizin in den letzten Jahren zur Behandlung von Brustentzündungen eingesetztes Isoxazolympenicillin, integriert. Das Verfahren könnte somit auch für Studien zu Flucloxacillin in Humanmilch eingesetzt werden.

Die Codex Alimentarius Kommission der FAO und der WHO der Vereinten Nationen hat in ihrem Bericht aus dem Jahre 2001 festgestellt, dass die Verarbeitung von Nahrungsmitteln Einfluss auf Tierarzneimittelrückstände haben kann, der bisher kaum untersucht worden sei. Am Beispiel der Joghurtherstellung wurde gezeigt, wie Penicilline einerseits auf die Fermentation Einfluss nehmen und andererseits, welche Veränderungen die Penicillinrückstände während des Herstellungsprozesses erfahren. Dazu wurde Milch mit Cloxacillin und Benzylpenicillin versetzt, so dass Rückstandskonzentrationen im Bereich der Höchstmengen resultierten. Mit dieser Milch wurde dann der üblichen industriellen Praxis folgend Joghurt unter Laborbedingungen hergestellt. Zu einer Abnahme von Penicillinen kommt es durch den Faktor Temperatur bei der Heißhaltephase (90 °C, 15 min) der Milch vor der Zugabe der Joghurtkulturen, durch die Starterkulturen und durch den Säureeinfluss aufgrund der bakteriellen Milchsäureproduktion.

Durch den technologischen Herstellungsprozess bei Joghurtprodukten wird die Reduzierung von Penicillinrückständen in Milch unter die gesetzliche Höchstmenge, wenngleich auch im Umfang eingeschränkt, bei niedrigen Ausgangskonzentrationen, ermöglicht. Innerhalb der EU ist diese Reduktion im Gegensatz zur internationalen Gesetzgebung (Codex Alimentarius) jedoch nicht erlaubt. Für die Milchindustrie würde der Herstellungsprozess mit Penicillinrückständen in der Milch zu technologischen und finanziellen Nachteilen führen, da eine Fermentationsverzögerung und schlechte Textureigenschaften zu erwarten wären.

Der antibakterielle Effekt der Penicilline gewährleistet durch die Hemmung des Wachstums der Milchsäurekulturen in der Milch einen impliziten Verbraucherschutz, da ab bestimmten Rückstandskonzentrationen kein Joghurt mehr hergestellt werden kann.

Der Anteil der Penicilline, die an die Proteine der Milch binden, wurde in Untersuchungen mittels eines ELISA-Systems bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Penicilline um so stärker an Milchproteine binden je hydrophober ihre Eigenschaften sind. So wurden Werte von 20 % für Cloxacillin, 8 % für Penicillin G und 1,5 % für Ampicillin an gebundenem Penicillin bezogen auf die eingesetzte Menge bestimmt.

Als Abbauprodukte der Penicilline in Milch wurden über LC-MS/MS-Untersuchungen die entsprechenden Penill-, Penicillo- und Penillosäuren identifiziert, nicht aber die zu erwartende Penicillensäure.

## 5 Arbeitsvorschriften und Methoden

### 5.1 Screening-Tests

Milchproben mit „gewachsenen“ Rückständen

Vier an Mastitis erkrankte Kühe wurden durch die Bundesanstalt für Milchforschung (BAMF) in Kiel an zwei aufeinander folgenden Tagen mit je 1 g Cloxacillin unter Verwendung des Präparates Eumacid<sup>®</sup> (Upjohn, Erlangen) zur gleichen Melkzeit behandelt. Die Behandlung wurde nur am infizierten Euterviertel durchgeführt. Die für die Analyse verwendete Milch bestand aus dem Gemisch der Milch aller vier Euterviertel, die 2 x täglich als Morgen- und Abendmelk entnommen wurde. Ein Teil der Proben wurde durch Mitarbeiter der BAMF in Polyethylengefäße abgefüllt, das Gewicht von Flaschen und Milch protokolliert und schonend lyophilisiert. Die Proben wurden ein halbes Jahr bei 4 °C gelagert, wobei die Stabilität der Isoxazolylpenicilline bei der Lagerung gewährleistet war [Ibach, 1999]. Zur Bestimmung wurden die lyophilisierten Rohmilchproben mit der Wassermenge rekonstituiert, die zuvor durch die Lyophilisation entzogen worden war. Um eine gleichmäßige Suspendierung des Milchfettes in der Probe zu gewährleisten, wurde das Wasser zuvor auf 40 - 45 °C erwärmt und die Probe anschließend gut geschüttelt.

Testsysteme

BR-AS spezial<sup>®</sup> (DSM Food Specialities, Dortmund)

Delvotest SP<sup>®</sup> (DSM Food Specialities, Dortmund)

Penzym S<sup>®</sup> (Chr. Hansen, Nienburg)

Snap<sup>®</sup> test (IDEXX, Wörrstadt)

Die Screening-Tests wurden nach der jeweiligen Vorschrift des Herstellers durch Mitarbeiter der Bundesanstalt für Milchforschung durchgeführt.

Inaktivierung von Cloxacillin mit Penicillinase: Endkonzentration 50 U Penicillinase / ml Milch, (EG 3.5.2.6 B. Cereus (Sigma, Taufkirchen)

## 5.2 Flüssigchromatographie (HPLC)

### 5.2.1 Chemikalien und Reagenzlösungen

#### 5.2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Acetonitril (gradient grade, Roth, Karlsruhe)  
Kaliumhydrogenphosphat (VWR International, Darmstadt)  
Methanol (Rotisol<sup>®</sup>, Roth, Karlsruhe)  
Reinstwasser (Reinstwasseranlage Milli Q, Milipore, Eschborn)  
Milchsäure (Baker, Deventer, NL)  
EDTA Dinatriumsalz (Sigma, Taufkirchen)

Standards:

Oxacillin, Natriumsalz (Sigma, Taufkirchen)  
Cloxacillin, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)  
Dicloxacillin, Natriumsalz (Sigma, Taufkirchen)  
Nafcillin, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)  
Flucloxacillin, Natriumsalz (Fährhaus, Hamburg)  
Penicillin G, Kaliumsalz (Sigma, Taufkirchen)  
Ampicillin, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)  
Amoxicillin, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)  
Penicillin V, Kaliumsalz (Sigma, Taufkirchen)  
Methicillin, Natriumsalz (Sigma, Taufkirchen)

#### 5.2.1.2 Reagenzienlösungen und Puffer

Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung,  $c = 0,2 \text{ mol/l}$

27,2 g Kaliumdihydrogenphosphat wurden in einem 1l-Kolben eingewogen, in 600 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit o-Phosphorsäurelösung ( $c = 0,2 \text{ mol/l}$ ) auf  $3,0 \pm 0,1$  eingestellt. Der Kolben wurde mit Wasser bis auf 1 l aufgefüllt und der Puffer membranfiltriert (Celluloseacetat, Porendurchmesser  $0,45 \mu\text{m}$ , Schleicher & Schuell, Dassel).

Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung,  $c = 0,02 \text{ mol/l}$

100 Volumenteile der beschriebenen Lösung und 900 Volumenteile Wasser wurden gemischt.

Mobile Phase für die HPLC

65 Volumenteile Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung ( $c = 0,2 \text{ mol/l}$ ) wurden mit 35 Volumenteilen Acetonitril gemischt und mit Helium entgast.

Mobile Phase für die elektrochemische Detektion

(Chromatographie des Standardgemisches und der gespikten Milchprobe)

65 Volumenteile Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung ( $c = 0,2 \text{ mol/l}$ ) wurden mit 30 Volumenteilen Acetonitril und 5 Volumenteilen Methanol unter Zugabe von  $0,75 \text{ g/l}$  EDTA gemischt und mit Helium entgast.

Anreicherungslösung für den OSP-2

92,5 Volumenteile Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung ( $c = 0,02 \text{ mol/l}$ ) wurden mit 7,5 Volumenteilen Acetonitril gemischt und mit Helium entgast.

Stammlösungen

Von jeder der Standardsubstanzen wurde unter Berücksichtigung des Wassergehaltes (Herstellerangaben) soviel eingewogen, dass 1 ml Standardlösung 1 mg freie Säure enthält (Stammlösung,  $1 \text{ mg/ml}$ )

Dazu wurden folgende Mengen eingewogen:

Penicillin	Molekulargewicht freie Säure [g/mol]	Molekulargewicht Salz [g/mol]	Wassergehalt der Standard- substanz %	mg Einwaage Salz auf 10 ml ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ )
Oxacillin	401,4	Na 423,4	3,3	10,90
Cloxacillin	435,9	Na 457,9	3,4	10,86
Nafcillin	413,5	Na 436,5	3,7	10,95
Dicloxacillin	470,3	Na 492,3	3,9	10,88

### Standardlösungen für die Kalibriergerade

Aus den Stammlösungen wurden durch Verdünnen mit Wasser bei 20°C Standardlösungen folgender Konzentrationen täglich frisch hergestellt:

Standardlösung I, enthaltend 7,5 ng jeder Standardsubstanz/ ml

Standardlösung II, enthaltend 15,0 ng jeder Standardsubstanz/ ml

Standardlösung III, enthaltend 30,0 ng jeder Standardsubstanz/ ml

Standardlösung IV, enthaltend 60,0 ng jeder Standardsubstanz/ ml

### Standardlösungen zum Spiken

Aus den Stammlösungen wurden durch Verdünnen mit Wasser bei 20°C Standardlösungen folgender Konzentrationen täglich frisch hergestellt:

Spikelösung I, enthaltend 3,0 µg jeder Standardsubstanz/ ml

Spikelösung II, enthaltend 6,0 µg jeder Standardsubstanz/ ml

Spikelösung III, enthaltend 12,0 µg jeder Standardsubstanz/ ml

### Pipettierschema

Lösung	Konzentration	Herstellung
Stammlösung	1 mg/ml	Stammlösung
Lösung A	100 µg/ml	1,0 ml Stammlösung auf 10 ml verdünnt
Lösung B	2,0 µg/ml	200 µl von Lösung A auf 10 ml verdünnt
Spikelösung I	3,0 µg/ml	300 µl von Lösung A auf 10 ml verdünnt
Spikelösung II	6,0 µg/ml	600 µl von Lösung A auf 10 ml verdünnt
Spikelösung III	12,0 µg/ml	1200 µl von Lösung A auf 10 ml verdünnt
Standardlösung I	7,5 ng/ml	75 µl von Lösung B auf 20 ml verdünnt
Standardlösung II	15,0 ng/ml	150 µl von Lösung B auf 20 ml verdünnt
Standardlösung III	30,0 ng/ml	300 µl von Lösung B auf 20 ml verdünnt
Standardlösung IV	60,0 ng/ml	300 µl von Lösung B auf 10 ml verdünnt
Standardlösung V	100,0 ng/ml	500 µl von Lösung B auf 10 ml verdünnt

Standards für die Voltammogramme:

Die unter 5.2.1.1 angegebenen Analyten (Standards) wurden wie oben beschrieben in einer Konzentration von 2 µg/ml (Lösung B) hergestellt.

### 5.2.2 Geräte und Hilfsmittel

Glasgeräte, silyliert mit Dichlordimethylsilan in Toluol:

(10 ml/100 ml, RT, Standzeit: 30 Min., Spülvorgang: 1. Toluol 2. Methanol)

Enzym-Meßpipetten, diverse Größen

Meßkolben, 10 ml und 20 ml

Polypropylenzentrifugengläser, 25 ml, mit verschraubbarem Deckel (Roth, Karlsruhe)

Reagenzglasschüttler, Vortex Genie (Bender & Hobein, Zürich)

Ultraschallbad Sonorex (Bandelin, Berlin)

Kühlzentrifuge Centikon H 401B (Biotron, Hilden)

Ultrafiltrationsrührzelle, lösemittelbeständig (Millipore, Eschborn), mit regenerierter Cellulose-Membran (cut off 30.000 Da, Millipore, Eschborn)

OSP-2 Kartusche 4 x 4 mm gepackt mit LiChrospher 100 RP-18 ADS, 6 nm Porengröße, Partikelgröße 25 µm (VWR International, Darmstadt)

Wasserbad 3006 mit externem Temperaturregler (Köttermann, Flörsheim)

### 5.2.3 Chromatographische Ausrüstung (HPLC)

Autosampler Merck L-7250 (VWR International, Darmstadt)

LC Controller Merck L 5000 (VWR International, Darmstadt)

Liquid Chromatograph Merck 655A-11 (VWR International, Darmstadt)

Pump Merck L 6000 A (VWR International, Darmstadt)

Sample Preparator Merck OSP-2 mit Kartusche 4 x 4 mm gepackt mit LiChrospher 100 RP-18 ADS, 6 nm Porengröße, Partikelgröße 25 µm (VWR International, Darmstadt)

Säulenofen ERC-125 (ERC, Alteglofsheim)

Trennsäule: 250 x 4 mm LiChrospher 100 RP-18e, Korngröße 5 µm, mit 4x4 mm Vorsäule LiChrospher RP-18, 5 µm (VWR International, Darmstadt)

Photoreaktor Beam Boost mit Hg-Lampe (254nm) und Teflonkapillare 0,3 mm i.D., Länge 5 m (ict, Bad Homburg)

UV/VIS Detektor SPD-6AV (Shimadzu, Duisburg)

UV-Detektor Merck L-7400 (VWR International, Darmstadt)

Photodiodenarraydetektor SPD-M6A mit Class M10A Software (Shimadzu, Duisburg)

Elektrochemische Detektion:

Messzelle TRACE Flowcell (TRACE Biotech AG, Braunschweig)

Elektroden (alle TRACE Biotech AG, Braunschweig)

Platin 1-Kanal

Gold 1-Kanal

Kupfer 1-Kanal

Graphit 1-Kanal

Elektrochemischer Detektor Bioanalytical Systems BAS LC-4B (Axel Semrau, Sprockhövel)

(Die HPLC-Anlage wurde ohne Säule mittels Salpetersäurelösung (30%) 30 Min. passiviert.)

## 5.2.4 Durchführung der Analysen

Probenvorbereitung

20,0 +/- 0,1 g Milch (evtl. dotiert\*) wurden in ein Zentrifugenglas eingewogen und 1,25 ml Acetonitril zupipettiert. Die Probe wurde mit dem Vortex 20 s durchmischt und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Nach Abkühlen der Proben im Eisbad auf ca. 4 °C erfolgte die Entfettung durch Zentrifugation bei 4 °C, 25 min und 2.500 g. Mit einem Spatel wurde die Fettschicht entnommen, die entrahmte Milch kräftig per Hand geschüttelt.

Danach erfolgte die Ultrafiltration mit einer Rührzelle. Die ersten 2 ml Filtrat wurden verworfen, anschließend 3 ml in ein Probenröhrchen filtriert und danach das erhaltene Ultrafiltrat (2 ml) zur Analyse eingesetzt. Die restliche Milch wurde verworfen und die UF-Apparatur gründlich mit einer Tensidlösung für die nächste Ultrafiltration gereinigt.

\* Zum Dotieren wurde zu 20 g Probe soviel Spikelösung mittels Enzympipette zugesetzt, dass die Konzentration an Isoxazolympenicillin bspw. 15 µg/kg (0,5 x MRL), 30 µg/kg (MRL) und 60 µg/kg (2 x MRL) betrug. Die dotierte Milch wurde gut geschüttelt und die Probe 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Probenaufarbeitung.



Dotierschema:

Dotierung	Zugabe Spikelösung [ $\mu$ l] zu 20 g Probe	Menge absolut auf 20 g Probe
15 $\mu$ g/kg	100 $\mu$ l von Spikelösung I	300 ng
30 $\mu$ g/kg	100 $\mu$ l von Spikelösung II	600 ng
60 $\mu$ g/kg	100 $\mu$ l von Spikelösung III	1.200 ng

Hochleistungsflüssigchromatographie mit on-line gekoppelter Festphasenextraktion  
Festphasenextraktion am OSP-2

Injektionsvolumen: 2 ml (Ultrafiltrat oder Standardlösung)

0,0-2,9 min Waschen der OSP-2-Kartusche mit 6 ml eines Acetonitril-Wasser-Gemisches (50 + 50, v/v)

3,0-10,0 min Equilibrieren der OSP-2-Kartusche mit 12 ml Anreicherungslösung

10,0-25,0 min Probenaufgabe durch den Autosampler, Anreicherung auf der Kartusche und Waschen

25,1-27,5 min Elution der OSP-2-Kartusche mit 2 ml des Elutionsmittels

27,6-30,6 min Waschen der OSP-2-Kartusche mit 9 ml eines Acetonitril-Wasser-Gemisches (50 + 50, v/v)

30,7-33,7 min Waschen der OSP-2-Kartusche mit 12 ml Acetonitril

Das Eluat der OSP-2-Kartusche gelangt direkt auf die Trennsäule der HPLC. Dabei erfolgt die Überführung der Isoxazolylpenicilline im „back flush“ Verfahren.

HPLC-Bedingungen

Bei Verwendung der angegebenen Trennsäule und des angegebenen Elutionsmittels erwiesen sich folgende Parameter als geeignet:

Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min

Säulentemperatur: 35 °C

Nachsäulenderivatisierung: Bestrahlung für 60 Sekunden = 5 m Coil

UV-Detektion: 300 nm

Programm des UV-Detektors zur empfindlicheren Detektion von Nafcillin

Zeitprogramm für den UV-Detektor:

<u>Zeit</u>	<u>Wellenlänge</u>
0 - 13 min	300 nm
13 - 16 min	280 nm
16 - 25 min	300 nm

(Die angegebenen Zeiten können je nach HPLC-Bedingungen variieren)

Falls nicht anders angegeben, wurde für Dotierungsversuche H-Milch (Marke Milram, Nordmilch, Werk Isernhagen) verwendet.

