



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

Vienna University of Technology

DIPLOMARBEIT

Etablierung von HPLC-MS/MS-Methoden zur Bestimmung von Amphenicolen in Milch und Milchprodukten

Ausgeführt am Institut für

Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Techn. Biowissenschaften

der Technischen Universität Wien

unter der Anleitung von

Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Gerhard Kroyer

durch

Adine Anna Hutter

Bergen 115

A-7537 Neuberg

Neuberg, Oktober 2014

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Gerhard Kroyer bedanken, der mich während meiner Diplomarbeit betreut und umfangreich unterstützt hat.

Weiterhin danke ich der Firma LVA GmbH, insbesondere der Geschäftsführung (Dr. Michael Gartner, Dr. János Gombos und Mag. Bernhard Gartner), Laborleiterin und Entwicklungsleiterin Rückstandsanalytik Dr. Céline Lesueur und allen Mitarbeitern für die Ermöglichung meiner Diplomarbeit, für die gute Zusammenarbeit und für die tatkräftige Unterstützung.

Ein weiterer Dank geht an meine Eltern, die mich nicht nur finanziell, sondern auch immer unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten, der mir immer zur Seite stand und mir bei Zweifeln und in schwierigen Phasen mit positivem Denken weiterhalf.

Abschließend ein Dankeschön an meine Familie, meine Freunde und meine Studienkollegen für die liebevolle Unterstützung, den Rückhalt und den Zuspruch.

Zusammenfassung

Amphenicole sind Breitbandantibiotika, deren Einsatz für die Tierzucht durch die Europäische Union geregelt und die Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 festgelegt sind. Chloramphenicol ist verboten und Florfenicol, Florfenicolamin sowie Thiamphenicol unterliegen einem vorgeschriebenen Grenzwert. Jedoch ist die Anwendung von Florfenicol und Florfenicolamin nicht gestattet, wenn die Milch für den menschlichen Verzehr vorgesehen ist.

In dieser Diplomarbeit wurde eine Methode auf Grundlage der Normmethode BVL L 06.00-60 - Bestimmung von Amphenicol-Rückständen in Muskel und Milch (HPLC-MS/MS-Verfahren) - für die Routineanalytik für Milch und Milchprodukte etabliert. Da jedoch diese Methode sehr zeitaufwändig ist, wurde noch eine Schnellmethode entwickelt. Als Bestimmungsgrenze wurde für Chloramphenicol, Florfenicol und Florfenicolamin $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ und für Thiamphenicol $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ angestrebt und auch erreicht. Für Florfenicolamin konnte jedoch diese Empfindlichkeit nicht erreicht werden.

Bei der etablierten Methode wird die Probe nach Zugabe der isotoopenmarkierten Amphenicol-Standards und einem Enzym hydrolysiert, mit Ethylacetat extrahiert und zentrifugiert. Die obere Phase wird entnommen und am Rotavapor bis zur Trockene abrotiert. Der Rückstand wird entfettet und mit mobiler Phase extrahiert. Die wässrige Phase wird membranfiltriert und der Messung mittels HPLC-MS/MS zugeführt. Bei der Schnellmethode werden der Probe die isotoopenmarkierten Amphenicol-Standards und ein Enzym zugesetzt, hydrolysiert, zentrifugiert, membranfiltriert und mittels HPLC-MS/MS gemessen. Der Nachteil der Schnellmethode liegt darin, dass das Enzym die HPLC-Säule sehr schnell belegt.

Die in dieser Diplomarbeit etablierte Methode hat den Vorteil, dass durch die Verkürzung der Laufzeit doppelt so viele Proben analysiert werden können. Die Wiederfindungsraten für die Methode wurden anhand der Validierung ermittelt. Für Chloramphenicol liegt die Wiederfindungsrate zwischen 85.6% und 90.0% , für Florfenicol zwischen 90.1% und 93.6% und für Thiamphenicol zwischen 91.1% und 93.9% . Die Methode ist akkreditiert und es wurde bereits bei einem internationalen Ringversuch für die Bestimmung von Chloramphenicol in Milch teilgenommen, der positiv absolviert wurde. Vorausschauend ist zu sagen, dass die Methode mit anderen Matrices erweitert und Florfenicolamin bei Vorliegen höherer Rückstandshöchstmengen mit analysiert werden kann.

Summary

Amphenicols are broad-spectrum antibiotics. In animal breeding, their use is regulated by the European Union and the maximum residue limits (MRL) in foodstuffs of animal origin are defined in the Commission Regulation (EU) No 37/2010. Chloramphenicol is banned. Florfenicol, florfenicol amine and thiamphenicol are subject to a legally defined limit. However, if the milk is provided for human consumption the administration of florfenicol and florfenicol amine are not allowed.

In this diploma thesis a method based on the standard method BVL L 06.00-60 - Determination of amphenicols residues in muscle and milk (HPLC-MS/MS-method) - for the routine analysis for milk and milk products should be established. The standard method is time-consuming and so a rapid method has also been developed. The target determination limits of 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for chloramphenicol, florfenicol and florfenicol amine and of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for thiamphenicol were aimed for and could be reached. Only the sensitivity of the determination of florfenicol amine could not be achieved.

In the established method the sample is hydrolysed after addition of the isotope-labeled amphenicol-standards and an enzyme. After the extraction with ethyl acetate the sample is centrifuged. The upper phase is removed and is evaporated to dryness in a rotary evaporator. The residuum is defatted and extracted with a mobile phase. The aqueous phase is filtered through a membrane and analysed by HPLC-MS/MS. A rapid method was established whereby the isotope-labeled amphenicol-standards and an enzyme are added to the sample which subsequently was hydrolyzed, centrifuged, filtered through a membrane and analysed by HPLC-MS/MS. The disadvantage of the rapid method is that the HPLC-column gets blocked by the enzyme more quickly.

The method developed in this diploma thesis has the advantage that due to the reduced analysis run-time the amount of samples can be doubled. For this method the recoveries were determined using the validation. For chloramphenicol the recovery is between 85.6 % and 90.0 %, for florfenicol between 90.1 % and 93.6 % and for thiamphenicol between 91.1 % and 93.9 %. The method is accredited and an international interlaboratory test for the analysis of chloramphenicol in milk was concluded positively. In the future the method can be extended with other matrices. If the MRL is higher, florfenicol amine can be analysed as well.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Literaturstudien	1
1.1	Entdeckung der Antibiotika	1
1.2	Einteilung der Antibiotika	3
1.2.1	Wirkungstyp	3
1.2.2	Wirkungsspektrum	4
1.2.3	Wirkmechanismen der Antibiotika	4
1.2.3.1	Proteinsynthese	5
1.3	Resistenz	7
1.4	Amphenicole	8
1.4.1	Chloramphenicol (CAP)	9
1.4.2	Thiamphenicol (TAP)	10
1.4.3	Florfenicol (FAP) und Florfenicolamin (FAPA)	10
1.5	Gesetzliche Grundlagen	11
1.6	Analysemethoden	13
1.7	Messmethoden	15
1.7.1	HPLC-MS/MS	16
1.8	Optimierung der HPLC-MS/MS für die Methode	17
1.8.1	Scan	18
1.8.2	Produkt-Ion mit der dazugehörigen Kollisionsenergie (Collision Energy, CE)	18
1.8.3	Beschleunigungsspannung der Kollisionszelle (Collision Cell Accelerator Voltage, CAV)	18
1.8.4	Retentionszeit, Quantifier und Qualifier	19
2	Problemstellung	20
3	Materialien und Geräte	21
3.1	Standards	21
3.2	Isotopenmarkierte Standards	22
3.3	Chemikalien	23
3.4	Lösungen	25
3.5	Hilfsmaterialien	25

3.6	Geräte	27
3.7	Lebensmittel	28
4	Ergebnisse der Methodik-Etablierung	30
4.1	Optimierung der Standardsubstanzen und der isotopenmarkierten Standardsubstanzen	30
4.1.1	Scan	30
4.1.2	Produkt-Ion mit der dazugehörigen Kollisionsenergie („Collision Energy“, CE)	31
4.1.3	Beschleunigungsspannung der Kollisionszelle (Collision Cell Accelerator Voltage, CAV)	33
4.1.4	Retentionszeit, Quantifier und Qualifier	34
4.2	Etablierung der Methode zur Bestimmung von Amphenicolen in Milch und Milchprodukten	35
4.2.1	Abweichungen zur Norm BVL L 06.00-60	35
4.2.2	Versuche ohne isotopenmarkierte Standards	36
4.2.3	Versuche mit zwei isotopenmarkierten Standards	36
4.2.4	Aufarbeitung von Milchproben mit zwei isotopenmarkierten Standards	37
4.2.5	Aufarbeitung von Milchprodukten mit der Methode in Anlehnung an die Norm	37
4.2.6	Austattung von Membranmaterial der Whatman TM Mini- UniPrep TM Vial	37
4.2.7	Probleme mit Chloramphenicol	38
4.2.8	Herstellung der Kalibrierlösung	38
4.2.9	FAP und FAPA	38
4.2.10	Einsparung von Abrotieren	39
4.2.11	Analyse direkt nach der Hydrolyse - Schnellmethode	39
4.2.12	Bestimmung von Florfenicolamin in Proben	40
4.3	Analysebedingungen	40
4.4	Durchführung	42
4.4.1	Standardserie	42
4.4.1.1	Stammlösungen der Standardsubstanzen (1000 mg/l)	42
4.4.1.2	Stammlösungen der isotopenmarkierten Standardsubstanzen (1000 mg/l beziehungsweise 100 mg/l)	42
4.4.1.3	Isotopenmarkierte Standardsubstanzen (ISTD-Mischstandard)	42
4.4.1.4	ISTD-Lösung für die Proben	43
4.4.1.5	Mischstandards	43

4.4.1.6	Kalibrierstandards	43
4.4.2	Probenahme für beide Methoden	46
4.4.3	Probenaufarbeitung in Anlehnung an die Norm BVL L 06.00-60	46
4.4.3.1	Hydrolyse	46
4.4.3.2	Extraktion	46
4.4.4	Probenaufarbeitung nach der Schnellmethode	47
4.5	Methodenvalidierung	47
4.5.1	Ergebnisse aus der Validierung in Anlehnung an die Norm	50
4.5.2	Ergebnisse aus der Validierung nach der Schnellmethode:	56
4.5.3	Ermittlung der Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze über die Kalibrierfunktion für die Methode in Anlehnung an die Norm	63
4.6	Methodenvergleich	64
4.6.1	Vergleich der Methode in Anlehnung an die Norm mit der Schnellmethode	64
4.6.2	Vergleich der Methode in Anlehnung an die Norm mit der Norm BVL L 06.00-60	65
4.7	Ringversuch und Akkreditierungsstatus	65
5	Diskussion	66
	Literaturverzeichnis	70
	Abbildungsverzeichnis	73
	Tabellenverzeichnis	74
	Abkürzungsverzeichnis	75

1 Einleitung und Literaturstudien

Das aus dem Griechischen stammende Wort Antibiotika besteht aus zwei Teilen anti (=gegen) und biotikos (=zum Leben gehörig) und wurde 1942 von Selman Abraham Waksman geprägt. In einer Publikation 1956 definierte er diesen Begriff als eine durch Mikroorganismen produzierte chemische Verbindung, die die Fähigkeit besitzt, in verdünnter Lösung das Wachstum anderer Mikroorganismen zu hemmen oder zu unterbinden [1]. Im Allgemeinen werden darunter Substanzen biologischen Ursprungs mit antibakterieller Wirkung verstanden [2].

Antibiotika sind daher Stoffe, die entweder von Pilzen beziehungsweise Bakterien stammen oder synthetisch hergestellt werden [3]. Dabei handelt es sich um sogenannte Sekundärmetaboliten, das heißt Stoffe, die der erzeugende Mikroorganismus selber nicht für lebensnotwendige Prozesse braucht [4]. Heutzutage ist die Funktion dieser Stoffe für den Produzenten noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt mehrere Theorien zur Bedeutung der Antibiotika. Zum einen wird vermutet, dass diese gegen Nahrungskonkurrenten biologische Kampfstoffe sind. Zum anderen spielen Sekundärstoffe, zum Beispiel bei der mikrobiellen Kommunikation, als Signalstoffe eine bedeutende Rolle [2].

Antibiotika können als Arzneimittel oder auch als Zusatz zu Futtermittel eingesetzt werden. Arzneimittel sind im Arzneimittelgesetz (AMG, BGBl. Nr. 185/1983) genau definiert. Wenn Arzneimittel in der Tierhaltung oder als Zusatz zu Futtermittel verwendet werden, können somit Rückstände von den gezielt und bewusst eingesetzten Stoff in tierischen Lebensmitteln enthalten sein. Jedoch darf ein Rückstand nicht mit einer Kontamination verwechselt werden. Stoffe, die ungewollt und unbewusst im Lebensmittel vorkommen, werden als Kontamination bezeichnet [5, 6, 7].