### 5.2.5 Überprüfung der Methode zur Bestimmung von Cloxacillin in Joghurtproben

Wiederfindung: 69 %

Linearitätstest: Ein F-Test bestätigte die Linearität der Regressionsfunktionen der Bestimmungen, mit einer vorgegebenen Sicherheitsschwelle von 99 %.

Nachweisgrenze: 15 µg/kg

Verfahrensvariationskoeffizient: 16%

(Die Durchführung der Berechnung entspricht Punkt 2.3.2.)

## 5.3 Charm<sup>®</sup> II-Test

### 5.3.1 Chemikalien und Hilfsmittel

Charm<sup>®</sup> II β-Lactam MRL-Test, Sequential Assay (MCS Diagnostics, Swalmen, NL)

Charm<sup>®</sup> II Cloxacillin-Test, Competitive Assay (MCS Diagnostics, Swalmen, NL)

Reinstwasser (Reinstwasseranalge UHQ, Elga, Ransbach-Baumbach)

Szintillationslösung, Opti-Fluor (MCS Diagnostics, Swalmen, NL)

Triton X 100 (Sigma, Taufkirchen)

Citronensäure-Monohydrat (VWR International, Darmstadt)

### 5.3.2 Geräte

Charm® II 7600 Analyzer mit Zubehör (MCS Diagnostics, Swalmen, NL)

### 5.3.3 Durchführung der Analysen

Die Proben wurden dotiert wie unter 5.2.4 beschrieben.

Für Penicillin G ergeben sich entsprechende andere Verdünnungen (mit Wasser):

Pipettierschema

Lösung	Konzentration	Herstellung
Stammlösung	1 mg/ml	Stammlösung
Lösung A	100 µg/ml	1,0 ml Stammlösung auf 10 ml verdünnt
Lösung C	10 µg/ml	1,0 ml von Lösung A auf 10 ml verdünnt
Spikelösung IV	0,2 µg/ml	200 µl von Lösung C auf 10 ml verdünnt
Spikelösung V	0,4 µg/ml	400 µl von Lösung C auf 10 ml verdünnt
Spikelösung VI	0,8 µg/ml	800 µl von Lösung C auf 10 ml verdünnt

Dotierungsschema:

Dotierung	Zugabe Spikelösung [µl] zu 20 g Probe	Menge absolut auf 20 g Probe
1 µg/kg	100 µl Spikelösung IV	20 ng
2 µg/kg	100 µl Spikelösung V	40 ng
4 µg/kg	100 µl Spikelösung VI	80 ng

Charm® II β-Lactam, Sequential Assay:

Operator`s Manual for milk (Protocol ID-BMRL04.; 11/18/98)

Modifiziert nach der IDF "Kiel-Methode" zur semiquantitativen Bestimmung [IDF, 1991b; Suhren und Heeschen, 1987]. Bei der Modifikation wird Triton X 100 in Verbindung mit einer höheren g-Zahl bei der Zentrifugation genutzt.

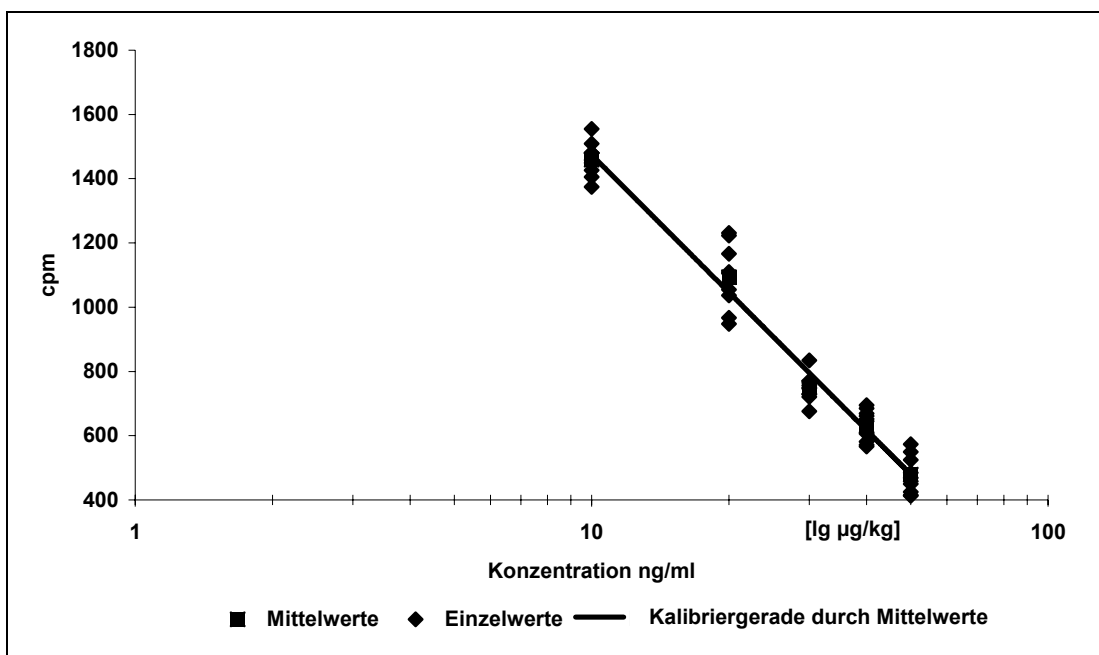
Charm® II Cloxacillin, Competitive Assay:

Operator`s Manual for milk (Protocol ID-CLXCOM6.; Dec2000)

### 5.3.4 Überprüfung der Charm® II-Methode zur Bestimmung von Cloxacillin und Penicillin G in Joghurtproben

Zur Bestimmung des linearen und damit semiquantitativ auswertbaren Bereiches des Charm® II Sequential Assay (Kiel-Methode) für Cloxacillin und Penicillin G wurden fermentierte Joghurtproben (Milram H-Milch 3,5 % Fett, Nordmilch, Isernhagen) mit Konzentrationen um den MRL-Wert bestimmt und die Linearität der Kalibriergerade (logarithmische Skalierung der Konzentration) aufgetragen. Die gleiche Vorgehensweise wurde für cloxacillinhaltige Milchproben beim Charm® II Competitive Assay gewählt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, welche jeweils dreifach ausgewertet wurden (jeweils 9 Messwerte pro Konzentration).

#### 5.3.4.1 Cloxacillin



**Abbildung 43: Kalibriergerade für Joghurt mit Cloxacillin für den Charm® II Sequential Assay nach der Kiel-Methode**

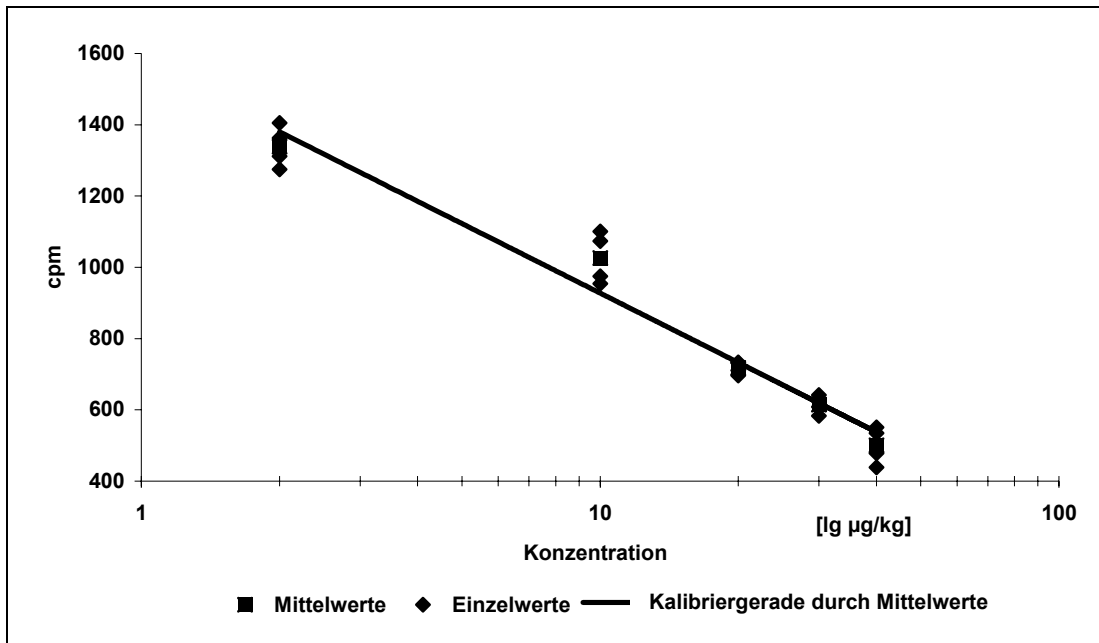
Qualitätskenndaten:

Verfahrensvariationskoeffizient: 3,4 %

Korrelationskoeffizient: 0,9962

Kalibrierpunkte: 45

Nachweisgrenze: 8 µg/kg (empirisch, 80 %\*)



**Abbildung 44: Kalibriergerade für Milch mit Cloxacillin für den Charm® II Competitive Assay nach der Kiel-Methode**

Qualitätskenndaten:

Verfahrensvariationskoeffizient: 6 %

Korrelationskoeffizient: 0,9820

Kalibrierpunkte: 30

Nachweisgrenze: 2 µg/kg (empirisch, 80 %\*)

#### 5.3.4.1.1 Quantifizierung von Cloxacillin mittels kompetitivem Assay vor und nach Erhitzung für 15 Minuten auf 90 °C

Verwendete Geräte: Wasserbad: Köttermann 3006 + Temperaturregler  
 Verwendete Milch: H-Milch 3,5% Fett, Milram

Durchführung: 20g dotierte Milch (Dotierung, Chemikalien und Lösungen nach Punkt 5.2) wurden im Greiner Tube (PP) für 15 Minuten in ein 90 +/- 2°C Wasserbad gehängt, unter einem Wasserhahn schnell abgekühlt und vermessen.  
 Konzentrationen: 2, 10, 20, 30, 40 µg/kg Cloxacillin  
 Charm – Test nach Vorschrift (Punkt 5.3.3)

Abbildung 45 zeigt die Resultate für die Bestimmungen vor und nach der Erhitzung. Nach den HPLC-Resultaten wird Cloxacillin teilweise abgebaut. Dies ist hier nicht erkennbar. Der Competitive Assay für Cloxacillin bestimmt trotzdem die gesamte dotierte Menge. Er kann also nicht spezifisch auf den intakten  $\beta$ -Lactamring sein.

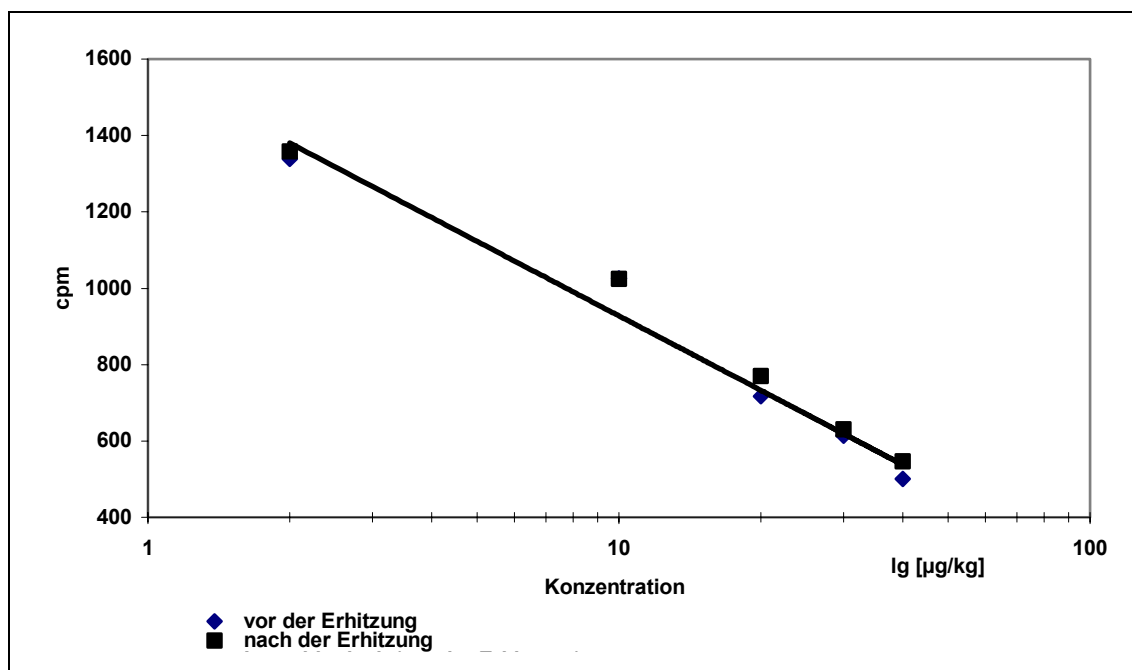


Abbildung 45: Quantifizierung von Cloxacillin mittels kompetitivem Assay vor und nach Erhitzung für 15 Minuten auf 90 °C

#### 5.3.4.2 Penicillin G

Qualitätskennndaten:

Verfahrensvariationskoeffizient: 16,3 %

Korrelationskoeffizient: 0,9831

Kalibrierpunkte: 45

Nachweisgrenze: 1 µg/kg (empirisch, 80 %\*)

(\* Empirische Nachweisgrenze ermittelt über die relative Extinktion von 80 %.)

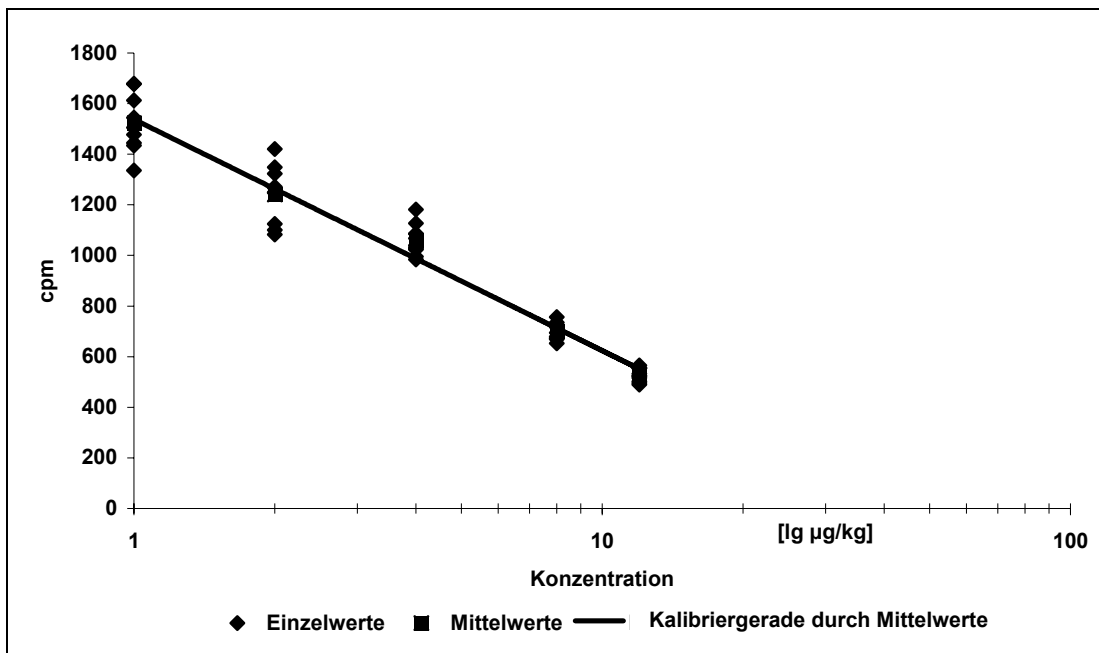


Abbildung 46: Kalibriergerade für Joghurt mit Penicillin G für den Charm® II Sequential Assay nach der Kiel-Methode

## 5.4 Joghurtfermentation

### Joghurtkulturen

Thermophile gefriergetrocknete Milchsäurekultur YC-180 (Chr. Hansen, Nienburg):

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Konzentration: 500 u / 2.500 l Vollmilch

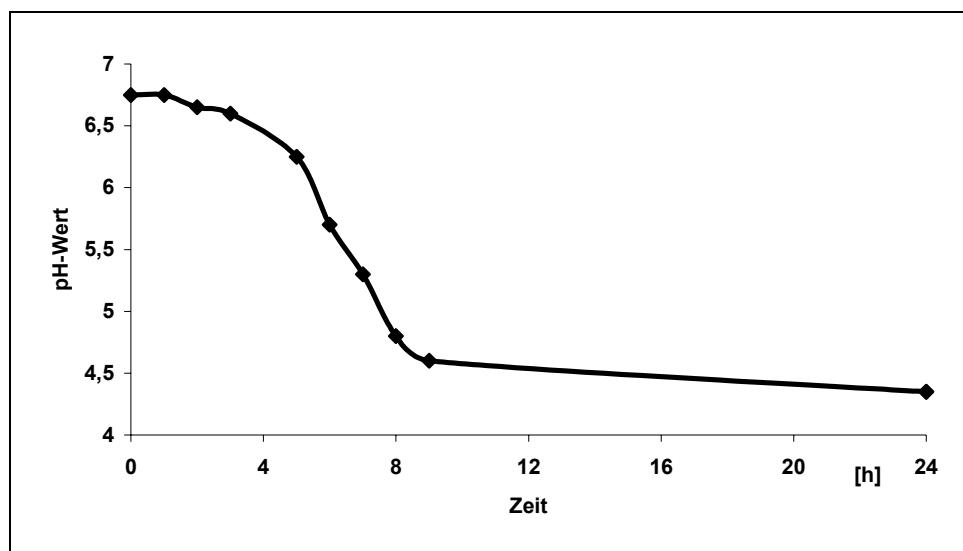
### Joghurtherstellung

Der Joghurt wurde im Labormaßstab nach Vorschrift angesetzt [Chr. Hansen GmbH, 2000]. Hierbei wurden 0,456 g (Entspricht der doppelten Menge der Vorschrift um den gegenüber den industriellen Bedingungen höheren Luftpfeintrag und den damit verzögerten Fermentationsverlauf auszugleichen.) unter schwachem Rühren in 500 ml H-Milch (3,5 % Fett, Milram Milch, Nordmilch, Isernhagen) zugegeben. Es war darauf zu achten, nicht zuviel Luft miteinzurühren. Nach fünfzehnminütigem Rühren wurde die

Milch in PP-Tubes (Roth, Karlsruhe) a 20 g abgefüllt und im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 43 °C für 9 Stunden fermentiert. Die fermentierte Milch wurde zur Nachsäuerung über Nacht bei 4-6 °C gehalten.