1.1 Entdeckung der Antibiotika

Als Bakterien auf Nährböden gezüchtet werden konnte, wurde manchmal ein Hof um die Kolonie beobachtet. 1929 wies Alexander Fleming nach, dass dieser Effekt zustande kommt, weil der Schimmelpilz *Penicillium notatum* eine Substanz bildet, die gegen grampositive Bakterien wirkt und benannte diese Penicillin. Da das Penicillin wenig beständig war und auch die Extraktionsversuche scheiterten, wurde diese Entdeckung lange Zeit missachtet [8].

1935 entdeckte Gerhard Domagk im Rahmen eines Forschungsprogrammes über die therapeutische Anwendung von Farbstoffen, dass der Farbstoff Prontosil rubrum bei bakteriellen Infektionen von Tieren Wirkung zeigte. Später stellte sich heraus, dass der wirksame Bestandteil dieses Farbstoffes die Sulfonamidgruppe gehört und somit im Körper zu Sulfanilamid abgebaut wird und dadurch eine antibakterielle Eigenschaft besitzt. Aus diesem Grund wurde nach weiteren Sulfonamiden gesucht, die dann als Medikamente sehr erfolgreich wurden [8].

Als die Suche nach anderen Antibiotika begann, entschlossen sich Howard Walter Florey und Ernst Boris Chain das Penicillin noch einmal zu untersuchen. 1940 schafften sie es, diesen unreinen, aber hochaktiven Feststoff zu isolieren. 1941 wurde vielleicht das größte Forschungsprojekt - an dem 39 Laboratorien in Großbritannien und den Vereinigten Staaten teilnahmen - gestartet, um Penicillin für den medizinischen Gebrauch zu produzieren. Durch die industrielle Herstellung des Penicillins und durch die Entdeckung anderer Antibiotika ging das Interesse an neuen synthetischen Antibiotika (Sulfonamide) verloren [8].

Selman Abraham Waksman suchte Antibiotika in Schimmelpilzen. Dabei stellte Streptomycin seinen erster Erfolg dar. Viele weitere folgten und auch sein „Screening“- Verfahren wurde nachgeahmt [8].

Durch viele Forschungsarbeiten wurden somit circa 2000 Antibiotika namentlich in einem Zeitraum von ungefähr 20 Jahren registriert, wobei nur etwa 50 für klinische Zwecke angewendet wurden. Da nun die wichtigsten Infektionen bekämpft werden konnte, ging die Forschung nach weiteren Antibiotika zwar zurück, aber die chemische Veränderung von natürlich vorkommenden Antibiotika bekam eine wichtige Bedeutung [8].

Jedoch wird heutzutage festgestellt, dass seit Ende der 1960er Jahren die Antibiotikaentdeckung und -entwicklung kaum neue Wirkstoffe vorgebracht hat und somit eine Innovationslücke aufgetreten ist (siehe Abbildung 1.1) Derzeit werden ungefähr 70% der Antibiotika, die aus Mikroorganismen und deren Derivaten hergestellt werden, in der Pharmaindustrie verwendet [2].

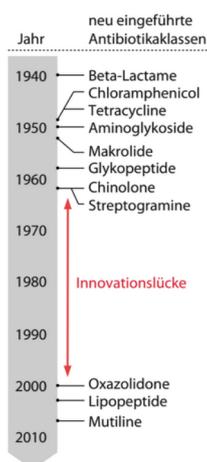


Abbildung 1.1: Entdeckung der Antibiotika in zeitlicher Abfolge

1.2 Einteilung der Antibiotika

Antibiotika können entweder nach Wirkungstyp, Wirkungsspektrum oder Wirkmechanismus unterteilt werden.

1.2.1 Wirkungstyp

Wenn nach dem Wirkungstyp unterschieden wird, gibt es zwei verschiedene Arten [3, 9, 10]:

- Bei den bakteriostatisch wirkenden Substanzen, den sogenannten **Bakteriostatika**, wird die Keimvermehrung gehemmt, aber nicht abgetötet. Damit ist gemeint, dass das Wachstum der Mikroorganismen bei Vorhandensein dieser Substanzen angehalten wird und die Mikroorganismen bei Abwesenheit dieser Substanz weiter wachsen können. Diese Mikroorganismen müssen daher durch körpereigene Abwehrmechanismen entfernt werden. Beispielsweise greifen Bakteriostatika in die Proteinsynthese ein.
- Demgegenüber haben bei den bakterizid wirkenden Stoffen, den sogenannten **Bakteriziden**, oftmals die Keimzerstörung zur Folge. Das heißt, dass diese Substanzen die Bakterien abtöten. Beispielsweise wird hier die Bildung der Zellwand beeinflusst.

In der Tabelle 1.1 ist die Einteilung der Antibiotika nach dem Wirkungstyp aufgelistet [9].

Tabelle 1.1: Einteilung nach dem Wirkungstyp

Bakteriostatische Wirkung	Bakterizide Wirkung
Sulfonamide	Gyrasehemmer
Trimethoprim	β -Lactam-Antibiotika
Tetracycline	Aminoglykosid-Antibiotika
Chloramphenicol	Polypeptid-Antibiotika
(ältere) Makrolide	Glykopeptid-Antibiotika

1.2.2 Wirkungsspektrum

Welche Erregerart behandelt werden kann, gibt das Wirkungsspektrum an.

Ein **Breitband-Antibiotikum** wirkt gegen verschiedene, nicht verwandte Gruppen von Mikro- und eventuell auch Makroorganismen. Beispielsweise hemmt Chloramphenicol oder auch Tetracycline grampositive und gramnegative Bakterien. Die tumorwirksamen Antibiotika (z.B.: Actinomycine) unterdrücken die Zellenentwicklung der Makroorganismen [1, 3].

Ein **Schmalband-Antibiotikum** hemmt hingegen verhältnismäßig wenige, eher nahe verwandte Gruppen von Mikroorganismen. Demnach ist zum Beispiel Griseofulvin wirksam gegen Fadenpilze, ohne gleichzeitig das Wachstum von Hefen zu unterbinden [1].