Der Fermentationverlauf wurde über den pH-Wert der Joghurts in regelmäßigen Abständen nach einer 1:1 Verdünnung mit Reinstwasser am pH-Meter (Digital pH-Meter 646, Knick, Berlin) kontrolliert.

Abbildung 47 zeigt einen typischen pH-Wert-Verlauf der Fermentation. Nach einem langsamen Beginn der Säuerung folgt ein schneller Abfall des pH-Wertes, der sich zum Ende der Fermentation hin wieder verlangsamt. Dieser Verlauf der Fermentation ist durch die typische Wachstumskurve der Mikroorganismen bedingt [Riemelt et al., 1996].



**Abbildung 47: Säuerungsverlauf der Starterkultur YC-180 (Chr. Hansen) unter den gewählten Laborbedingungen**

Die Milch- bzw. Joghurtproben wurden wie unter 5.2.1 und 5.3.3 beschrieben dotiert.



---

## 5.5 LC-MS/MS System

### 5.5.1 Geräte

#### HPLC

Binäre Pumpe, Vacuum Entgaser, Autosampler: 1100 Series (Agilent, Waldbronn)

#### Massenspektrometer

TSQ 7000 Triple Quadrupolgerät (Thermo Finnigan, Egelsbach)

#### HPLC-Säule

Polar RP 250 x 2 mm, 4 µm Säule (Phenomenex, Aschaffenburg)

#### Mobile Phase

Eluent A: 0,005 % wässrige Ameisensäure

(Ameisensäure: VWR International, Darmstadt)

Eluent B: Methanol (VWR International, Darmstadt)

#### Gradient

0 - 3 Minuten: 100 % A

3 - 22 Minuten: 10 % A – 90 % B

22 - 35 Minuten: 10 % A – 90 % B

Reequilibrierungszeit: 10 Minuten 100 % A

Fluss (HPLC): 0,2 ml/min

Kapillartemperatur: 330 °C

Sheatgasdruck: 70 psi (483 kPa)

Auxiliarygas: Wurde nicht verwendet.

Interface: Elektrosprayionisation (ESI)

MS-Modus: Multiple reaction monitoring (MRM), negativ-Modus

(Vergleichende Messungen im positiv-Modus ergaben nur Änderungen der bestimmten Flächen, nicht in der Anzahl der detektierten Rückstände.)

Auswertungssoftware: LC-Quan Software (Thermo Finnigan, Egelsbach)

Injektionsmenge: 50 µl

### 5.5.2 Durchführung der Analysen

Für alle Analysen wurde Reinstwasser (MilliQ-Reinstwasseranlage, Millipore, Eschborn) verwendet.

#### Wässrige Proben

Cloxacillin bzw. Penicillin G (1 µg/ml) wurden mit Ameisensäure (10 %) (VWR International, Darmstadt) mit einem pH-Meter auf pH 2,3 eingestellt.

Cloxacillin bzw. Penicillin G (1 µg/ml) wurden mit Milchsäure (10 %) (Baker, Deventer, NL) mit einem pH-Meter auf pH 4,0 eingestellt.

Vergleiche: Reinstwasser, Wasser mit Ameisensäure pH 2,3, Wasser mit Milchsäure pH 4, wässrige Lösungen von Penicillin G bzw. Cloxacillin

#### Milchproben

20 g H-Milch wurden mit 20 mg Cloxacillin bzw. Penicillin G (siehe 5.2.1.1) am Vortex gemischt, mit einem pH-Meter auf pH 4 eingestellt, 3 Tage bei 4 - 6 °C gelagert und bis zur Aufarbeitung bei -18 °C tiefgefroren (max. 1 Woche).

Vergleiche: Milch ohne Dotierung, Milch mit Dotierung ohne pH-Einstellung

#### Joghurtproben

Zur Herstellung der Proben siehe 5.4. Die Proben wurden 3 Tage bei 4 - 6 °C gelagert und bis zur Aufarbeitung bei -18 °C tiefgefroren (max. 1 Woche).

Vergleiche: Joghurt ohne Dotierung, Joghurt dotiert mit Penicillin G bzw. Cloxacillin nach der Fermentation; Milchproben mit Penicillin G bzw. Cloxacillin aufgearbeitet wie Joghurt

#### Aufarbeitung der Milchproben zur LC-MS/MS Messung

- Auftauen der Probe im Wasserbad bei 40 °C
- Verdünnung der Probe mit Reinstwasser, 100 µl Probe auf 100 ml Reinstwasser
- 5 ml zentrifugieren bei 2.500 g
- Abnehmen von 1 ml Probe
- Filtration durch Filter Chromafil PET-20/15 MS, 20 µm Porenweite (Macherey-Nagel, Düren)

## Aufarbeitung der Joghurtproben zur LC-MS/MS Messung

## Wässrige Extraktion

- Auftauen der Probe im Wasserbad bei 40 °C
- 20 g Joghurt verdünnt mit 20 g Reinstwasser
- Durchmischen mittels Vortex
- Zentrifugieren bei 2.500 g
- Überstand (30ml von den 40 ml) über SPE-Kartusche Oasis HLB 3 cc, 60 mg (Waters, Eschborn), nachwaschen mit 2 x 2 ml Wasser, aktiviert mit 1. Methanol 2. Wasser
- Eluieren mit Acetonitril (2 ml)
- Zugabe von 1 ml 25 µM Phosphatpuffer pH 7
- Acetonitril mittels Stickstoffstrom einengen
- Filtration durch Filter Chromafil PET-20/15 MS, 20 µm Porenweite (Macherey-Nagel, Düren)

## Acetonitril-Extraktion

- 20 g Joghurt verdünnt mit 20 g Acetonitril
- Durchmischen mittels Vortex
- Zentrifugieren bei 2500 g
- Abdekantieren des kompletten Überstands (Acetonitril/Wasser) in einen Spitzkolben
- Zugabe von 5 ml gesättigter Natriumchloridlösung (vermindertes Schäumen / verbesserte Phasentrennung)
- Filtrieren der Lösung über eine Kartusche mit porösem Polyethylen, 20 µm, 1/16“ (ict, Bad Homburg)
- Filtrierte Lösung über SPE-Kartusche Waters Oasis HLB 3 cc 60 mg (Waters, Eschborn), nachwaschen mit 2 x 2 ml Wasser, aktiviert mit 1. Methanol 2. Wasser
- Eluieren mit Acetonitril (2 ml)
- Zugabe von 1 ml 25 µM Phosphatpuffer pH 7
- Acetonitril mittels Stickstoffstrom einengen
- Filtration durch Filter Chromafil PET-20/15 MS, 20µm Poren (Macherey Nagel, Düren)

## 5.6 ELISA-Technik

### 5.6.1 Allgemeine Chemikalien und Geräte

Penicillin G, Kaliumsalz (Sigma, Taufkirchen)  
Ampicillin, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)  
Cloxacillin, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)  
Reinstwasser (Reinstwasseranlage MilliQ, Milipore, Eschborn)  
Methanol (Rotisolv<sup>®</sup>, Roth, Karlsruhe)  
Aceton (Rotisolv<sup>®</sup>, Roth, Karlsruhe)  
Glucoseoxidase (*Aspergillus niger*) (Boehringer, Ingelheim)  
Antipenicillin AK, Polyklonales Serum / Rb/Ig Fraction (BioTrend, Köln)  
Peroxidase-markierte Antikaninchen IgG – Antikörper monoclonal (Maus) (Sigma, Taufkirchen)  
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma, Taufkirchen)  
Citronensäure (VWR International, Darmstadt)  
Natriumcarbonat (VWR International, Darmstadt)  
Natriumhydrogencarbonat (VWR International, Darmstadt)  
Kaliumdihydrogenphosphat (VWR International, Darmstadt)  
Natriumchlorid (VWR International, Darmstadt)  
Dinatriumhydrogenphosphat (VWR International, Darmstadt)  
Schwefelsäure, konz. (VWR International, Darmstadt)  
Casein, Natriumsalz (Roth, Karlsruhe)  
Tween 20 (Sigma, Taufkirchen)  
Wasserstoffperoxid 30 % (Fluka, Taufkirchen)  
Carboxypeptidase (aus Penzym Test, Chr. Hansen, Nienburg)  
Bocillin (Sigma, Taufkirchen)  
Acetonitril (gradient grade, Roth, Karlsruhe)

Variable Kolbenhubpipetten: 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)  
Variable 12-Kanalpipette: 25-250 µl (Eppendorf, Hamburg)  
Mikrotiterplatten (Immunoplate Maxi Sorp, Nunc, Wiesbaden)  
Mikrotiterplatten-Lesegerät (Modell 450, BioRad, München)  
Dialyseschlauch, MWCO: 12-14 kD (Medicell International, USA)

## 5.6.2 Reagenzienlösungen und Puffer

Beschichtung:

Glucoseoxidase-Penicillin G-Konjugat

Herstellung : [Singh, 1985] 10 mg Glucoseoxidase  
20 mg Penicillin G Kaliumsalz  
in 2 ml PBS-Puffer mit 0,15 ml KOH 1 mol/l  
Dialyse über Nacht bei 4 °C

Ergebnis der Proteinbestimmung (DC Protein Assay, BioRad, München):  
0,6 mg Protein / ml

Kompetitor:

Penicilloylsäure:(1:1.000)

Herstellung: 10 mg Penicillin G Kaliumsalz bzw. Ampicillin in 9,8 ml Methanol  
mit 0,2 ml KOH 1 mol/l, 24 h bei Raumtemperatur, Lagerung bei  
-18°C, Verdünnung wie angegeben (1:1.000)

Primärer Antikörper: (1:2.500)

Antipenicillin AK, (Polyklonales Serum / Rb/Ig Fraction)

Sekundärer Antikörper: (1:3.000)

Peroxidase-markiertes Antikanninchen IgG (1:3.000)

(Anti Rabbit HRP 4)

Substratlösung für Meerrettichperoxidase:

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citratpuffer

(20 ml 0,21 mol Citratpuffer mit 1 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung)

Beschichtungspuffer:

Bicarbonatpuffer pH 9,4-9,8

(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,59 g und NaHCO<sub>3</sub> 2,93 g auf 1 l Reinstwasser)

PBS-Puffer:

0,01 mol/l Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,2

(NaCl 6,79 g und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,47 g und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,43 g auf 1 l Reinstwasser)

Blockpuffer:

2 % Casein / PBS

(Casein 4 g in 200 ml PBS-Puffer pH 7,2)

Verdünnungspuffer:

1 % Casein / PBS

(Casein 2 g in 200 ml PBS-Puffer pH 7,2)

Waschlösung:

NaCl / Tween 20

(8,55 g NaCl mit 0,25 ml Tween 20 in 1 l Reinstwasser)

Citratpuffer:

0,21 mol/l Citratpuffer pH 3,9-4,0 mit 3,15 mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(8,81 g Citronensäuremonohydrat in 40 ml 1 mol/l KOH mit 65 µl Wasserstoffperoxid in 160 ml Reinstwasser)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung:

(50,4 mg Tetramethylbenzidin in 1 ml Aceton und 9 ml Methanol)

Stopplösung:

1 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 5.6.3 Durchführung der Analysen

Milchproben

20 g H-Milch wurden mit 20 mg Cloxacillin, Ampicillin bzw. Penicillin G 2 h mittels Schüttelmaschine bei 100 min<sup>-1</sup> geschüttelt und 3 Tage bei 4 - 6 °C gelagert.

### Caseinproben

20 g Caseinlösung (2,6 %, 0,53 g Casein / 20 ml Wasser) wurden mit 20 mg Cloxacillin, Ampicillin bzw. Penicillin G 2 h mittels Schüttelmaschine bei  $100 \text{ min}^{-1}$  geschüttelt und 3 Tage bei  $4 - 6 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert

### Dialyse

20 ml Casein- bzw. Milch-Probe wurden als Doppelbestimmung im Dialyseschlauch gegen 5.000 ml PBS-Puffer bei  $4 - 6 \text{ }^{\circ}\text{C}$  über 5 Tage bei drei Pufferwechseln (Akzeptorlösung) täglich dialysiert.

Für die Donorlösung wurde mittels Penzym Test (Chr. Hansen, Nienburg) die Abwesenheit von intaktem  $\beta$ -Lactam bestätigt.

Die Donorlösung wurde über eine zweite Methode auf intaktes Penicillin untersucht. Hierbei wird zur Penicillinlösung zunächst Carboxypeptidase und im zweiten Schritt, zur Fluoreszenzmarkierung Bocillin gegeben. Intaktes Penicillin reagiert nun mit der Carboxypeptidase, die im zweiten Schritt zur Reaktion mit Bocillin nicht mehr zur Verfügung steht. Das Signal wird kleiner je höher die Konzentration an Penicillin in der Probe. Nach HPLC-Trennung zeigte eine identische Fläche von Puffer-Vergleich und Probe für das fluoreszenzmarkierte Molekül das nicht vorhanden sein von intaktem Penicillin an [Keppler und Cacciatore, 2002].

### Durchführung:

- HPLC Anlage LaCrom, Merck-Hitachi mit Fluoreszenzdetektor (VWR International, Darmstadt) und Gelfiltrationssäule Zorbax GF-250 (250 mm,  $4 \mu\text{m}$ ,  $150 \text{ \AA}$ , Agilent, Waldbronn)
- Eluent: 15 % Acetonitril, 75 % 200 mmol Phosphatpuffer pH 6,6
- Probenaufarbeitung: 20  $\mu\text{l}$  Milch + 20  $\mu\text{l}$  Carboxypeptidase, 1:5 verdünnt, 10 Min bei  $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , + 20  $\mu\text{l}$  Bocillin (100ng/ml) zur Fluoreszenzmarkierung, 5 Min bei  $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , + 60  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer
- Injektion: 50  $\mu\text{l}$

## Ergebnis

Die Flächen zeigten keine Bindung von Penicillin G oder Ampicillin an die Carboxypeptidase, da diese komplett mit dem Bocillin reagiert hatte. Die Flächenunterschiede von reinem PBS-Puffer zu dialysierten Proben zeigten keine signifikanten Unterschiede. Damit war kein intakter  $\beta$ -Lactam-Ring in der Probe mehr nachweisbar.

## 5.6.4 Durchführung des indirekten kompetitiven ELISA

### 5.6.4.1 Zweidimensionaler ELISA

Zu Beginn der immunchemischen Arbeit wurden über einen zweidimensionalen ELISA die notwendigen Arbeitsverdünnungen der Immunreagenzien ermittelt (working dilutions). Zu diesem Zweck wurden verschiedene Kombinationen von Serenverdünnungen (1:1 - 1:244) und verschiedene Mengen an Beschichtungsantigen (1:1 - 1:27) auf einer Mikrotiterplatte eingesetzt. Anhand der resultierenden Extinktionen konnten die für die Testdurchführung optimalen Verdünnungskombinationen abgelesen werden.

### 5.6.4.2 Aufnahme von Standardkurven

Für die optimierten Testsysteme wurden für die quantitative Auswertung Standardkurven aufgenommen. Die Lösungen für die Kalibrierung wurden ausgehend von einer Stammlösung durch serielle 1:3 (1 Volumenteil Kompetitor + 2 Volumenteile PBS-Puffer) Verdünnung hergestellt. Diese Lösungen wurden wie unter Punkt 5.6.4.3 beschrieben eingesetzt.

Den aufgenommenen Standardkurven lagen 5 Konzentrationsstufen des Kompetitors zugrunde, welche in einer Dreifachbestimmung eingesetzt wurden. Ausgewertet wurde im Bereich unterhalb 80 % der erzielten relativen Extinktion ( $E/E_0$ ). Die maximale Konzentration wurde über die reine PBS-Pufferlösung als  $E_{\max}$  bestimmt. Bei der Aufgabe der Proben wurden die Randkavitäten der Mikrotiterplatten für die Bestimmung nicht genutzt, da in den Randbereichen häufig größere Abweichungen der Extinktionen auftreten.



### 5.6.4.3 Durchführung des ELISA-Tests

- Beschichten mit Konjugat in Beschichtungspuffer (Verd. 1:1) V=100 µl, Inkubieren über Nacht bei 4 °C
- Entleeren, 1x mit PBS-Puffer waschen, ausschlagen
- Nachbeschichten mit Blockpuffer V= 200 µl, Inkubieren 30 min bei RT
- Entleeren, 1x mit PBS-Puffer waschen, ausschlagen
- Zugabe Probe / Kompetitor bzw. PBS-Puffer V= 50 µl
- Zugabe primärer AK (Verd. 1: 2.500) in Verdünnungspuffer V= 50 µl, Inkubieren 2 h bei RT
- Entleeren, 1x mit PBS-Puffer waschen, ausschlagen
- Zugabe sekundärer AK (Verd. 1:3.000) in Verdünnungspuffer V= 100 µl, Inkubieren 45 min bei RT
- Entleeren, 3x waschen mit Waschlösung, ausschlagen
- Zugabe Substratlösung V= 100 µl; Inkubieren 20 min bei RT
- Zugabe Stopplösung V= 100 µl; Inkubieren 10-20 min bei RT
- Extinktion messen bei 450 nm

Beispiel für eine ELISA-Plattenbelegung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	E <sub>max</sub>	Pen G	in Milch	1:200	
C		1:3			1:3				Pen G	in Milch	1:200	
D		1:9	Kompetitor		1:9	Kompetitor			Pen G	Casein	1:200	
E		1:27	Penicillin G		1:27	Penicilloylsäure			Pen G	Casein	1:200	
F		1:81			1:81				Milch	Vergl.	1.200	
G		1:244			1:244				Casein	Vergl.	1:200	
H												

Die Belegung galt für Ampicillin / Ampicilloylderivat und Cloxacillin / Cloxacilloylderivat mit den jeweiligen Verdünnungen der Proben entsprechend.

Je Einzelbestimmung der Proben (je zwei auf einer Platte) wurden drei Kavitäten einer Mikrotiterplatte belegt.

Verdünnung der Probenlösungen (Stammlösung: 1mg/ml)

Penicillin G 1:200

Ampicillin 1:200

Cloxacillin 1:100

Empirische Nachweisgrenze ermittelt über die relative Extinktion von 80 %  
(Mittelwerte aus je drei Mikrotiterplattenauswertungen)

	Milch	Caseinlösung
Penicillin G	9 µg/kg	15 µg/kg
Ampicillin	10 µg/kg	15 µg/kg
Cloxacillin	21 µg/kg	18 µg/kg

## 5.7 Verwendete Software

Datenaufnahme

Apex<sup>®</sup> Version 3.10b (Apex, Braunschweig)

Class m10 Software<sup>®</sup> (Shimadzu, Duisburg)

LC-Quan (Thermo Finnigan, Egelsbach)

Statistik

Kalibo<sup>®</sup> Version 2.0a (Dr. J. Vogelgesang, Avenue de Traquets 152, B-1150 Brüssel)

Grafik

Micrografx<sup>®</sup>Designer (Corel, Unterschleissheim)

Micrografx<sup>®</sup>FlowCharter (Corel, Unterschleissheim)

Micrografx<sup>®</sup>PicturePublisher (Corel, Unterschleissheim)

ISIS Draw<sup>®</sup> Version 2.4 (MDL Information System, San Leandro, USA)

Soft Shell ChemWindow<sup>®</sup> Version 2.01 (Bio-Rad, Philadelphia, USA)

Textverarbeitung und Datenauswertung

Microsoft Word® Office Version 2000 (Microsoft, Unterschleissheim)

Microsoft Excel® Office Version 2000 (Microsoft, Unterschleissheim)

## 6 Literaturverzeichnis

- Abdel-Bae N, Harris ND, Rill RL (1987) Purification and Properties of an Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus bulgaricus*. J Food Sci, 52 (2):411-415.
- Abjean JP, Lahogue V (1997) Planar Chromatography for Quantitative Determination of Ampicillin Residues in Milk and Muscle. J AOAC Int, 80 (6):1171-1176.
- Aerts MML, Hogenboom AC, Brinkmann UAT (1995) Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. J Chromatogr B, 667:1-40.
- Ahrer W, Scherwenk E, Buchberger W (2001) Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. J Chromatogr A, 910 (1):69-78.
- aid e.V. (2002) aid-Presseinfo Nr. 17/02 vom 25. April 2002. aid e.V., Bonn.
- Aktypis A, Kalantzopoulos G, Huis in't Veld JH, ten Brink B (1998) Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. J Appl Microbiol , 84 (4):568-576.
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, L 01.01/02, Bestimmung von Benzylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin, Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin in Milch (Kapillargaschromatographie).
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, L 01.00/11, Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch, Agardiffusionsverfahren mit *Bacillus stearothermophilus* (Brilliantsschwarz-Reduktionstest).

- 
- Anderson KL, Moats WA, Rushing JE, O`Caroll JM (1998) Detection of milk antibiotic residues by use of screening tests and liquid chromatography after intramammary administration of amoxicillin or penicillin G in cows with clinical mastitis. *Am J Vet Res*, 59 (9):1096-1100.
- Ang CYW, Luo W (1997) Rapid Determination of Ampicillin in Bovine Milk by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J AOAC Int*, 80 (1):25-30.
- Ang CYW, Liu FF, Lay JO, Luo W, McKim K, Gehring T, Lochmann R (2000) Liquid chromatographic analysis of incurred Amoxicillin residues in catfish muscel following oral administration of the drug. *J Agric Food Chem*, 48:1673-1677.
- Ang CYW, Luo W, Hansen E, Freeman JP, Thompson HC (1996) Determination of Amoxicillin in Catfish and Salmon Tissues by Liquid Chromatography with Precolumn Formaldehyde Derivatization. *J AOAC Int*, 79 (2):389-395.
- Anonymous (1994) For your information: SNAP-Test. *J AOAC Int*, 77 (5):153A-155A.
- Arts CJM, Geijp EML, Stark J, Witkamp RF (2000) The Premi-Test, a broad-spectrum screening test for the detection of antimicrobial compounds in meat, organs and urine. In: Van Ginkel LA, Ruiter A [Hrsg.] *Residues of veterinary drugs in food*, Bd. 1, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, S. 186-192.
- Audicana M, Bernaola G, Urrutia I, Echechipia S, Gastaminza G, Munoz D, Fernandez E, Fernandez de Corres L (1994) Allergic reactions to betalactams: studies in a group of patients allergic to penicillin and evaluation of cross-reactivity with cephalosporin. *Allergy*, 49 (2):108-113.
- Auterhoff H, Knabe J, Höltje HD (1994) *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*. 13. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 742-760.
- Baggot JD (1977) *Principles of drug disposition in domestic animals: The Basis of Veterinary Clinical Pharmacology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, S. 65-66.

- Balasubramanyam BV, Varadaraj MC (1998) Cultural conditions for the production of bacteriocin by a native isolate of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CFR 2028 in milk medium. J Appl Microbiol, 84 (1):97.
- Bally RW, Gribnau TC (1989) Some aspects of the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as hydrogen donor in a horseradish peroxidase assay. J Clin Chem Clin Biochem, 27 (10):791-796.
- Barefoot SF, Nettles CG (1993) Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. J Dairy Sci, 76 (8):2366-2379.
- Batchelor FR, Dewdney JM, Feinberg JG, Weston RD (1967) A penicilloylated protein impurity as a source of allergy to benzylpenicillin and 6-aminopenicillanic acid. Lancet, 1:1175-1177.
- Batchelor FR, Dewdney JM, Gazzard D (1965) Penicillin allergy: the formation of the penicilloyl determinant. Nature, 206 (24):362-364.
- Baustian H (1981) Technologie zu Herstellung von Joghurt und Sauermilcherzeugnissen. Deutsche Milchwirtschaft, 14:487-493.
- Becker M, Stier S, Petz M (2001) Multiresidue method for penicillins and cephalosporins in bovine muscle and kidney by LC/MS-MS with Electrospray ionisation. In: Pfannhauser W, Fenwick GR, Khokhar S [Hrsg.] Biologically-active Phytochemicals in Food, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, S. 267-270.
- Becker W (1966) Zerstörung von Antibiotika in der Milch durch Kurzzeiterhitzung. Milchwiss, 31 (3):155-157.
- Beier RC, Stanker LH (2000) Application of immunoassay for detection of antibiotics in food and feed: A review. Recent Res Devel Agricultural Food Chem, 4:59-93.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2001) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin, S. 510-514.

- 
- Bennett P (1996) Drugs and human lactation. 3. Aufl., Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo.
- Bishop JR, Senyk GF, Duncan SE (1992) Detection of Antibiotic / Drug Residues in Milk and Dairy Products. In: Marshall RT [Hrsg.] Standard Methods for the Examination of Dairy Products, Kap. 12, American Public Health Association, Washington DC, S. 347-394.
- Bisping W (1962) Die Kehrseite der Antibiotikatherapie aus der Sicht der Veterinärmedizin. Deutsche tierärztliche Wochenschrift, 18:495-498.
- Blanchflower WJ, Hewitt SA, Kennedy DG (1994) Confirmatory Assay for the Simultaneous Detection of Five Penicillins in Muscle, Kidney and Milk Using Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry. Analyst, 119:2595-2601.
- Blumberg PM, Strominger JL (1971) Inactivation of D-Alanine Carboxypeptidase by Penicillins and Cephalosporins is not lethal in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci, 68(11):2814-2817.
- Boatto G, Cerri R, Pau A, Palomba M, Pintore G, Denti MG (1998) Monitoring of benzylpenicillin in bovine milk by HPLC. J Pharm Biomed Anal, 17:733-738.
- Bogovic-Matijasic B, Rogelj I, Nes IF, Holo H (1998) Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Appl Microbiol Biotechnol, 49 (5):606-612.
- Boison JO (2001) Drug residues in foods, diagnostics and test kits. J AOAC Int, 84 (1):190-191.
- Boison JO (1995) Chemical Analysis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. In: Oka H, Nakazawa H, Harada K, MacNeil JD [Hrsg.] Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture, Kap. 8, AOAC International, Arlington, S. 235-306.
- Boison JO (1992) Chromatographic methods of analysis for penicillins in food-animal tissues and their significance in regulatory programs for residue reduction and avoidance. J Chromatogr, 624:171-194.

- Boison JO, Keng LJY (1998) Improvement in the multiresidue liquid chromatographic analysis of residues of mono- and dibasic penicillins in bovine muscle tissues. *J AOAC Int*, 81 (6):1267-1272.
- Boison JO, MacNeil JD (1995) New Test Kit Technology. In: Oka H, Nakazawa H, Harada K, MacNeil JD [Hrsg.] *Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture*, Kap. 4, AOAC International, Arlington, S. 77-119.
- Boison JO, Salisbury CDC, Chan W, MacNeil JD (1991) Determination of Penicillin G Residues in Edible Animal Tissues by Liquid Chromatography. *J Assoc Off Anal Chem*, 74 (3):497-501.
- Boonk WJ, van Ketel WG (1981) Skin testing in chronic urticaria. *Dermatologica*, 163 (2):151-159.
- Boonk WJ, van Ketel WG (1982) The role of penicillin in the pathogenesis of chronic urticaria. *Brit J Dermatol*, 106:183-190.
- Bossuyt R, van Renterghem R, Waes G (1976) Identification of antibiotic residues in milk by thin-layer chromatography. *J Chromatogr*, 124:37-42.
- Botsoglou NA, Fletouris DJ (2001) Drug residues in food – pharmacology, food safety, and analysis. Marcel Dekker, New York, Basel, S. 909-929.
- Bozoglu F, Chirica LF, Yaman O, Gürakan C (1996) Induction of penicillin resistance in *S. thermophilus*. In: Bozoglu TF, Ray B [Hrsg.] *Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications*, Kap. 15, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 348-355.
- Brady MS, Katz SE (1988) Antibiotic / Antimicrobial Residues in Milk. *J Food Protect*, 51 (1):8-11.
- Brandšteterová E, Kubalec P, Bovanova L (2000) HPLC Determination of Antimicrobial Residues in Edible Animal Products. In: Nolle LML [Hrsg.] *Food Analysis by HPLC*, 2. Aufl., Kap. 15, Marcel Dekker, New York, Basel, S. 632-642.



- 
- Briggs GG, Freeman RK, Yaffe SJ (2002) *Drugs in pregnancy and lactation*. 6. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York.
- Brindani F, Ossiprandi M, Enrica F (1994) Antibiotic resistance in *Streptococcus salivarius* var. *thermophilus* strains isolated from commercial yoghurts: evaluation in different media (No.3996). *Dairy Science Abstracts*, 56 (7):488.
- Brückler J (1994) Euterentzündungen. In: Blobel H, Schließer T [Hrsg.] *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*, Bd. 2, Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 133-171.
- Bruno F, Curini R, di Corcia A, Nazzari M, Samperi R (2001) Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of beta-lactam antibiotics in bovine milk. *J Agric Food Chem*, 49 (7):3463-3470.
- Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (2002) *Rückstandskontrollplan 2000*. BgVV, Berlin.
- Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (1995) *Nachweismethoden für Rückstände von Tierarzneimitteln: Vorläufige Methode zur Bestimmung von Benzylpenicillin, Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin in Muskelfleisch vom Rind durch Kapillargaschromatographie*. B Gesundh BI, 38:74-77.
- Bundgaard H (1983) Chemical and pharmaceutical aspects of drug allergy. In: De Weck AL, Bundgaard H [Hrsg.] *Allergic Reactions to drugs*, Bd. 63, Kap. 2, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 36-74.
- Bundgaard H (1971) Imidazole-catalyzed isomerization of penicillins into penicillinic acids. *Tetrahedron Lett*, 48:4613-4616.
- Bundgaard H, Larsen C (1978) Kinetics and mechanism of reaction of benzylpenicillin with carbohydrates and polyhydric alcohols in aqueous solution. *Arch Pharm Chem Sci*, 6:184-200.

- Bundgaard H, Larsen C (1977) Polymerization of penicillins. IV. Separation, isolation and characterization of ampicillin polymers formed in aqueous solution. *J Chromatogr*, 132 (1):51-59.
- Bundgaard H, Ilver K (1972) A new spectrophotometric method for the determination of penicillins. *J Pharm Pharmac*, 24:790-794.
- Butcher BT, Stewart GT (1970) Experimental studies on macromolecules from  $\beta$ -lactam antibiotics. In: Stewart GT, McGovern JP [Hrsg.] *Penicillin allergy, clinical and immunological*, Kap. 6, Thomas, Springfield, S. 111-134.
- Cacciatore G, Petz M (2002) Screening for residues of beta-lactam antibiotics utilizing penicillin-binding proteins (PBP). 4<sup>th</sup> International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Antwerpen, Posterbeitrag.
- Carlsson A, Björck L (1991) Charm Test II for confirmation of inhibitory substances detected by different microbial assays in herd milk. *J Food Protect*, 54 (1):32-36.
- Casy AF, Cryer C, Ominde EM (1989) Mass spectrometry of beta-lactam antibiotics with special reference to ionization by fast atom bombardment (FAB). *J Pharm Biomed Anal*, 7 (10):1121-1157.
- Celik C (1992) The effects of antibiotics on curd formation in yoghurt. *Dairy Science Abstracts No.6063*, 54:754.
- Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, Sanders AG (1940) Penicillins as a therapeutic agent. *Lancet*, II:226-228.
- Chambers HF, Neu HC (1995) Penicillins. In: Mandell GL, Douglas R, Bennett JE [Hrsg.] *Principles and practice of infectious diseases*, 4. Aufl., Kap. 15, Churchill Livingstone, New York, S. 233-246.
- Charm SE (1992) Current Problems Associated with the Detection of Antibiotic / Drug Residues in Milk and Other Food. In: Agarwal VK [Hrsg.] *Analysis of Antibiotic / Drug Residues in Food Products of Animal Origin*, Plenum Press, New York, S. 31-57.

- 
- Charm Science Inc. (1998) Charm II Beta-lactam Test for Maximum Residue Limits (MRL) Sequential Assay for milk, Operator`s Manual for milk, Protocol ID - BMRL04, 11/18/98.
- Charteris WP; Kelly PM; Morelli L; Collins JK (1998) Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Lactobacillus Species. J Food Protect, 61 (12):1636-1643.
- Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe (2001) Jahresbericht 2000. CVUA Karlsruhe, S. 112.
- Chr. Hansen GmbH (2001) Produktinformation Testsysteme, Nienburg, S. 15-16.
- Chr. Hansen GmbH (2000) Produktinformation Gefriergetrocknete DVS-Kultur YC-180, Nienburg.
- Clarke HT, Johnson JR, Robinson R (1949) Brief History of the Chemical Study of Penicillin. In: Clarke HT, Johnson JR, Robinson R [Hrsg.] The Chemistry of Penicillin, Kap. 1, Princeton University Press, Princeton, S. 3-9.
- Cliquet P, Cox E, van Dorpe C, Schacht E, Goddeeris BM (2001) Generation of class-selective monoclonal antibodies against the penicillin group. J Agric Food Chem, 49 (7):3349-3355.
- Codex Alimentarius (1999) Allgemeiner Codex-Standard für die Verwendung milchwirtschaftlicher Begriffe. Codex Stan 206-1999, In: Tolkmitt HB [Hrsg.] Codex Alimentarius, Behrs Verlag, Hamburg, S. F I - 1.
- Codex Alimentarius (1997) Empfohlener Internationaler Verfahrenskodex - Allgemeine Grundsätze der Lebensmittelhygiene. 2. Aufl., Bd. CAC/RCP 1 - 1969, Rev.3, Kap. 1B, In: Tolkmitt HB [Hrsg.] Codex Alimentarius, Behrs Verlag, Hamburg, S. A II 1, 1-11.
- Codex Alimentarius (1995) Verzeichnis der Codex-Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände. 2. Aufl., Bd. 3, Kap. 1, In: Tolkmitt HB [Hrsg.] Codex Alimentarius, Behrs Verlag, Hamburg, S. A IV - 9.