Weiters gibt es auch noch **Mittelband-Antibiotika**, welche gegen eine begrenzte Gruppe von Keimen wirksam sind. Zu dieser Gruppe zählen die meisten Penicilline, die Makrolid- und Polypeptid-Antibiotika [1].

Generell ist darauf zu achten, dass die Wirkstoffe mit einem schmalen Spektrum gegenüber einem breiten Spektrum bevorzugt werden sollen [3].

1.2.3 Wirkmechanismen der Antibiotika

Werden die Antibiotika nach dem Wirkmechanismus unterschieden, dann gibt es dafür vier verschiedene Möglichkeiten, wo ein Antibiotikum angreifen kann [9, 11, 12]:

- **Unterdrückung der Zellwandsynthese:**

Die Zellwand ist für das Bakterium eine Stabilität gegenüber Einflüssen von außen und wird nur bei der Vermehrung aufgebaut. Demnach wirken diese Antibiotika nur im Vermehrungsstadium der Keime. Zum Beispiel: β -Lactam-Antibiotika, Glykopeptid-Antibiotika.

- **Störung der selektiven Permeabilität der Zellmembran:**

Für die Wirkung dieser Arzneimittel ist keine Vermehrung erforderlich. Zum Beispiel: Polypeptid-Antibiotika, Polyen-Antibiotika.

- **Hemmung der Synthese von Protein:**

Hierfür ist ebenso keine Vermehrung notwendig, jedoch ein aktiver Stoffwechsel. Die Wirkung der Antibiotika wird aber bei der Vermehrung gesteigert. Zum Beispiel: Amphenicole, Makrolide, Aminoglykosid-Antibiotika, Tetracycline.

- **Blockade der Nucleinsäuresynthese beziehungsweise des Nucleinsäurestoffwechsels:**

Zum Beispiel: Sulfonamide, Gyrasehemmer.

1.2.3.1 Proteinsynthese

Viele Antibiotika, darunter auch die Amphenicole, hemmen die Proteinsynthese bei Bakterien. Der geringe Unterschied zwischen der Proteinsynthese von Prokaryonten und Eukaryonten reicht aus, dass die der Eukaryonten nicht angegriffen werden [13].

Das Erbgut ist in der DNA gespeichert, wo der genetische Code enthalten ist. Dieser Code auf der DNA besteht aus einer Abfolge von vier Nucleinsäuren (Basen): Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T). In der RNA wird Thymin durch Uracil (U) ersetzt. Je drei dieser Basen (Basentriplett) codieren ein Codon für eine Aminosäure. Jedoch können mehrere bis maximal sechs Codons für eine Aminosäure stehen, wobei AUG ein Initiationscodon (Start-Codon) und UAA, UAG beziehungsweise UGA je ein Terminationscodon (Stopp-Codon) ist [14].

Um ein Protein zu synthetisieren, wird dieser Code auf einen RNA-Strang, die mRNA, kopiert. Diese mRNA wandert zum Ribosom, wo dann die Proteinsynthese stattfindet [14].

Ein Ribosom ist ein Mischkomplex und besteht aus circa einem Drittel Protein und zwei Drittel RNA. Es setzt sich aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten zusammen. Die kleine Untereinheit erkennt die mRNA, währenddessen die größere Untereinheit die Aminosäuren zu einer Peptidkette verknüpft [14]. Wenn sich beide Untereinheiten zusammenlagern, bleibt ein kleiner Spalt, wo die mRNA durchläuft und somit abgelesen werden kann, siehe dazu Abbildung 1.2 (links). Der Unterschied zwischen einem Bakterienribosom und einem Eukaryontenribosom ist, dass die der Eukaryonten größer und komplizierter gebaut sind. Dies ist in Abbildung 1.2 (rechts) zu sehen [13]. Ribosomen werden nicht nach der Masse und ihrer Zusammensetzung,

sondern in übereinstimmenden Sedimentationskoeffizienten angegeben. Damit hat das Ribosom von Bakterien einen Sedimentationskoeffizienten von 70 Svedberg (70S) mit den Untereinheiten von 30S und 50S. Ein Ribosom von Eukaryonten hat 80S mit den Untereinheiten von 40S und 60S [15].

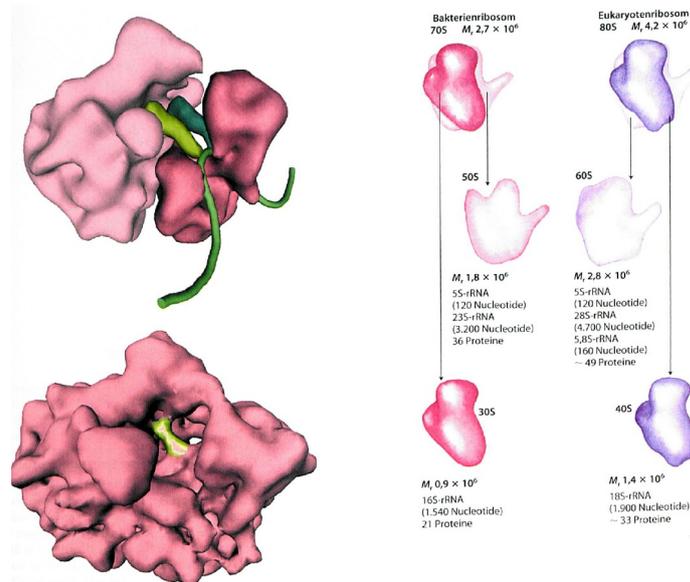


Abbildung 1.2: Ribosom

Die Proteinsynthese ist in fünf Phasen aufgebaut, wobei die Initiation, die Elongation und die Termination gemeinsam als Translation bezeichnet wird [13]:

1. Aktivierung der Aminosäuren

Um die Peptidbindung zu erleichtern, wird zuerst die Carboxylgruppe jeder Aminosäure aktiviert. Weiters muss eine Verbindung zwischen jeder neuen Aminosäure und der Information in der mRNA hergestellt werden. Diese zwei Anforderungen tragen bei, dass die tRNA mit der richtigen Aminosäure beladen wird. Die Aminoacyl-tRNA-Synthetase, ein Mg^{2+} -abhängiges Enzym, ist dafür verantwortlich, dass durch die Energie von ATP jede der 20 Aminosäuren mit einer ganz bestimmten tRNA verknüpft wird. Dieser Vorgang findet im Cytosol statt.