Codex Alimentarius (1975) Codex Standard for yoghurt (yogurt) and sweetened yoghurt (sweetened yogurt). Codex Stan A-11(a).. In: Tolkmitt HB [Hrsg.] Codex Alimentarius, Behrs Verlag, Hamburg.

Codex Alimentarius Commission (2001) Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods Thirteenth Session, Control of Veterinary Drug Residues in Milk and Milk Products. CX/RVDF01/8:July 2001.

Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M, Spratt BG (1995) Genetics and molecular biology of beta-lactam-resistant pneumococci. *Microb Drug Resist*, 1 (1):29-34.

Cogan TM (1972) Susceptibility of cheese and yoghurt starter bacteria to antibiotics. *Appl Microb*, 23 (5):960-965.

Collins-Thompson DL , Wood DS, Thomson IQ (1988) Detection of antibiotic residues in consumer milk supplies in North America using the Charm Test II procedure. *J Food Protect*, 51 (8):632-633.

Committee for Veterinary Medicinal Products (2001) Nafcillin, Summary Report (2). In: The European agency for the Evaluation of Medicinal Products [Hrsg.] EMEA/MRL/750/00-Final, EMEA, London, S. 1-4.

Committee on Drug Use in Food Animals (1999) The Use of Drugs in Food Animals - Benefits and Risk, National Academy Press, Washington, D. C.

Cosgrove CJ, Etgen WM (1960) Antibiotic residues in milk. *J Dairy Sci*, 43:1886.

Cullor JS, van Eenennaam A, Gardner I, Perani L, Dellinger J, Smith WL, Thompson T, Payne MA, Jensen L, Guterbock WM (1994) Performance of Various Tests Used to Screen Antibiotic Residues in Milk Samples from Individual Animals. *J AOAC Intern*, 77 (4):862-870.

Daeseleire E, De Ruyck H, van Renterghem R (2000) Confirmatory assay for the simultaneous detection of penicillins and cephalosporins in milk using liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 14 (15):1404-1409.

- 
- Dasenbrock CO, LaCourse WR (1998) Assay for cephalosporin and ampicillin in raw milk by high-performance liquid chromatography-integrated pulsed amperometric detection. *Anal Chem*, 70 (11):2415-2420.
- Dave RI, Shah NP (1997) Characteristics of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-1 - absence of bacteriocins. *Int Dairy J*, 7 (11):707-715.
- Davies JE (1997) Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In: Goode J, Chadwick DJ [Hrsg.] *Antibiotic Resistance. Origins, evolution, selection and spread*, John Wiley & Sons, Chichester, S. 15-27.
- Davis JG, Ashton TR, McCaskill M (1971) Enumeration and viability of *L. bulgaricus* and *Str. thermophilus* in Yoghurts. *Dairy Ind*, 36:569-573.
- Davis WT, Maplesden DC, Natzke RP, Philpot WN (1975) Sodium Cloxacillin for Treatment of Mastitis in Lactating Cows. *J Dairy Sci*, 58 (12):1822-1827.
- Debackere M (1995) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antimicrobials in Relation to their Residues in Milk. In: International Dairy Federation [Hrsg.] *Proceedings of the Symposium on Residues of Antimicrobial Drugs and other Inhibitors in Milk*, Brüssel, S. 41-53.
- De Baere S, Cherlet M, Baert K, De Backer P (2002) Quantitative analysis of amoxicillin and its major metabolites in animal tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 74 (6):1393-1401.
- Degelaen JP, Loukas SL, Feeney J, Roberts GCK, Burgen ASV (1979) A Nuclear Magnetic Resonance Study of the Degradation of Penicillin G in Acidic Solution. *J Chem Soc (Perkin Trans) II*:86-90.
- Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76:159-184.

- Dellaglio F, Torriani S, Vlaeminck G, Cornet R (1992) Specific characteristics of microorganisms used for new fermented milks. In: New technologies for fermented milks, Bulletin of the IDF No. 277. International Dairy Federation [Hrsg.], Kap. 1, IDF, Brüssel, S. 4-16.
- Deutsches Institut für Normung e.V. (1994) DIN 32645: Chemische Analytik: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen. Beuth Verlag, Berlin.
- Deutsches Institut für Normung e.V. (1986) DIN 38402 Teil 51: Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analysenergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen. Beuth Verlag, Berlin.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Sachverständigenausschuss Subklinische Mastitis (1994) Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandproblem. 3. Aufl., DVG, Giessen, S. 27.
- De Vuyst L (1994) Bacteriocins produced by *Streptococcus thermophilus*. In: Vandamme EJ, De Vuyst L [Hrsg.] Bacteriocins of lactic acid bacteria - Microbiology, Genetics and Applications, Kap. 22, Blackie Academic & Professional, London, Glasgow, New York, S. 507-510.
- De Vuyst L, Vandamme EJ (1994) Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: Vandamme EJ, De Vuyst L [Hrsg.] Bacteriocins of lactic acid bacteria - Microbiology, Genetics and Applications, Kap. 3, Blackie Academic & Professional, London, Glasgow, New York, S. 91-142.
- Dewdney JM, Edwards RG (1984) Penicillin hypersensitivity-is milk a significant hazard?: a review. J Roy Soc Med, 77:866-877.
- DiPiro JT, Hamilton RG, Adkinson NF (1993) Facilitation of penicillin haptentation to serum proteins. Antimicrob Agents Ch, 37 (7):1463-1467.
- Dockter G, Grundler E (1995) Ernährung und Ernährungsstörungen. In: Sitzmann FC [Hrsg.] Pädiatrie, Hippokrates Verlag, Stuttgart, S. 77-83.

- 
- Donowitz GR, Mandell GL (1986) Beta-lactam antibiotics. N Engl J Med, 318:419-426.
- Dreissen FM, Kingma F, Stadthouders J (1983) Wie Joghurtbakterien sich gegenseitig beim Wachstum unterstützen. Ref Milchwiss, 38 (3):182.
- Egan J, Meaney WJ (1985) Persistence of detectable residues of penicillin and cloxacillin in normal and mastitic quarters following intramammary infusion. Vet Record, 116:436-438.
- Eisenbrand G, Schreier P (1995) Milch. In: Römpp Lexikon Lebensmittelchemie, Thieme Verlag, Stuttgart, S.545-548.
- Ellerbroek L, Schramm G, Wiese E, Reuter G (1994) Mikrobiologischer Hemmstoffnachweis in Fleisch. Fleischwirtsch, 74(4):413-416.
- Emanuiloff I (1956) Untersuchung über die antibiotische Aktivität der Mikroflora der bulgarischen Sauermilch. XIV Int. Milchw. Kongr., 1:548-553.
- Entscheidung 93/256/EWG der Kommission vom 14. April 1993 über die Verfahren zum Nachweis von Stoffen mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung (ABl EG Nr. L 118/64) vom 14.05.1993.
- Entscheidung 97/747/EG der Kommission vom 27. Oktober 1997 über Umfang und Häufigkeit der in der Richtlinie 96/23/EG des Rates vorgesehenen Probenahmen zum Zweck der Untersuchung in bezug auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände in bestimmten tierischen Erzeugnissen (ABl. EG Nr. L 303/12) vom 06.11.1997.
- European Commission - Health & Consumer Protection Directorate-General (2002) Opinion of the Scientific Committee on animal nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. European Commission, Brüssel.
- European Dairy Association (2002) EDA Figures, EDA, Brüssel, <http://eda.euromilk.org>, Stand: 01.07.2002.

- Evans DA, Stern DN (1960) Observations on the incidence of penicillin transfer from treated to untreated quarters of cow udders following infusion of penicillin for treatment of mastitis. *J Dairy Sci*, 43:1886.
- Everest DJ, Jackman R, Thorne L, Everest SJ (1994) Improved spectrophotometric assay for beta-lactam residues in kidney tissue. *Analyst*, 119 (12):2727-2729.
- FEDESA (1998) Volume sales of antibiotics. *Deutsches Tierärzteblatt*, 11:1093.
- Fleming A (1929) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit J Exp Pathol*, 10:226-236.
- Fletouris DJ, Psomas JE, Mantis AJ (1992) Determination of Some Monobasic Penicillins in Milk by Ion-Pair Liquid Chromatography. *J Agric Food Chem*, 40:617-621.
- Fox JL (2001) Antibiotic use and impact on resistance. *ASM News*, 67 (3):128-129.
- Frere JM, Klein D, Ghuyssen JM (1980) Enzymatic method for rapid and sensitive determination of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 18 (4):506-510.
- Furusawa N (2000) Rapid liquid chromatographic determination of residual penicillin G in milk. *Fresenius J Anal Chem*, 368:624-626.
- Gedek W, Kaup E (1973) Influence of Physiological and Pathological Factors on Elimination of Antibiotics with Cow's Milk. In: *International Society for Animal Hygiene: Budapest Proceedings of the 1. International Congress for Animal Hygiene, Budapest*.
- Gee HE, Ho KB, Toothill J (1996) Liquid Chromatographic Determination of Benzylpenicillin and Cloxacillin in Animal Tissues and Its Application to a Study of the Stability at -20°C of Spiked and Incurred Residues of Benzylpenicillin in Ovine Liver. *J AOAC Int*, 79 (3):640-644.
- Ghuyssen JM (1991) Serine  $\beta$ -lactamases and Penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microb*, 45:37-67.



- 
- Giertz H, Flohe L, Göthert M, Peskar A, Resch K (1996) Mediatoren der Entzündung und Allergie, Arzneimittelallergie, Pharmakotherapie der Allergie. In: Forth W, Henschler D, Rummel W [Hrsg.] Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. Aufl., Kap. 13, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 350-360.
- Gold HS, Moellering RC (1996) Drug therapy - Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med*, 335:1445-1453.
- Gräfe U (1992) Die Zellwand der Mikroorganismen als Target für Antibiotika. In: Gräfe U [Hrsg.] Biochemie der Antibiotika, Kap. 5, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, S. 292-318.
- Groß G (1990) Der Säuerungsverlauf von Joghurt. *Deutsche Milchwirtschaft*, 41 (16):543-544.
- Grossklaus D, Kaul A (1989) Rückstände in von Tieren stammenden Lebensmitteln. Parey Verlag, Berlin, Hamburg, S. 66.
- Guay R, Cardinal P, Bourassa C, Brassard N (1987) Decrease of penicillin G residues incidence in milk: A fact or an artefact?. *Int J Food Microb*, 4:187-196.
- Gustafson RH, Bowen RE (1997) Antibiotic use in animal agriculture. *J App Microbiol*, 83:531-541.
- Haagsma N (1993) Stability of veterinary drug residues during storage, preparation and processing. In: Haagsma N, Ruiters A, Czedik-Eysenberg PB [Hrsg.] Proceedings of the EuroResidue II, Conference on residues of veterinary drugs in food University of Utrecht, Veldhoven, S. 41-49.
- Hady PJ, Lloyd JW, Kaneene JB (1993) Antibacterial use in lactating dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 203 (2):210-220.
- Hädrich J (1999) Informationstag 655/99 der GDCh: Validierung, Frankfurt am Main.

- Hamann J, Tolle A, Blüthgen A, Heeschen W (1975) Untersuchungen über Nachweis, Isolierung und Identifizierung von Antibiotikarückständen in der Milch: 1. Mitteilung: Isoxazolympenicilline. *Milchwissenschaft*, 30:1-7.
- Hauptmann S (1991) *Organische Chemie*. 3. Aufl., Wiley-VCH Verlag, Weinheim, S. 563.
- Hawkins GE, Cannon RY, Paar CF (1962) Concentration of penicillin in milk from noninfused quarters following infusion of one quarter. *J Dairy Sci*, 45:1020-1022.
- Heller DN, Ngoh MA (1998) Electrospray ionization and tandem ion trap mass spectrometry for the confirmation of seven beta-lactam antibiotics in bovine milk. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 12 (24):2031-2040.
- Hernandez M, Borrull F, Calull M (1999) Determination of amoxicillin in plasma samples by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B*, 731 (2):309-315.
- Hoffmann H, Söder A, Schacht U, Weidenmüller HL (1972) Antibiotica. In: Ehrhart G, Ruschig H [Hrsg.] *Arzneimittel: Entwicklung Wirkung Darstellung*, Bd. 4, Verlag Chemie, Weinheim, S. 239-314.
- Holbrook KA, Franklin D, Lowy MD (1998)  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Cancer Invest*, 16 (6):405-412.
- Holec J, Klimes B (1964) Der Einfluss der Antibiotika auf die Joghurtgärung. *Sb Vys Sk Zemed Les Fak Brne*, 12:363-369.
- Holstege DM, Puschner B, Whitehead G, Galey FD (2002) Screening and mass spectral confirmation of beta-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. *J Agric Food Chem*, 50 (2):406-411.
- Hong C, Kondo F (2000) Detection, quantitation, and identification of residual aminopenicillins by high-performance liquid chromatography after fluorescamine derivation. *J Food Protect*, 63 (10):1421-1425.

- 
- Hormazábal V, Yndestad M (1998) Determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in plasma and tissues using liquid chromatography-mass spectrometry for residual and pharmacokinetic studies. *J Liq Chrom & Rel Technol*, 21:3099-3110.
- Hormazábal V, Yndestad M (1995) Detection of benzylpenicillin in milk by HPLC. *J Liq Chromatogr*, 18 (12):2467-2474.
- Horsch F (1984) *Allgemeine Mikrobiologie und Tierseuchelehre*. VEB Gustav Fischer, Jena, S. 229.
- Hou JP, Poole JW (1971)  $\beta$ -Lactam Antibiotics: Their Physicochemical Properties and Biological Activities in Relation to Structure. *J Pharm Sci*, 60 (4):503-532.
- Huot E, Meghrous J, Barrena-Gonzalez C, Petitdemange H (1996) Bacteriocin J46, a New Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* Subsp. *cremoris* J46: Isolation and Characterization of the Protein and Its Gene. *Anaerobe*, 2 (3):137-145.
- Hurtaud D, Delepine B, Sanders P (1994) Particle Beam Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method with Negative Ion Chemical Ionization for the Confirmation of Oxacillin, Cloxacillin and Dicloxacillin Residues in Bovine Muscle. *Analyst*, 119:2731-2736.
- Huth SP, Warholic PS, Devou JM, Chaney LK, Clark GH (2002) Parallax beta-lactam: a capillary-based fluorescent immunoassay for the determination of penicillin-G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, cephalosporin, and ceftiofur in bovine milk. *J AOAC Int*, 85 (2):355-364.
- Ibach A (1999) *Entwicklung und Anwendung einer HPLC-Schnellmethode zur Bestimmung von Isoxazolylpenicillinrückständen*. Verlag Mainz, Aachen.
- Ibach A, Petz M (1998) HPLC-integrated solid-phase extraction with photochemical post-column derivatization for the determination of oxacillin, cloxacillin and dicloxacillin in raw milk. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 207:170-173.

- IDF (1992) New technologies for fermented milks. In: International Dairy Federation [Hrsg.] IDF Bulletin 277/1992, IDF, Brüssel.
- IDF (1991a) Yoghurt - Identification of characteristic microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*). In: International Dairy Federation [Hrsg.] International IDF Standard 146:1991, IDF, Brüssel, S.73, 258.
- IDF (1991b) Detection & confirmation of inhibitors in milk and milk products. In: International Dairy Federation [Hrsg.] Bulletin of the IDF No. 258, IDF, Brüssel.
- IDF (1988) Fermented milks - Science and technology. In: International Dairy Federation [Hrsg.] IDF Bulletin 227/1988, IDF, Brüssel.
- Idsoe O, Guthe T, Willcox RR, de Weck AL (1969) Art und Ausmaß der Penicillinnebenwirkungen unter besonderer Berücksichtigung von 151 Todesfällen nach anaphylaktischem Schock. Schweiz Med Wochenschr, 99 (35):1191-1197, 1252-1257.
- Imerman PM, Taylor JA, Timms L (1996) Direct online HPLC method for analyzing beta lactam residues in milk. Dairy Report - Iowa State University, DSL 103.
- Ito Y, Ikai Y, Oka H, Matsumoto H, Miyazaki Y, Takeba K, Nagase H (2001) Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis IV. Confirmatory assay of benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin, in bovine tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Chromatogr A, 911 (2):217-223.
- Ito Y, Ikai Y, Oka H, Matsumoto H, Kagami T, Takeba K (2000) Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis III. Determination of benzylpenicillin, phenoxymethyl-penicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin in bovine liver and kidney by liquid chromatography with ultraviolet detection. : J Chromatogr A, 880 (1-2):85-91.

- 
- Ivanova I, Miteva V, Stefanova T, Pantev A, Budakov I, Danova S, Moncheva P, Nikolova I, Dousset X, Boyaval P (1998) Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int J Food Microbiol* , 42 (3):147-158.
- Jacobs J, Klasens M, Pennings A (1971) Uitscheiding van penicilline uit normale en mastitiskwartieren na intramammaire behandeling. *Tijdschr Diergeneesk*, 96 (11):721-730.
- Jacoby GA, Archer GL (1991) New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med*, 324:601-612.
- Jäger L, Ambrosius H (1989) Arzneimittel als Allergene. In: Jäger L [Hrsg.] *Klinische Immunologie und Allergologie*, Kap. 15, Fischer Verlag, Stuttgart, S. 581-588.
- Jakimov N (1970) Antibiotics in milk and their effect on lactic acid bacteria. *Mikrobiologija*, 7 (1):99-109.
- Jakubke HD, Jesschkeit H (1975) *abc Biochemie*, Brockhaus Verlag, Leipzig, S. 58.
- Janata O (1999) *Antibiotika*. 3. Aufl., pm Verlag, Kössen, S. 12-15.
- Jepsen A, Overbay AJ (1951) The disturbing effects of penicillin in milk. *Neth Milk Dairy J*, 5:157-185.
- Jones GM (1999) On-farm Tests for Drug Residues in Milk. In: Virginia Tech [Hrsg.] *Virginia Cooperative Extension - Dairy Publication*, No. 404-401, Virginia State University, Virginia.
- Jones GM, Seymour EH (1988) Cowside antibiotic residue testing. *J Dairy Sci*, 71:1691-1699.
- Juhlin L, Ahlstedt S, Andal L, Ekstrom B, Svard PO, Wide L (1977) Antibody reactivity in penicillin-sensitive patients determined with different penicillin derivatives. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 54 (1):19-28.

- Katz SE (1982)  $\beta$ -lactam residues in milk - methods of measurement and significance of residues. In: Arlington VA [Hrsg.] Proc. 21st Annu. Mtg. National Mastitis Council Annual meeting, New Jersey Agricultural Experiment Station Publications, New Jersey, S. 59-67.
- Keefe TJ (1980) Benzathine cloxacillin as a dry-cow mastitis product. *Mod Vet Pract*, 61 (9):783-785.
- Keppler K, Cacciatore G (2002) Nachweis von Benzylpenicillinrückständen in Fleisch mittels Bocillin FL und einer DD-Carboxypeptidase. Forschungspraktikum Lebensmittelchemie, Fachbereich Chemie, Universität Wuppertal.
- Kessler HG (1996) Sauermilchprodukte - Gelstrukturen - Milcherzeugnisse und Hydrokolloidanwendung. In: Technische Universität München-Weihenstephan [Hrsg.] Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik – Molkereitechnologie, 4. Aufl., Kap. 17, Verlag A. Kessler, München, S. 455-462.
- Kirchmann E, Welch LE (1993) High-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of penicillins. *J Chromatogr*, 633:111-118.
- Kirchmann E, Earley RL, Welch LE (1994) The electrochemical detection of penicillins in milk. *J Liquid Chromatogr*, 17 (8):1755-1772.
- Kitteringham NR, Christie G, Coleman JW, Yeung JH, Park BK (1987) Drug-protein conjugates-XII. A study of the disposition, irreversible binding and immunogenicity of penicillin in the rat. *Biochem Pharmacol*, 36 (5):601-608.
- Klein G (1991) Allergie gegen Beta-Lactam-Antibiotika. *Pharmainformation*, 6 (2).
- Klupsch HJ (1992) Saure Milcherzeugnisse, Milchmischgetränke und Desserts. 2. Aufl., Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, S. 61.
- Knopf K (1975) Milch. In: *Lebensmitteltechnologie*. F. Schöningh, Paderborn, S. 95-105.
- Knudsen ET, Dewdney JM, Trafford JA (1970) Reduction in incidence of ampicillin rash by purification of ampicillin. *Br Med J*, 21 (694):469-471.

- 
- Kondratenko M, Schischkova I, Zaneva K, Gjoshev B (1978) Hemmwirkung von Antibiotika bei der Joghurtherstellung. XX Int Dairy Congress, Paris, S.902-903.
- Konecny S (1978) Effect of temperature and time on reduction of the biological activity of some kinds of antibiotics in milk. *Veternarstvi*, 28:409-410.
- Koprowski L, Kirchmann E, Welch LE (1993) The electrochemical oxidation of penicillins on gold electrodes. *Electroanalysis*, 5:473-482.
- Korsrud GO, Boison JO, Nouws JFM, MacNeil JD (1998) Bacterial Inhibition Tests Used to Screen for Antimicrobial Veterinary Drug Residues in Slaughtered Animals. *J AOAC Int*, 81 (1):21-24.
- Korsrud GO, Papich MG, Fesser ACE, Salisbury CDC, MacNeil JD (1996) Laboratory testing of the Charm Test II receptor assays and the Charm farm test with tissues and fluids from hogs fed sulfamethazine, chlortetracycline, and penicillin G. *J Food Protect*, 59 (2):161-166.
- Krabisch P, Gangl A, Wittkowski G, Fehlings K (1999) Mastitiserreger - Resistenzsituation bei veterinär- und humanmedizinisch relevanten Antibiotika. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft [Hrsg.] 23. Kongress Bad Nauheim April 1999, DVG, Giessen, S. 145-155.
- Kreuzig F (1996) Antibiotics. In: Sherma J, Fried B [Hrsg.] *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, 2. Aufl., Bd. 71, Kap. 17, Marcel Dekker Verlag, New York, S. 445-480.
- Kroker R (2002) *Kompaktwissen Tierarzneimittelrückstände*. Kap. 1, Behrs Verlag, Hamburg, S. 9-33.
- Kroker R (1997) Tierarzneimittelrückstände. In: Heeschen W [Hrsg.] *Handbuch Lebensmittelhygiene*, Kap. 3.4.1, Behrs Verlag, Hamburg, S. 1-28.

- Kroll S, Usleber E, Zaadhof KJ, Schneider E, Märtlbauer E (2000) Evaluation of commercial rapid tests for  $\beta$ -lactam antibiotics in raw milk. In: Ruiters A, van Ginkel LA [Hrsg.] Residues of Veterinary Drugs in Food, Bd. 2, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, S. 693-697.
- Kubalec P, Brandšteterová E, Bednáriková A (1997) Determination of oxacillin, cloxacillin and dicloxacillin in milk, meat and cheese samples using HPLC and precolumn derivatization. Z Lebensm Unters Forsch, 205:85-88.
- Kurmann J, Rasic JL, Kroger M (1992) Yoghurt. In: Encyclopedia of fermented fresh milk products: an international inventory of fermented milk, cream, buttermilk, whey, and related products, Van Nostrand Reinhold, New York, S. 309-316.
- LaCourse WR, Dasenbrock CO (1998) High-performance liquid chromatography-pulsed electrochemical detection for the analysis of antibiotics. Adv Chromatogr, 38:189-232.
- LaFaye P, Lapresle C (1988) Identification of two fixation sites for penicilloyl groups on the albumin molecule from penicillin-treated patients. FEBS Lett, 234 (2):305-308.
- Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenstände) i.d.F. der Bek. vom 8. Juli 1993, (BGBl I S.1169), zuletzt geändert durch Gesetz vom 9. September 1997 (BGBl I S.2296).
- Leroy P, Gavriloff C, Nicolas A, Archimbault P, Ambroggi G (1992) Comparative assay of amoxicillin by high-performance liquid chromatography and microbiological methods for pharmacokinetic studies in calves. Int J Pharm, 82:157-164.
- Lessel J (1996) Penicillinbindende Proteine. Pharmazie in unserer Zeit, 25 (1):17-27.
- Levy SB (1997) Antibiotic resistance: An ecological imbalance. In: Chadwick DJ, Goode J [Hrsg.] Antibiotic Resistance. Origins, evolution, selection and spread. John Wiley & Sons, Chichester, S. 1-14.



- 
- Lihl S (1995) Methodische Entwicklung zur Anreicherung von Penicillinrückständen unter Verwendung eines automatischen Säulenschaltsystems sowie zu deren Hochdruckflüssigchromatographie und Detektion nach photochemischer Nachsäulenderivatisierung. Dissertation Bergische Universität GH Wuppertal, Wuppertal, S. 61-69, 76-79.
- Lihl S, Petz M (1994) HPLC-Bestimmung von Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin in Muskelfleisch vom Rind mit automatischem Cleanup durch on-line Festphasenextraktion. *Z Lebensm Unters Forsch*, 199:229-234.
- Lihl S, Rehorek A, Petz M (1996) High-performance liquid chromatographic determination of penicillins by means of automated solid-phase extraction and photochemical degradation with electrochemical detection. *J Chromatogr A*, 729:229-235.
- Lim KS, Huh CS, Baek YJ (1995) Studies on the antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria in cultured milk products. *Dairy Science Abstracts No.7982*, 57:992-993.
- Loussouarn S (1983) Sensitivity of lactic cultures to certain antibiotics. *Dairy Science Abstracts No.1739*, 45:203.
- Lund C (1986) Identification of antibiotic residues in animal tissues under practical conditions. In: *World Congress Foodborne Infections and Intoxications [Hrsg.] Proceedings 2<sup>nd</sup> World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin*, S. 819-824.
- Luo W, Hansen EB, Ang CYW, Deck J, Freeman JP, Thompson HC (1997) Simultaneous Determination of Amoxicillin and Ampicillin in Bovine Milk by HPLC with Fluorescence Detection. *J Agric Food Chem*, 45:1264-1268.
- Märtlbauer EP (1993) Enzymimmuntests für antibakteriell wirksame Stoffe. Ferdinand Enke, Stuttgart, S. 113.
- Mäyra-Mäkinen A (1995) Technological significance of residues for the dairy industry. In: *International Dairy Federation [Hrsg.] Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk*, IDF, Brüssel, S. 136-143.

- Mandell GL, Petri WA (1996) Penicillins, Cephalosporins, and Other  $\beta$ -Lactam Antibiotics. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW [Hrsg.] Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9. Aufl., Kap. 45, McGraw-Hill Company, New York, S. 1073-1101.
- Manni PE, Lipper RA, Blaha JM, Hem SL (1973) Analysis of potassium penicillin G and its degradation products by thin-layer chromatography. *J Chromatogr*, 76 (2):512-515.
- Marchetti M, Schwaiger I, Schmid ER (2001) Determination of benzylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin in cows' milk by ion-pair high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization. *Fresenius J Anal Chem*, 371 (1):64-67.
- Markovich MN (1988) Species differences in the interaction of serum albumin with antibiotics. *Antibiot Khimioter*, 33 (4):267-271.
- Markovich MN, Landau MA, Rudzit EA (1977) On molecular mechanism of penicillin binding with serum albumin. *Antibiotiki*, 22 (10):901-909.
- Marth EH, Ellickson BE (1959a) Antibiotic residues in milk and milk products. *J Milk Food Technol*, 22:241-249.
- Marth EH, Ellickson BE (1959b) Problems created by the presence of antibiotics in milk and milk products. *J Milk Food Technol*, 22:266-272.
- McGilveray IJ, Strickland RD (1967) Detection and separation of penicillins by thin-layer chromatography. *J Pharm Sci*, 56 (1):77-79.
- McGregor DN (1984) Penicillins. In: Lwowski W [Hrsg.] *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Bd. 7, Pergamon Press, Oxford, S. 299-339.
- Medeiros AA (1997) Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*, 24 (Suppl. 1):S. 19-45.

- 
- Meetschen U, Petz M (1991) Gaschromatographische Analysenmethoden für Rückstände von sieben Penicillinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Z Lebensm Unters Forsch, 193:337-343.
- Mercer HD, Geleta JN, Carter GG (1974) Absorption and Excretion of Penicillin G from the Mastitic Bovine Udder. J Am Vet Med Assoc, 164 (6):613-617.
- Merck Index on CD-Rom (1999) Version 13:3, Merck & Co, Whitehouse Station, NJ.
- Milashki S (1990) Threshold concentrations of some antibiotics and sulphonamides for inhibition of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* used as a symbiotic culture for yoghurt. Dairy Science Abstracts No.4313, 52:480.
- Milchindustrie-Verband e.V. (2002) Zahlen und Daten der deutschen Milchindustrie, Milch & Markt Informationsbüro, Bonn.
- Miller DJS (1995) Present state and trends in the use of veterinary antimicrobials with particular reference to dairy cows. In: International Dairy Federation [Hrsg.] Proceedings of the Symposium on Residues of Antimicrobial Drugs and other Inhibitors in Milk, Brüssel, S. 15-25.
- Mineo H, Kaneko S, Koizumi I, Asida K, Akahori F (1992) An Analytical Study of Antibacterial Residues in Meat: The Simultaneous Determination of 23 Antibiotics and 13 Drugs Using Gas Chromatography. Vet Hum Toxicol, 34 (5):393-397.
- Mitchell JM, Griffiths MW, McEwen SA, McNab WB, Yee AJ (1998) Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. J Food Protect, 61 (6):742-756.
- Mitchell T (1999) Allergic drug reactions. Practitioner, 243:810-815.
- Moats WA (1999) The effect of processing on veterinary residues in food. Adv Exp Med Biol, 459:233-241.

- Moats WA (1990) Determination of ampicillin in milk by liquid chromatography using an automated LC cleanup. In: Haagsma, N, Ruiter A [Hrsg.] Proceedings of the EuroResidue: Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, University of Utrecht, Utrecht, S. 280-283.
- Moats WA (1983) Detection and Semiquantitative Estimation of Penicillin G and Cloxacillin in Milk by Thin-Layer Chromatography. *J Agric Food Chem*, 31:1348-1350.
- Moats WA, Harik-Khan R (1995) Identification and Measurement of  $\beta$ -Lactam Antibiotic Residues in Milk: Integration of Screening Kits with Liquid Chromatography. *J AOAC Int*, 78 (4):978-986.
- Moats WA, Leskinen L (1987) Comparison of bonded, polymeric and silica columns for chromatography of some penicillins. *J Chromatogr*, 386:79-86.
- Molinari M, Schneider C, de Weck AL, Gruden E, Pfeuti C (1973) Über pseudomonovalente Penicilloyl-Kohlenhydrate. *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol*, 146 (3):225-238.
- Moretain JP, Boisseau J (1989) Excretion of penicillins and cephalixin in bovine milk following intramammary administration. *Food Addit Contam*, 6 (1):79-90.
- Musch G, De Smet M, Massart DL (1985) Expert system for pharmaceutical analysis. I. Selection of the detection system in high-performance liquid chromatographic analysis: UV versus amperometric detection. *J Chromatogr*, 348 (1):97-110.
- Muth P, Metz R, Beck H, Bolten W, Vergin H (1996) Improved high-performance liquid chromatographic determination of amoxicillin in human plasma by means of column switching. *J Chromatogr A*, 729:259-266.
- Mutschler E (1986) Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. WVG, Stuttgart, S. 597-603.
- Neu HC (1992) The crisis in the antibiotic resistance. *Science*, 257:1064-1073.

- 
- Nikolov NM (1966) Effect of antibiotics on the microflora of yoghurt. Dairy Science Abstracts No. 75, 29:17.
- Niu CQ, Zhu SQ (1997) Separation and determination of ampicillin polymers by high performance capillary electrophoresis. Yao Xue Xue Bao, 32 (3):207-209.
- Oda T, Hiwaki H (1996) Heat Stability of 24 Antibiotics in Food Extracts. J Food Hyg Soc JPN, 37 (2):97-103.
- Oh S, Kim SH, Worobo RW (2000) Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. J Dairy Sci, 83 (12):2747-2752.
- Ohki Y, Nakamura T, Nagaki H, Kinoshita T (1992) Structural analysis of non-volatile compounds by liquid chromatography / mass spectrometry and liquid chromatography / tandem mass spectrometry: thermal isomerization of benzylpenicillin in a plasmaspay interface. Biol Mass Spectrom, 21:133-140.
- Ormerod AD, Reid TM, Main RA (1987) Penicillin in milk - its importance in urticaria. Clin Allergy, 17 (3):229-234.
- Otten H, Plempel M (1975) Antibiotika und Chemotherapeutika. In: Otten H, Plempel M, Siegenthaler W [Hrsg.] Antibiotika-Fibel. 4. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, S. 176.
- Ottogalli G, Bianchi B, Galli S, Galli A (1975) Use of milk containing antibiotics. Industria del Latte, 11:37.
- Page MI (1984) The Mechanisms of Reactions of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. Acc Chem Res, 17:144-151.
- Park BK, Coleman JW, Kitteringham NR (1987) Drug disposition and drug hypersensitivity. Biochem Pharmacol, 36 (5):581-590.
- Pérez B, Prats C, Castells E, Arboix M (1997) Determination of cloxacillin in milk and blood of dairy cows by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B, 698:155-160.