2. Initiation

Die mRNA mit der Information für das herzustellende Protein bindet an die kleinere Ribosomenuntereinheit und an die erste Aminoacyl-tRNA. Der Initiationskomplex entsteht durch Bindung der großen Ribosomenuntereinheit. Unter Verbrauch von GTP geht die Aminoacyl-tRNA mit dem Initiationscodon in der mRNA Basenpaarungen ein.

3. Elongation

Nacheinander werden die Aminosäuren durch die Aminoacyl-tRNA und GTP-Verbrauch nach dem Code in der mRNA verbunden und es entsteht die gewünschte Polypeptidkette. Sogenannte Elongationsfaktoren helfen die Aminoacyl-tRNA zu binden und sind dafür zuständig, dass das Ribosom entlang der mRNA wandert.

4. Termination und Freisetzung

Das Ende der Polypeptidkette wird durch den Terminationscodon in der mRNA gemeldet und mit Freisetzungsfaktoren kann sich das Polypeptid vom Ribosom ablösen.

5. Faltung und Weiterverarbeitung nach der Translation

Wenn das Polypeptid die richtige dreidimensionale Faltung annimmt, dann ist es biologisch aktiv.

1.3 Resistenz

Heutzutage ist die Widerstandsfähigkeit bakterieller Erreger gegenüber verschiedener Antibiotika ein ernstzunehmendes Problem. Die Einsatzmöglichkeiten werden sehr eingeschränkt, weil die nicht resistenten Organismen abgetötet werden und die resistenten überleben, welche sich weiter vermehren [16].

Die Ursache für die Resistenz hat verschiedene Faktoren. Ein Grund liegt in der Vergangenheit, weil es früher zu einem breiten Einsatz des Antibiotikums gekommen ist, anstatt darauf zu achten, es gezielt zu verwenden. Ein weiteres Argument liegt im wiederholten Einsatz des Antibiotikums, wodurch die Chemotherapie fehlschlagen kann. Weiters wird die Resistenz auch durch die Spitäler begünstigt, weil dort verschiedenste Erreger auf engem Raum vorhanden sind. Ebenfalls verantwortlich für die Zunahme resistenter Stämme wurde durch den Einsatz von Antibiotika als Masthilfsmittel bei Tieren gefördert [11, 14, 17].

Den Erreger wird als resistent beziehungsweise unempfindlich bezeichnet, wenn die minimale Hemmkonzentration des Erregers über der am Infektionsort erreichbaren Konzentration liegt. Für die Chemotherapie ist die Entwicklung der Resistenz ein entscheidender Faktor. Es wird zwischen natürlicher (intrinsic) oder erworbener (acquired) Resistenz unterschieden [17].

Die natürliche Resistenz kann die meisten oder alle Arten einer Gattung einschließen. Diese sind dann von vornherein bei einer Chemotherapie resistent, weil meistens beim Erreger der Angriffspunkt der Chemotherapie fehlt. Damit ist gemeint, dass zum Beispiel die bakteriellen

Ribosomen sich strukturell umwandeln und somit eine Anlagerung des Antibiotikums verhindern [3, 16, 17].

Die erworbene Resistenz entsteht aufgrund einer Veränderung der DNA-Sequenz durch Mutation oder durch Aufnahme anderer DNA. Die Gene, die für die Resistenz verantwortlich sind, sind in ringförmigen, extrachromosomalen DNA-Doppelsträngen, den Plasmiden und nicht im Bakterienchromosom lokalisiert. Deshalb können Plasmide Resistenzfaktoren (R-Faktoren) gegen mehrere Antibiotika enthalten und die R-Faktoren können durch verschiedene Wege (Transposition, Brückenbildung zwischen zwei Bakterien, Transformation) übertragen werden. So ist zum Beispiel für die Resistenz von Chloramphenicol das Plasmid R1 verantwortlich. Diese erworbene Resistenz kann sich dann auch gegen andere Arzneimittel richten und somit eine spätere Behandlung mit diesem Antibiotikum scheitern. Dies wird dann als Kreuzresistenz bezeichnet [11, 17, 18].

1.4 Amphenicole

Zu dieser Gruppe gehören Chloramphenicol (CAP, Abbildung 1.3), Thiamphenicol (TAP, Abbildung 1.4), Florfenicol (FAP, Abbildung 1.5) und Florfenicolamin (FAPA, Abbildung 1.6), die alle Phenylethylamin-Derivate sind. Diese wirken bakteriostatisch und hemmen die Proteinsynthese, indem sie an die 50S-Untereinheit der Ribosomen der Bakterien binden. Der Unterschied zwischen diesen Wirkstoffen ist, dass CAP eine Nitrogruppe besitzt und die anderen Substanzen eine Sulfongruppe besitzen [17]. Bei FAP und FAPA ist noch ein Fluor vorhanden, während bei FAPA die Dichloracetylgruppe fehlt.

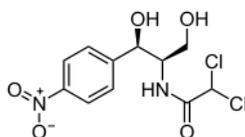


Abbildung 1.3: Chloramphenicol (CAP)

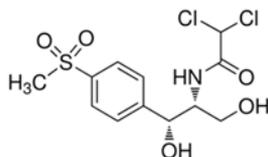


Abbildung 1.4: Thiamphenicol (TAP)

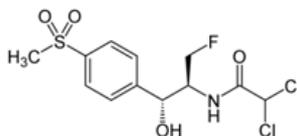


Abbildung 1.5: Florfenicol (FAP)

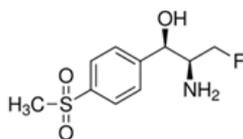


Abbildung 1.6: Florfenicolamin (FAPA)

1.4.1 Chloramphenicol (CAP)

1947 wurde CAP als Antibiotikum beschrieben und innerhalb eines Jahres wurde die Isolierung und die chemische Struktur aufgeklärt. Für eine natürliche Verbindung hat CAP eine ziemlich einfache Struktur, ein p-Nitrophenyl-dichloracetyl-aminopropandiol. Das Besondere bei CAP ist das Vorhandensein von Chlor und einer Nitrogruppe, wobei zu erwähnen ist, dass eine Nitrogruppe bis zu diesem Zeitpunkt noch nie in einem Naturprodukt nachgewiesen wurde. Bis 1950 wurde CAP aus der *Streptomyces venezuelae* isoliert. Da der Syntheseweg erstmals billiger als die Biosynthese war, war CAP das erste synthetische Antibiotikum auf dem Markt [1, 3, 8, 17].

CAP ist schwer bis schlecht löslich in Wasser (2,5 mg/ccm bei 25 ° C) und besser löslich in organischen Lösungsmitteln. Es ist sogar bei Raumtemperatur über mehrere Jahre stabil [19]. Lösungen sollten vor Licht geschützt und tiefgefroren aufbewahrt werden [20].

Dieser Wirkstoff hemmt durch die Peptidyltransferase in der Elongationsphase den Einbau der Aminosäuren in Proteine [9, 10]. Die Propandiolseitenkette bindet an die 50S-Untereinheit der Ribosomen und dadurch wird die Peptidyltransferasenaktivität gehemmt. Aus diesem Grund kann das Aminosäuresubstrat an den Enzymkomplex nicht binden und die Peptidkettenbildung wird verhindert. CAP wirkt gegen die meisten grampositiven und gramnegativen Bakterien und ist deshalb ein Breitband-Antibiotikum. Die Halbwertszeit liegt bei circa fünf Stunden [3, 17].

Diese Wirkung beschränkt sich auf die 70S-Ribosomen und ist hingegen auf die 80S-Ribosomen unwirksam. Außer bei sich zu schnell teilenden Zellen, wie die Knochenmarkszellen von Säugern, weist CAP auch eine Affinität auf [21]. Dadurch wird eine aplastische Anämie (Schädigung des Knochenmarks) als Nebenwirkung beim Einsatz von CAP ausgelöst. Deswegen wird CAP beim Menschen nur mehr bei lebensbedrohlichen Erkrankungen,

wenn andere Antibiotika versagen, eingesetzt und ist somit ein Reserveantibiotikum. Bei lokaler Anwendung, zum Beispiel Augensalbe oder Augentropfen, sind keine Bedenken vorhanden. CAP wurde 1994 für lebensmittelliefernde Tiere aufgrund der aplastischen Anämien mit einer Letalitätsrate von 50-60% als Nebenwirkung bei Menschen verboten. Die Nitrogruppe ist für das Auftreten der aplastischen Anämie mitverantwortlich [3, 8, 9, 11, 21, 22, 23].

Durch R-Plasmide induzierte Enzyme (CAP-Acetyltransferase) acetylieren die freien Hydroxylgruppen, wobei die Resistenz ausgelöst wird [17].

1.4.2 Thiamphenicol (TAP)

TAP ist ein semi-synthetisches Breitband-Antibiotikum und wurde in den 1960er Jahren als Ersatz für CAP entwickelt. Der strukturelle Unterschied zwischen den beiden Wirkstoffen ist, dass die Nitrogruppe durch eine Methylsulfonylgruppe ersetzt wird. TAP löst sich etwas besser als CAP im Wasser auf und ist ebenfalls lichtempfindlich. Das Wirkungsspektrum von TAP ist dem CAP annähernd gleich. Wahrscheinlich ist das Vorhandensein der Methylsulfonylgruppe anstelle von der Nitrogruppe der Grund, dass bislang beim Einsatz von TAP eine aplastische Anämie wie bei CAP noch nicht aufgetreten ist. Durch die Acetyltransferase wird die Resistenz ausgelöst [3, 21].

1.4.3 Florfenicol (FAP) und Florfenicolamin (FAPA)

FAP ist auch ein synthetisches Breitband-Antibiotikum und ist ein fluoriertes Derivat von Thiamphenicol. Der Unterschied liegt darin, dass bei FAP eine Hydroxylgruppe durch ein Fluor ersetzt wird. FAP hat den gleichen Wirkungsmechanismus und das gleiche Wirkungsspektrum wie CAP und TAP. Außerdem wurde auch hier die aplastische Anämie nicht als Nebenwirkung beobachtet. Die Halbwertszeit liegt bei circa 18 Stunden. Durch das Vorhandensein des Fluors bei FAP ist eine Acetylierung durch die CAP-Acetyltransferase wie bei CAP und TAP nicht möglich. Aus diesem Grund ist FAP gegenüber CAP und auch TAP resistenten Keimen wirksam [3, 21, 22, 23].

FAPA ist ein Hauptmetabolit von FAP [21].

1.5 Gesetzliche Grundlagen

Um zu gewährleisten, dass ein Tierarzneimittel ohne Bedenken und Harmlosigkeit für Mensch, Tier und Umwelt eingesetzt werden kann, muss dieses Mittel zuerst bei der EU-Kommission zugelassen werden. Diese Kommission setzt dann die Dosierung und Wartezeit zwischen Anwendung und Schlachtung der Tiere fest [18]. Es kann aber auch sein, dass Tierarzneimittel auf die Liste „Verbotene Stoffe“ kommen und somit nicht mehr eingesetzt werden dürfen.

Wenn ein Mensch über eine längere Zeit oder während seines ganzen Lebens durch die Nahrungsaufnahme Rückstände von Tierarzneimittel in tierischen Lebensmitteln zu sich nimmt, könnte der hypothetische Fall eintreten, dass diese konstante Aufnahme zur Schädigung des Verbrauchers führt [17]. Deshalb wurden von der Kommission Höchstwerte bestimmt, die nach dem heutigen wissenschaftlichen Stand als unbedenklich angesehen werden können [18]. In der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 DER KOMMISSION vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs dürfen die festgesetzten Höchstmengen nicht überschritten werden.

In der Tabelle 1.2 ist ein Auszug der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 für die in dieser Diplomarbeit relevanten Antibiotika zu sehen.

Tabelle 1.2: Auszug der Verordnung (EU) Nr. 37/2010

Zulässige Stoffe						
Pharmakologisch wirksame(r) Stoff(e)	Markerrückstand	Tierart(en)	Rückstands-höchstmenge(n)	Zielgewebe	Sonstige Vorschriften (gemäß Artikel 14 Absatz 7 der Verordnung (EG) Nr. 470/2009)	Therapeutische Einstufung
Florfenicol	Summe von Florfenicol und seiner Metaboliten gemessen als Florfenicolamin	Rinder	200 µg/kg	Muskel	Nicht zur Anwendung bei Tieren, deren Milch für den menschlichen Verzehr bestimmt ist. Nicht zur Anwendung bei Tieren, deren Eier für den menschlichen Verzehr bestimmt ist.	Mittel gegen Infektionen/ Antibiotika
		Schafe, Ziegen	3000 µg/kg 300 µg/kg	Leber Nieren		
		Schweine	300 µg/kg 500 µg/kg 2000 µg/kg 500 µg/kg	Muskel Haut und Fett Leber Nieren		
		Geflügel	100 µg/kg 200 µg/kg 2500 µg/kg 750 µg/kg	Muskel Haut und Fett Leber Nieren		
		Fisch	1000 µg/kg	Muskel und Haut in natürlichen Verhältnissen		
Alle anderen zur Lebensmittel-erzeugung genutzten Arten	100 µg/kg 200 µg/kg 2000 µg/kg 300 µg/kg	Muskel Fett Leber Nieren				
Thiamphenicol	Thiamphenicol	Alle zur Lebensmittel-erzeugung genutzten Arten	50 µg/kg 50 µg/kg 50 µg/kg 50 µg/kg 50 µg/kg	Muskel Fett Leber Nieren Milch	Für Fisch betrifft der Muskel-Rückstandshöchstmenge(n)wert „Muskel und Haut in natürlichen Verhältnissen“. Die Rückstandshöchstmenge(n)werte für Fett, Leber und Nieren gelten nicht für Fisch. Für Schweine und Geflügel betrifft der Fett- Rückstandshöchstmenge(n)wert „Haut und Fett in natürlichen Verhältnissen“. Nicht zur Anwendung bei Tieren, deren Eier für den menschlichen Verzehr bestimmt sind.	Mittel gegen Infektionen/ Antibiotika
Verbotene Stoffe						
Chloramphenicol	Rückstandshöchstmenge(n) kann (können) nicht bestimmt werden.					

Aus der Tabelle 1.2 werden die Rückstandshöchstmengen für Milch herausgenommen:

- CAP gehört zu der Gruppe: „Verbotene Stoffe“

Bei der Entscheidung der Kommission vom 13. März 2003 zur Änderung der Entscheidung 2002/657/EG hinsichtlich der Festlegung von Mindestleistungsgrenzen (MRPL) für bestimmte Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (2003/181/EG) wurde für CAP der Wert $<0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ festgelegt und ein Auszug ist in der Tabelle 1.3 veranschaulicht.

Tabelle 1.3: Auszug aus dem Gesetz 2003/181/EG

Stoff und/oder Metabolit	Matrix	MRPL
Chloramphenicol	Fleisch	0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$
	Eier	
	Milch	
	Urin	
	Erzeugnisse der Aquakultur	
	Honig	

- FAP und FAPA werden gemeinsam angeführt und dürfen generell bei Tieren, deren Milch für den menschlichen Verzehr bestimmt ist, nicht angewendet werden.
Aus diesem Grund wurden diese als „Verbotene Stoffe“ angesehen und der gleiche MRPL-Wert wie bei CAP festgesetzt.
- Für TAP ist die Höchstmenge $50 \mu\text{g}/\text{kg}$.

1.6 Analysemethoden

Es gibt verschiedene chemische, physikalische und auch biologische Verfahren, um Antibiotika analytisch zu bestimmen. Für ein rasches Ergebnis über den Gehalt des Wirkstoffes eignen sich **chemische Bestimmungsverfahren**. Dafür ist aber die Kenntnis über die genaue Struktur des Antibiotikums erforderlich. Da die antibiotischen Wirkstoffe sich durch verschiedene Strukturen unterscheiden, müssen spezifische Methoden der einzelnen Antibiotika beziehungsweise Antibiotika-Gruppen vorhanden sein [1].

Die **physikalischen Bestimmungsverfahren** führen ebenfalls zu einem schnellen Resultat. Hierfür ist eine selektive, erfassbare Eigenschaft des Moleküls des Antibiotikums notwendig. Diese Merkmale können eine charakteristische Eigenfarbe (z.B.: Actinomycin), die Fähigkeit zur Drehung der optischen Ebene polarisierten Lichtes (z.B.: Griseofulvin) oder die Möglichkeit

bestimmte Wellenlängen des ultravioletten Lichtes zu adsorbieren (z.B.: Polyen-Antibiotika) sein [1].

Die chemischen und physikalischen Verfahren werden hauptsächlich bei der Prozessführung zur Überprüfung von Fermentationsläufen angewendet. Die Ergebnisse bei diesen beiden Methoden zur Bestimmung von Antibiotika haben den Nachteil, dass auch vorhandene inaktivierte Moleküle miterfasst werden, wenn diese die reaktiven Gruppen des Antibiotikums besitzen, die dann gemessen werden. Die biologischen Verfahren haben dieses Problem zwar nicht, sind aber dafür zeitaufwändiger [1].

Die **biologischen Bestimmungsverfahren** ermitteln nur die biologische Aktivität der antibiotisch wirkenden Verbindung. Diese Methoden sind deshalb die internationale Forderung der Arzneimittelgesetzgebung, um die Bestimmung des Wirkstoffgehaltes bei der Herstellung von Antibiotika zu untersuchen. Hier wird unter Verdünnungstesten, turbidimetrischer Verfahren und Diffusionstesten unterschieden [1].

Wenn jetzt ein Lebensmittel auf Rückstände von Antibiotika analysiert wird, kann zuerst ein Screening der Probe auf gezielte Antibiotika gemacht werden, weil diese Verfahren eher schnell, kostengünstig und mit wenig Aufarbeitung verbunden sind. Erst wenn diese Analyse ein positives Ergebnis darstellt, wird zur Absicherung eine Bestätigungsanalyse durchgeführt, die nach der Entscheidung der Kommission 2002/657/EG zu erfolgen hat. Jedoch sind nicht alle Arten von Lebensmitteln mit solchen Methoden analysierbar [24].

Beispiele für Screening-Methoden:

ELISA-Test auf immunchemischer Basis
Radioimmunassay (RIA)
Charm-Test (Charm II, Charm –Rosa)
Delvotest
5-Plattentest (STAR-Protokoll)
Post-Screening

Beispiele für Bestätigungsmethoden:

HPLC mit Spezialdetektoren (DAD und FLD)
LC/MS oder LC-MS/MS
GC/MS

1.7 Messmethoden

Bei der Recherche für eine Messmethode für Antibiotika mittels HPLC-MS/MS wurden verschiedene Herstellung von Stammlösungen beziehungsweise Arbeitslösung, Laufmittel und Aufarbeitungsmöglichkeiten gefunden [25]- [26].

Die **Stammlösungen** beziehungsweise die **Arbeitslösungen** werden entweder mit Methanol, Ethanol, Wasser, Dimethylsulfoxid, Wasser : Methanol (60:40), verschieden Verhältnisse von Acetonitril : Wasser oder 0.1 mol/l Natrium-Heptansulfonsäurelösung (HSA) hergestellt.