- Petrausch R (2000) Lila Liste. 12. Aufl., Delta Medizinische Verl.-Ges., Berlin.
- Petz M (1992) Comparison of chromatographic procedures for determining residues of penicillins. In: Agarwal VK [Hrsg] Analysis of antibiotic / drug residues in food products of animal origin, Plenum Press, New York, London, S.147-163.
- Petz M (1991) Tierarzneimittel in Fleisch - Möglichkeiten ihrer analytischen Erfassung. Mitt Gebiete Lebensm Hyg, 82:7-23.
- Petz M (1984) Chemische Analyse von Tierarzneimittelrückständen in Lebensmitteln  
1. Mitteilung: Allgemeine Methodik und gaschromatographische Verfahren. Z Lebensm Unters Forsch, 180:267-279.
- Pilet C, Toma B, Muzet J, Renard F (1969) Investigation of the thermostability of several antibiotics. Cah Med Vet, 6:227-234.
- Poljacki M, Jovanovic M, Duran V, Tasic S, Subotic M (1995) Chronic urticaria caused by penicillin. Results of monitoring cases of acute penicillin urticaria which developed into chronic urticaria. Med Pregl, 48 (3-4):108-110.
- Prescott JF (2000) Beta-lactam Antibiotics. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD [Hrsg.] Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 3. Aufl., Iowa State University Press, Iowa, S. 105-160.
- Pulusani SR, Rao DR, Sunki GR (1979) Antimicrobial activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus*. J Food Sci, 44 (2):575-578.
- Rabbolini S, Verardo E, Da Col M, Gioacchini AM, Traldi P (1998) Negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry in the structural characterization of penicillins. Rapid Commun Mass Spectrom, 12 (22):1820-1826.
- Ramesh C, Chandan PD (1989) Yoghurt: Nutritional and health properties. McLean, Virginia, S. XII.

---

Rasic JL, Kurmann JA (1978) *Yoghurt - Scientific grounds, technology, manufacture and preparations*. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen.

Reinbold GW, Reddy MS (1974) Sensitivity of resistance dairy starter and associated microorganisms to selected antibiotics. *J Milk Food Technol*, 37 (10):517-521.

Reybroeck W (2000) Performance of the Premi-Test using naturally contaminated meat. In: Van Ginkel LA, Ruiters A [Hrsg.] *Residues of veterinary drugs in food*, Bd. 2, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, S. 909-912.

Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG, 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG (ABl. EG L 125/10) vom 23.05.1996.

Riediker S, Stadler RH (2001) Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 73 (7):1614-1621.

Riediker S, Diserens JM, Stadler RH (2001) Analysis of beta-lactam antibiotics in incurred raw milk by rapid test methods and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 49 (9):4171-4176.

Riemelt I, Bartel B, Malczan M (1996) *Milchwirtschaftliche Mikrobiologie*, Behrs Verlag, Hamburg, S. 55.

Robinson RK, Tamime AY (1990) Microbiology of fermented milk. In: Robinson RK [Hrsg.] *Dairy Microbiology*, 2. Aufl., Bd. 2, Kap. 6, Elsevier Science Publisher, London, New York, S. 291-341.

Rocklin RD (1993) Electrochemical Detection. In: Parriott D [Hrsg.] *A practical guide to HPLC detection*, Academic press, San Diego, S.145-171.

Rogers ME, Adlard MW, Saunders G; Holt G (1984) Derivatization techniques for high-performance liquid chromatographic analysis of  $\beta$ -lactams. *J Chromatogr*, 297:385-391.

- Rohner P, Schällibaum M, Nicolet J (1985) Detection of Penicillin G and its Benzylpenicilloyl (BPO) – Derivates in Cows Milk and Serum by means of an ELISA. *J Food Protect*, 48(1):59-62.
- Roncada P, Tomasi L, Stracciari GL, Ermini L, Strocchia A (2000) Milk depletion of dicloxacillin residues in cows and sheep following intramammary administration. *J Vet Pharmacol Ther*, 23 (4):237-241.
- Rose MD, Bygrave J, Farrington WHH, Shearer G (1997b) The Effect of Cooking on Veterinary Drug Residues in Food, Part 8. Benzylpenicillin. *Analyst*, 122:1095-1099.
- Rose MD, Tarbin J, Farrington WHH, Shearer G (1997a) Determination of penicillins in animal tissues at trace residue concentrations: II. Determination of amoxicillin and ampicillin in liver and muscle using cation exchange and porous graphitic carbon solid phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Food Addit Contam*, 14 (2):127-133.
- Rosin H, Henschler D (1996) Antibiotika und Chemotherapeutika. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K [Hrsg.] *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 7. Aufl., Kap. 30, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 695-702.
- Rote Liste (verantw.: Hildegard Dootz) (2002) Rote Liste. [www.rote-liste.de](http://www.rote-liste.de), Rote Liste Service GmbH, Frankfurt a.M., Stand: 31.07.2002.
- Ruso JM, Attwood D, Garcia M, Taboada P, Varela LM, Mosquera V (2001) A study of the interaction of the amphiphilic penicillins cloxacillin and dicloxacillin with human serum albumin in aqueous solution. *LANGMUIR*, 17 (17):5189-5195.
- Sablon E, Contreras B, Vandamme E (2000) Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 68:21-60.



- 
- Salkind AR, Cuddy PG, Foxworth JW (2001) Is this patient allergic to penicillin? An evidence-based analysis of the likelihood of penicillin allergy. *JAMA*, 285 (19):2498-2505.
- Sánchez C, Hernández de Rojas A, Martínez B, Argüelles ME, Suárez JE, Rodríguez A, Mayo B (2000) Nucleotide Sequence and Analysis of pBL1, a Bacteriocin-Producing Plasmid from *Lactococcus lactis* IPLA 972. *Plasmid*, 44 (3):239-249.
- Schäfer C, Lubda D (2001) Alkyl diol silica: restricted access pre-column packings for fast liquid chromatography-integrated sample preparation of biological fluids. *J Chromatogr A*, 909 (1):73-78.
- Schaefer C, Spielmann H (2001) Arzneimittelverordnung in Schwangerschaft und Stillzeit. 6. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München, Jena, S.110.
- Schiffmann AP, Schütz M, Wiesner HU (1992) False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. 1. The influence of antibiotic residues in bulk milk on lactic acid production of starter cultures. *Milchwiss*, 47 (11):712-715.
- Schindler F (2000) Surface Plasmon Resonance - was steckt dahinter? *LaborPraxis* (10):38-42.
- Schlegel HG (1992) Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, S. 299.
- Schlösser J (2000) Gewinnung von Antikörpern gegen ein bakterielles Zellwandpeptid als multispezifische Rezeptoren für die Rückstandsanalytik von  $\beta$ -Lactam- und Glykopeptidantibiotika, Dissertation Universität Wuppertal, Wuppertal.  
<http://elpub.bib.uni-wuppertal.de/edocs/dokumente/fb09/diss2000/schloesser/d090017.pdf>
- Schneider CH, de Weck AL (1970) Evaluation of intrinsic and extrinsic penicilloyl-specific immunogenicity of penicillins. The use of penicillin hydrolysis catalyzed by 3,6-bis-(dimethylaminomethyl) catechol. *Immunochemistry*, 7 (2):157-166.
- Schneider CH, de Weck AL (1967) The reaction of benzylpenicillin with carbohydrates at neutral pH with a note on the immunogenicity of hapten polysaccharide conjugates. *Immunochemistry*, 4 (4):331-343.

- Schneider G (1985) Pharmazeutische Biologie. B.I.-Wissenschaftsverlag, Mannheim, S. 484-499.
- Schröder E, Rufer C, Schmiechen R (1982) Pharmazeutische Chemie. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 872-888.
- Schwartz MA (1969) Chemical aspects of penicillin allergy. J Pharm Sci, 58 (6):643-661.
- Seelemann M, Timm F (1955) Untersuchungen über die Resistenz von Milchsäurebakterien gegen Penicillin. Milchwissenschaft, 10 (4):113-116.
- Selwyn S (1979) Pioneer work on the penicillin phenomenon. Antimicrob Chemother, 5:249-255.
- Senyk GF, Davidson JH, Brown JM, Hallstead ER, Sherbon JW (1990) Comparison of rapid tests used to detect antibiotic residues in milk. J Food Protect, 53 (2):158-164.
- Seymour EH, Jones GM, McGilliard ML (1988) Persistence of residues in milk following antibiotic treatment of dairy cattle. J Dairy Sci, 71 (8):2292-2296.
- Shah AJ, Adlard MW (1988) Determination of  $\beta$ -lactams and their biosynthetic intermediates in fermentation media by pre-column derivatisation followed by fluorescence detection. J Chromatogr, 424:325-336.
- Shahani KM, Vakil JR, Kilara A (1976) Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. Cult Dairy Prod J, 11:14-17.
- Shahani KM, Gould IA, Weiser HH, Slatter WL (1956) Stability of small concentrations of penicillin in milk as effected by heat treatment and storage. J Dairy Sci, 39:971-977.
- Shiple D, Ormerod AD (2001) Drug-induced urticaria. Recognition and treatment. Am J Clin Dermatol, 2 (3):151-158.

- 
- Siegel MM, Isensee RK, Beck DJ (1987) Thermospray mass spectrometer interface used as a flow reactor for in situ thermal degradation studies: applications to beta-lactam antibiotics. *Anal Chem*, 59:989-995.
- Singh J, Khanna A, Chander H (1973) Antibacterial activity of lactobacilli. *J Dairy Sci*, 26:135-136.
- Singh P (1985) Syntex Inc., USA, Protein conjugates of penicilloic acid, their preparation and use, Europäisches Patentamt 0 144 154.
- Snippe N, van de Merbel NC, Ruiten FPM, Steijger OM, Lingeman H, Brinkman UAT (1994) Automated column liquid chromatographic determination of amoxicillin and cefadroxil bovine serum and muscle tissue using on-line dialysis for sample preparation. *J Chromatogr B*, 662:61-70.
- Sobiraj A, Kron A, Schollmeyer U, Failing K (1997) Bundesweite Untersuchung zur Erregerverteilung und In-vitro-Resistenz euterpathogener Bakterien in der Milch von Kühen mit subklinischer Mastitis. *Tierärztliche Praxis*, 25:108-115.
- Sørensen LK, Rasmussen BM, Boison JO, Keng L (1997) Simultaneous determination of 6 penicillins in cows' raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method. *J Chromatogr B*, 694:383-391.
- Sozzi T, Smiley MB (1980) Antibiotic Resistances of Yoghurt Starter Cultures *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl Environ Microbiol*, 40 (5):862-865.
- Spörri K, Stephan R (2000) Evaluierung eines Schnelltestes zum biologischen Hemmstoffnachweis (PREMI-Test) als Screeningmethode bei der Fleischkontrolle. In: DVG [Hrsg.] Kongressbericht der 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, DVG, Garmisch-Partenkirchen, S. 464-466.
- Spreer E (1995) Technologie der Milchverarbeitung. 7. Neub. akt. Aufl., Behrs Verlag, Hamburg, S. 411-420.

- Stewart GT, Butcher BT, Wagle SS, Stanfield MK (1970) Biopolymerization of peptide antibiotics. In: Johnson JF, Porter RS [Hrsg.] Liquid crystal and ordered fluids, Plenum, New York, S. 33-51.
- Straub R, Linder M, Voyksner RD (1994) Determination of  $\beta$ -Lactam Residues in Milk Using Perfusive-Particle Liquid Chromatography Combined with Ultrasonic Nebulization Electrospray Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 66:3651-3658.
- Suhren G (2002) Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in Milch – rechtliche Grundlagen, Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme. In: Bundesanstalt für Milchforschung [Hrsg.] Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, Band 54, Th. Mann Verlag, Gelsenkirchen-Buer, S. 35-71.
- Suhren G (1996) Untersuchungen zum Einfluß von Rückständen von antimikrobiell wirksamen Substanzen in Milch auf kommerziell eingesetzte Starterkulturen in Modellversuchen. In: Bundesanstalt für Milchforschung [Hrsg.] Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, Th. Mann Verlag, Gelsenkirchen-Buer, S. 131-149.
- Suhren G, Beukers R (1998) Delvotest SP for detection of cloxacillin and sulfamethoxazole in milk: IDF interlaboratory study. *International Federation Dairy. J AOAC Int*, 81 (5):978-990.
- Suhren G, Heeschen W (1987) Detection of antibiotics in milk with a modified microbial receptor assay (Charm test II). *Milchwissenschaft*, 42 (8):493-496.
- Suhren G, Reichmuth J (1998) Nachweis von  $\beta$ -Lactamantibiotikarückständen in Milch - Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-Laktamtest. *dmz*, 14:674-682.
- Suhren G, Reichmuth J, Walte HG (1996) Detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk by Penzym-test. *Milchwissenschaft*, 51 (5):269-273.
- Suhren G, Hoffmeister A, Reichmuth J, Heeschen W (1990) Incidence of inhibitory substances in milk for consumption from various European countries. *Milchwissenschaft*, 45 (8):485-490.

- 
- Sullivan TJ (1993) Drug Allergy. In: Middleton E, Elliot CE [Hrsg.] Allergy, Bd. 2, Kap. 69, Mosby-Year Book, St.Louis, S. 1726-1746.
- Sulyma MG (1988) Penicillin-Allergie. In: Sulyma MG [Hrsg.] Asthma bronchiale von A bis Z - Lexikon der Pneumologie, Bd. 2, Medikon, München, S. 242.
- Suwanrumpha S, Freas RB (1989) Identification of metabolites of ampicillin using liquid chromatography / thermospray mass spectrometry and fast atom bombardment tandem mass spectrometry. Biomed Environ Mass Spectrom, 18 (11):983-994.
- Suwanrumpha S, Flory DA, Freas RB, Vestal ML (1988) Tandem mass spectrometric studies of the fragmentation of penicillins and their metabolites. Biomed Environ Mass Spectrom, 16:381-386.
- Taboada P, Mosquera V, Ruso JM, Jones MN, Sarmiento F (2000a) Interaction between Penicillins and Human Serum Albumin: A thermodynamic study of micellar-like clusters on a protein. LANGMUIR, 16 (3):934-938.
- Taboada P, Mosquera V, Ruso JM, Sarmiento F, Jones MN (2000b) Interaction between Penicillins and Human Serum Albumin: A Potential Study. Langmuir, 16:6795-6800.
- Täufel A , Ternes W, Tunger L, Zobel M (1998) Lebensmittel-Lexikon. 3. Aufl., Behrs Verlag, Hamburg, S. 711-712.
- Taguchi S, Yoshida S, Tanaka Y, Hori S (1999) Simple and rapid analysis of penicillins in milk by HPLC using multidimensional on-line clean-up and post-column photolysis with UV detection. J Food Hygienic Japan, 40 (5):375-381.
- Takeba K, Fujinuma K, Miyazaki T, Nakazawa H (1998) Simultaneous determination of beta-lactam antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography. J Chromatogr A, 812 (1-2):805-811.
- Tamime AY, Deeth HC (1980) Yoghurt: Technology and Biochemistry. J Food Protect, 43 (12):939-977.

- Tamime AY, Robinson RK (1999) *Yoghurt - Science and technology*. 2. Aufl., Woodhead Publishing, Cambridge, S. 1-10, 61, 406.
- Tarbin JA, Aldridge M, Shearer G (1996) Determination of incurred benzathine penicillin G in bovine muscle - comparison of methodologies and extraction solvents. In: Haagsma N, Ruiten A [Hrsg.] *Proceedings of the EuroResidue III: Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food*, University of Utrecht, NL, S. 938-942.
- Tarbin JA, Farrington WHH, Shearer G (1995) Determination of penicillins in animal tissues at trace residue concentrations Part I: Determination of benzylpenicillin in milk by reversed-phase liquid chromatography with solid phase extraction and liquid chromatographic fractionation clean-up. *Anal Chim Acta*, 318:95-101.
- Teply M, Cerminova N (1974) Untersuchungen zur Empfindlichkeit von Säureweckerkulturen in der Tschechoslowakei gegenüber verschiedenen Antibiotika. In: *International Dairy Federation [Hrsg.] XIX International Dairy Congress IE*, IDF, New Dehli, S. 466.
- Terada H, Asanoma M, Sakabe Y (1985) High-performance liquid chromatographic determination of penicillin G in animal tissues using an on-line pre-column concentration and purification system. *J Chromatogr*, 318:299-306.
- Teuber M, Meile L, Schwarz F (1999) Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76:115-137.
- Tipper DJ, Strominger JL (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 54:1133-1141.
- Tolle A (1982) Subclinical bovine coccal mastitis. A review. *Zentralbl Veterinarmed [B]*, 29 (5):329-358.
- Trace Biotech AG (2000) Produktinformation zur TRACE Flowcell, Mittelweg 7, D-38106 Braunschweig.
- Tramer J (1973) Yoghurt Cultures. *J Soc Dairy Technol*, 26 (1):16-21.

- 
- Tyczkowska KL, Voyksner RD, Straub RF, Aronson AL (1994) Simultaneous Multiresidue Analysis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Bovine Milk by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection and Confirmation by Electrospray Mass Spectrometry. *J AOAC Int*, 77 (5):1122-1131.
- Tyczkowska KL, Voyksner RD, Aronson AL (1989) Development of an analytical method for penicillin G in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet-visible detection and confirmation by mass spectrometric detection. *J Chromatogr* , 490:101-113.
- Tyler J, Wilson RC, Dowling P (1992) Treatment of Subclinical Mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 8 (1):17-28.
- Ungemach FR (2000) Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation. *Acta Vet Scand Suppl*, 93:89-97.
- Usleber E, Lorber M, Straka M, Terplan G, Märtlbauer E (1994) Enzyme Immunoassay for the Detection of Isoxazolyl Penicillin Antibiotics in Milk. *Analyst*, 119:2765-2768.
- Van Egmond HJ, Nouws JFM, van Lankveld-Dreissen WDM, Schilt R, Streutjens-van Neer EPM, Simons FGH (2000) Stability of antibiotics in meat during a simulated high temperature destruction process. In: Ruiter A, van Ginkel LA [Hrsg.] *Residues of veterinary drugs in food*. Bd. 1, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, S. 430-437.
- Van Krimpen PC, van Bennekom WP, Bult A (1987) Penicillins and Cephalosporins: Physicochemical properties and analysis in pharmaceutical and biological matrices. *Pharm Weekbl Sci Ed*, 9:1-23.
- Van Schepdael A, Hoogmartens J (2000) Capillary Electrophoresis of Antibiotics: Important Veterinary Drugs. In: Van Ginkel LA, Ruiter A [Hrsg.] *Residues of veterinary drugs in food*, Bd. 1, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, S. 122-130.