Beim **Laufmittel** wird je nachdem ohne Puffer oder mit verschiedenen Konzentrationen von Ammoniumacetat gearbeitet. Als mobile Phase A wird Wasser, Wasser mit Ammoniumhydroxid (pH 8,5), verschiedene Konzentrationen Ameisensäure in Wasser oder 0.3 % Essigsäure in Wasser und bei Laufmittel B Methanol, Methanol : Acetonitril (1:9), Acetonitril, 0.3 % Essigsäure mit Acetonitril oder 0.2 % Ameisensäure in Acetonitril verwendet.

Die **Probenaufarbeitung** erfolgt entweder ohne oder mit einer Festphasenextraktion. Die Probe wird mit Acetonitril hydrolysiert, auf 2 ml eingedampft und mit Wasser auf 5 ml verdünnt oder gleich nach der Zugabe von Acetonitril zentrifugiert, filtriert und gemessen. Bei der Verwendung einer Festphasenextraktion wird die Probe entweder nur mit Wasser, mit Wasser und Ethylacetat, mit 4 % Phosphorsäure, mit einem Trinatriumphosphatpuffer, mit Na₂EDTA-McIlvaine-Puffer oder mit einer Lösung aus Trichloressigsäure, Natrium-EDTA und Wasser extrahiert. Danach wird die Probe wenn nötig zentrifugiert und je nachdem auf verschiedene vorkonditionierten SPE-Säulen (Solid-Phase-Extraction, Festphasenextraktionssäulen) geladen. Die Eluierung erfolgt entweder mit Ethylacetat, Methanol, Ethylacetat : Methanol (2:8), 5 % NH₄OH Methanol : Acetonitril (1:1) oder Oxalsäure. Mittels Stickstoffstrom oder am Rotavapor wird dann abgedampft und je nachdem mit Wasser : Methanol (9:1), Methanol, Acetonitril : Wasser (20:80), 0.1 % Ameisensäure : Methanol (80:20), Wasser, 0.5 % Ameisensäure in Wasser oder einer Lösung von 0.2 % Ameisensäure in Wasser : 0.2 % Ameisensäure in Acetonitril (90:10) aufgenommen. Anschließend wird die Probe gegebenenfalls filtriert und ins Gerät injiziert.

Da der Einsatz genormter Verfahren vorzuziehen ist, wurde die Norm BVL L 06.00-60 [27] ausgewählt um die Methode zu etablieren.

Bei dieser Methode wird nach Zugabe der isotoopenmarkierten Standards, des Enzyms (Glucuronidase/Arylsulfatase) und des Acetatpuffers die Probe hydrolysiert. Danach mit Ethylacetat und Ammoniumhydroxidlösung extrahiert und zentrifugiert. Mittels Stickstoffstrom

wird die obere Phase bis zur Trockene abgeblasen und der Rückstand wird mit n-Hexan entfettet und mit mobiler Phase (Anfangsbedingungen der HPLC-Gradienten) extrahiert. Anschließend wird zentrifugiert und die wässrige Phase membranfiltriert und gemessen.

1.7.1 HPLC-MS/MS

HPLC-MS/MS ist ein gekoppeltes System zwischen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).

Die Trennung der Komponenten in der Probe erfolgt in der HPLC durch zwei verschiedene Phasen. In der mobilen Phase (Laufmittel, Eluent) wird die Probe gelöst und mittels Druck durch eine mit ihr nicht mischbaren stationären Phase (Trennsäule) gepumpt. Je nachdem wie stark die Komponenten mit der stationären Phase in Wechselwirkung treten, wandern diese schneller oder langsamer durch die Säule. Um die Lebensdauer einer Trennsäule zu verlängern, kann davor für die Entfernung von Partikeln/Verunreinigungen eine kurze Vorsäule beziehungsweise ein Filter geschaltet werden [28].

Die Elektronensprayionisation (ESI) ist eine Methode für die Kopplung von HPLC und MS/MS und gehört zu den weichen beziehungsweise sanften Ionisationsarten. Dabei wird der Analyt aus der flüssigen Phase in die Gasphase überführt, indem dieser durch eine Kapillare gefördert wird. Die Kapillare ist von einem elektrischen Feld umgeben und beim Austritt kommt es zu einer Zerstäubung (Aerosolbildung) und einer Ionisierung des Analyts. Dabei können aber Laufmittelgradienten und Pufferzusätze zu Problemen führen. Aus diesem Grund ist darauf zu achten, dass flüchtige Puffer (z.B.: Ammoniumacetat) eingesetzt werden [29, 30, 31].

Ein Tandem-Massenspektrometer kann ein Triple Quadrupol Massenspektrometer (QQQ oder QqQ) sein und besteht aus drei Analysatoren, die hintereinander geschaltet sind. Hier werden die positiven und/oder negativen Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt. Der erste Quadrupol (Q1) unterstützt die Auswahl des zu untersuchenden Vorläufer-Ions/Mutter-Ions, während der zweite als Stoßkammer (oder auch Kollisionskammer beziehungsweise Kollisionszelle genannt) genutzte Quadrupol (Q2) für eine zusätzliche Fokussierung des Ionenstrahls dient. Damit ist gemeint, dass in dieser Kammer eine weitere Ionisation durch Stöße mit einem inerten Gas (Stickstoff, Argon) der von Q1 kommenden Ionen erfolgt. Dadurch zerfallen die Ionen weiter, zu anderen (leichteren) Ionen. Die Fokussierung kommt zustande, weil am Q2 kein Gleichstrompotential angelegt wird und dieses im

Hochfrequenz-Modus betrieben wird. Im dritten Quadrupol (Q3) werden dann die erzeugten Fragment-Ionen/Tochter-Ionen/Produkt-Ionen selektiv erfasst und analysiert [28, 29, 30, 31].

Bei dem verwendeten Triple Quadrupol Massenspektrometer, der für die Detektion eingesetzt wird, ist genau genommen der zweite Quadrupol eigentlich ein Hexapol (QhQ). Dadurch wird die ionenführende Wirkung verbessert. Diese Triple Quadrupol Geräte sind einfach zu bedienen und zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus. Durch die niedrigen Scan-Zeiten sind Quadrupolanalysatoren hervorragend für die Echtzeit-Abtastung chromatographischer Signale anwendbar [28, 29, 31].

Die bevorzugte Messmethode bei Triple Quadrupol Massenspektrometern ist die „Multiple