- Verdon E, Couedor P (1999) Multiresidue analytical method for the determination of eight penicillin-antibiotics in muscle by ion-pair reversed-phase HPLC. *J AOAC Int*, 82 (5):1083-1095.
- Verdon E, Couedor P (1998) Determination of isoxazolympenicillin residues in milk by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization. *J Chromatogr B*, 705:71-78.
- Verdon E, Couedor P (1996) Determination of ampicillin residues in milk by ion-pair reversed phase high performance liquid chromatography after precolumn derivatization. *J Pharm Biomed Anal*, 14:1201-1207.
- Verordnung (EG) Nr. 807/2001 der Kommission vom 25. April 2001 zur Änderung der Anhänge I, II und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs (ABl. L 118, 6-11).
- Verordnung (EG) Nr. 2597/97 des Rates vom 18. Dezember 1997 zur Festlegung ergänzender Vorschriften für die gemeinsame Marktorganisation für Milch und Milcherzeugnisse hinsichtlich Konsummilch (ABl. Nr. L351/13) zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 280/1998 der Kommission vom 03. Februar 1998 (ABl EG Nr. L028/3).
- Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festlegung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs (ABl EG Nr. L 244/1), zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 1520/2002 der Kommission vom 27. August 2002 (ABl EG Nr. L230/3-6).
- Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (Milch-Güteverordnung) vom 09.07.1980 (BGBl. I S. 878), zuletzt geändert am 25.06.2001 (BGBl. I S. 1215).
- Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (Milchverordnung) vom 24.04.1995 (BGBl. I S. 544), zuletzt geändert am 20.07.2000 (BGBl. I S. 1178).



- 
- Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch (Fleischhygiene-Verordnung) vom 29.06.2001, zuletzt geändert am 14.03.2002 (BGBl. I S. 1081).
- Verordnung über Milcherzeugnisse (Milcherzeugnisverordnung) vom 15.07.1970 (BGBl. I S. 1150), zuletzt geändert am 14.10.1999 (BGBl. I S. 2053).
- Villani F, Pepe O, Mauriello G, Salzano G, Moschetti G, Coppola S (1995) Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. Int J Food Microbiol , 25 (2):179-190.
- Voyksner RD, Tyczkowska KL, Aronson AL (1991) Development of analytical methods for some penicillins in bovine milk by ion-paired chromatography and confirmation by thermospray mass spectrometry. J Chromatogr , 567:389-404.
- Ward DJ, Somkuti GA (1995) Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. Appl Microbiol Biotechnol, 43 (2):330-335.
- Watkins JH, Buswell JF, Hutchinson I (1975) The treatment of clinical mastitis with a combination of ampicillin and cloxacillin. Vet Rec, 96 (13):289-290.
- Waxman DJ, Strominger JL (1983) Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. Annu Rev Biochem, 52:825-869.
- Wehr HM (1987) The incidence of antibiotics other than penicillin in producer raw and finished milk products. In: IAMFES [Hrsg.] 74th Annual Meeting of the International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, IAMFES, Anaheim.
- Weltzien HU, Padovan E (1998) Molecular features of penicillin allergy. J Invest Dermatol, 110 (3):203-206.
- Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW (1994) Euterkrankheiten. 2. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, S. 269.

Wicher K, Reisman RE, Arbesman CE (1969) Allergic reaction of penicillin present in milk. JAMA, 208 (1):143-145.

Wiese B, Martin K (1989) Basic extraction studies of benzylpenicillin and its determination by liquid chromatography with pre-column derivatisation. J Pharm Biomed Anal, 7 (1):67-78.

Wilson NW (1995) Antibiotic allergy in children. Adv Pediatr Infect Dis, 10:307-335.

Yaman O (1994) Isolation of penicillin G resistant strains of *S. thermophilus*. Doctoral Thesis, Middle East Technical University, Department of Food Engineering, Hacettepe Üniversitesi, Ankara. <http://www.metu.edu.tr/home/wwwfbe/thesis/theabs/fde94.htm>.

Yazicioglu A, Yilmaz N (1966) Untersuchungen über die Mikroflora von Joghurt und dessen antibakterielle Wirkung. Milchwissenschaft, 21:87-92.

Yvon M, Anglade P, Wal JM (1990) Identification of the binding sites of benzyl penicilloyl, the allergenic metabolite of penicillin, on the serum albumin molecule. FEBS Lett, 263 (2):237-240.

Zaadhoff KJ, Märklbauer E, Vorreiter A, Schweizer L (1997) Zur Eignung kommerzieller mikrobiologischer Hemmstofftests als Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis. Archiv für Lebensmittelhygiene, 48:127-144.

Zomer E, Quintana J, Saul S, Charm SE (1995) LC-Receptogram: A Method for Identification and Quantitation of  $\beta$ -Lactams in Milk by Liquid Chromatography with Microbial Receptor Assay. J AOAC Int, 78 (5):1165-1172.

## 7 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Strukturformel von 6-Aminopenicillansäure (6-APA)</i>	4
<i>Abbildung 2: Strukturformeln der Seitenkette monobasischer und amphoterer Penicilline</i>	4
<i>Abbildung 3: Strukturformeln der Seitenkette von Isoxazolylpenicillinen</i>	5
<i>Abbildung 4: Abbaureaktion durch nucleophilen Angriff [Hou und Poole, 1971; van Krimpen et al., 1987]</i>	6
<i>Abbildung 5: Abbaureaktion im sauren Medium durch elektrophile Substitution [Degelaen et al., 1979; Hou und Poole, 1971; van Krimpen et al., 1987]</i>	7
<i>Abbildung 6: Zellwand eines Gram-positiven Bakteriums [Abbildung entnommen aus: Delcour et al., 1999]</i>	8
<i>Abbildung 7: Vergleich des Modells des Penicillins mit dem D-Alanyl-D-Alanin-Teil des Pentapeptidstranges</i>	9
<i>Abbildung 8: <math>\beta</math>-Lactamantibiotika in der Mureinbiosynthese [Abbildung modifiziert nach Cacciatore und Petz, 2002]</i>	10
<i>Abbildung 9: Beispiele möglicher Proteinbindungen von Penicillinen [Dewdney und Edwards, 1984; Idsoe et al., 1969; Juhlin et al., 1977; Schwartz, 1969]</i>	14
<i>Abbildung 10: Dimerisation von Benzylpenicillin</i>	15
<i>Abbildung 11: Chemische Struktur eines Ampicillin-Polymers</i>	15
<i>Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Joghurtkulturen [Abbildung entnommen aus: Ramesh und Chandan, 1989]</i>	26
<i>Abbildung 13: Verlauf der Joghurtfermentation [Davis et al., 1971; Dreissen et al., 1983; Groß, 1990; Spreer, 1995]</i>	27
<i>Abbildung 14: Prozess einer Joghurtproduktion (Literatur siehe Text)</i>	28
<i>Abbildung 15: Eliminationskinetik von Cloxacillin (nach Werten der Kuh 1)</i>	37
<i>Abbildung 16: Vergleich des Cloxacillingehaltes der Milch von kranken mit gesunden Tieren (Ergebnisse der HPLC-Analyse)</i>	38
<i>Abbildung 17: Messzelle des elektrochemischen Detektors [entnommen aus: TRACE-Biotech, 2000]</i>	40
<i>Abbildung 18: Vergleich der Elektrodenmaterialien der elektrochemischen Messzelle für die Isoxazolylpenicilline über einen Potentialbereich von 100-1.000 mV nach Bestrahlung (jeweils 2 <math>\mu</math>g/ml)</i>	41

---

<i>Abbildung 19: Abhängigkeit der Signalstärke der Isoxazolylpenicilline vom Potential für die Goldelektrode über einen Potentialbereich von 100-750mV nach Bestrahlung (jeweils 2 µg/ml)</i>	42
<i>Abbildung 20: Abhängigkeit der Signalstärke von Penicillin G, Penicillin V und Nafcillin vom Potential für die Goldelektrode über einen Potentialbereich von 100-1.000 mV nach Bestrahlung</i>	43
<i>Abbildung 21: Chromatogramm der Penicillinstandards (100 ng/ml entsprechen 100 µg/kg in einer Probe mit Matrix) nach photochemischer Reaktion durch Detektion bei 600 mV an der Goldelektrode</i>	43
<i>Abbildung 22: Chromatogramm der Penicilline in Milch (30 µg/kg) im Vergleich zum Chromatogramm der Milchblindprobe nach photochemischer Reaktion durch Detektion bei 600 mV an der Goldelektrode</i>	44
<i>Abbildung 23: Auftragung der Abhängigkeit der Signalstärke der photochemisch derivatisierten Penicilline von der Wellenlänge (DAD)</i>	47
<i>Abbildung 24: Quotient aus Signalfläche und Konzentration gegen die Konzentration für die Messungen der Nafcillin-Milchproben</i>	49
<i>Abbildung 25: Quotient aus Signalfläche und Konzentration gegen die Konzentration für die Messungen der Flucloxacillin-Milchproben</i>	49
<i>Abbildung 26: HPLC-Chromatogramm für einen Milchblank und einer mit 30 µg/kg dotierten Probe von Oxacillin, Cloxacillin, Nafcillin und Dicloxacillin</i>	52
<i>Abbildung 27: Ergebnis der Analyse „verdeckter“ Proben für Nafcillin (Proben 1-12) und Flucloxacillin (Proben 13-14)</i>	54
<i>Abbildung 28: Vergleich der Chromatogramme von Flucloxacillin und Cloxacillin in Kuhmilch- und Humanmilch-Proben</i>	55
<i>Abbildung 29: Protektiver Effekt der Milchmatrix am Beispiel von Nafcillin</i>	57
<i>Abbildung 30: Antimikrobieller Effekt von steigenden Penicillinkonzentrationen auf die Starterkulturen gemessen als pH-Wert nach der Fermentation</i>	58
<i>Abbildung 31: Stabilität von Cloxacillin (30 µg/kg und 60 µg/kg) in Milch mit und ohne Zusatz von Starterkulturen</i>	61
<i>Abbildung 32: Stabilität von Penicillin G (2 µg/kg und 4 µg/kg) in Milch mit und ohne Zusatz von Starterkulturen</i>	62
<i>Abbildung 33: Stabilität der Penicilline (30 µg/kg) bei pH 5,9 (wässrige Lösung) bzw. pH 4,5 (milchsaure Lösung), bei 43°C und Raumtemperatur</i>	63

---

---

<i>Abbildung 34: Wiederfindung von Cloxacillin (HPLC) und Penicillin G (Charm® II) in Milchproben nach Präzipitation der Proteine</i>	64
<i>Abbildung 35: Mittels LC-MS identifizierte Produkte von Penicillin G und Cloxacillin im sauren Medium</i>	66
<i>Abbildung 36: Fragmentierung von Penicillin G</i>	67
<i>Abbildung 37: Fragmentierung von Penillosäure</i>	67
<i>Abbildung 38: Fragmentierung von Penicillosäure</i>	68
<i>Abbildung 39: Fragmentierung von Penillsäure</i>	68
<i>Abbildung 40: Vergleich der LC-MS/MS Werte von Penicillin G und Penillsäure in Wasser und Milch bei verschiedenen pH-Werten</i>	69
<i>Abbildung 41: Indirekter ELISA [Abbildung entnommen aus: Schlösser, 2000]</i>	72
<i>Abbildung 42: Standardkurven für die Penicilline und Penicilloyderivate</i>	73
<i>Abbildung 43: Kalibriergerade für Joghurt mit Cloxacillin für den Charm® II Sequential Assay nach der Kiel-Methode</i>	108
<i>Abbildung 44: Kalibriergerade für Milch mit Cloxacillin für den Charm® II Competitive Assay nach der Kiel-Methode</i>	109
<i>Abbildung 45: Quantifizierung von Cloxacillin mittels kompetitivem Assay vor und nach Erhitzung für 15 Minuten auf 90 °C</i>	110
<i>Abbildung 46: Kalibriergerade für Joghurt mit Penicillin G für den Charm® II Sequential Assay nach der Kiel-Methode</i>	111
<i>Abbildung 47: Säuerungsverlauf der Starterkultur YC-180 (Chr. Hansen) unter den gewählten Laborbedingungen</i>	112

## 8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Höchstmengen für Penicillinrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs (MRL-Wert in µg/kg)</i>	23
<i>Tabelle 2: Ausgewählte Literatur zum Einfluss von Benzylpenicillin auf Starterkulturen</i>	29
<i>Tabelle 3: Infektionsart der behandelten Kühe</i>	33
<i>Tabelle 4: Ergebnis des BR AS spezial<sup>®</sup> Screening-Verfahrens</i>	34
<i>Tabelle 5: Ergebnis des Delvotest SP<sup>®</sup> Screening-Verfahrens</i>	35
<i>Tabelle 6: Ergebnis des Penzym S<sup>®</sup> Test Screening-Verfahrens</i>	35
<i>Tabelle 7: Ergebnis des Snap<sup>®</sup> Test Screening-Verfahrens</i>	35
<i>Tabelle 8: Ergebnis der HPLC-Bestimmung (Cloxacillin in µg/kg)</i>	36
<i>Tabelle 9: Ergebnisse der Wiederfindung (n=4) mit Angabe des Variationskoeffizienten (VK) für Nafcillin</i>	50
<i>Tabelle 10: Ergebnisse der Wiederfindung (n=4) mit Angabe des Variationskoeffizienten (VK) für Flucloxacillin</i>	50
<i>Tabelle 11: Ergebnisse der Nachweisgrenze (n=12) für Nafcillin</i>	51
<i>Tabelle 12: Ergebnisse der Nachweisgrenze (n=12) für Flucloxacillin</i>	51
<i>Tabelle 13: Ergebnisse der Analyse „verdeckter Proben“ für Oxacillin, Cloxacillin, Nafcillin, Dicloxacillin und Flucloxacillin in H-Milch (in µg/kg)</i>	53
<i>Tabelle 14: Stabilität der Penicilline für 15 Minuten bei 90°C in wässriger Lösung und in Milch</i>	57
<i>Tabelle 15: Überblick über die untersuchten Proben (ohne penicillinfreie Vergleiche)</i>	60
<i>Tabelle 16: ELISA- und Charm<sup>®</sup> II-Testergebnisse zur Bindung von Penicillin G und Cloxacillin an Milchproteine in % der ursprünglich eingesetzten Menge Penicillin</i>	75
<i>Tabelle 17: ELISA- und Charm<sup>®</sup> II-Testergebnisse zur Bindung von Penicillin G und Cloxacillin an Milchproteine bezogen auf die Masse an Milch bzw. Casein</i>	75
<i>Tabelle 18: Zusammenfassung der ermittelten Verfahrenskennndaten</i>	83
<i>Tabelle 19: Überblick über die Stabilität der untersuchten Cloxacillin-Proben</i>	88
<i>Tabelle 20: Überblick über die Stabilität der untersuchten Penicillin G-Proben</i>	89
<i>Tabelle 21: Bindung von Penicillinen an Blutplasma des Menschen und der Kuh im Vergleich zu den ermittelten Bindungen in der Milch</i>	93

---

## 9 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Amox	Amoxicillin
Amp	Ampicillin
APA	Aminopenicillansäure
API	Atmospheric Pressure Ionisation
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CE	Kapillarelektrophorese
Clox	Cloxacillin
cpm	counts per minute
Da	Dalton
DAD	Photodioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
Dclx	Dicloxacillin
DD-CPase	DD-Carboxypeptidase
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
ECD	Elektrochemischer Detektor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray Ionisation
et al.	et alii
etc.	et cetera
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FAB	Fast Atom Bombardment
FAO	Food and Agriculture Organization
FEDESA	European Federation of Animal Health
FIA	Fluoreszenzimmunoassay
Flucx	Flucloxacillin
g	Gramm

---

GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
incl.	inclusive
Ig	Immunglobulin
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
kg	Kilogramm
l	Liter
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
Met	Methicillin
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
mind.	mindestens
Mio.	Million
ml	Milliliter
Mrd.	Milliarde
MRL	Maximum Residue Limit
MS	Mass Spectrometry, Massenspektrometrie
Naf	Nafcillin
NAG	N-Acetylglucosamin
NAM	N-Acetylmuraminsäure
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
NPD	Stickstoff-Phosphor-Detektor
NWG	Nachweisgrenze
Oxa	Oxacillin
PBP	penicillinbindendes Protein
PBS	Phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
Pen G	Benzylpenicillin, Penicillin G
Pen V	Phenoxymethylpenicillin, Penicillin V



---

PP	Polypropylen
RAM	Restricted Access Material
RIA	Radio Immuno Assay
RP	Reversed Phase, Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SPE	Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
subsp.	Subspecies
TCA	Trichloressigsäure
t	Tonne
u	unit
u.a.	unter anderem
u.a.m.	und anderes mehr
UF	Ultrafiltration
UHT	Ultra High Temperature, Ultrahoherhitzung
UV	Ultraviolett
VK	Variationskoeffizient
VO	Verordnung
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel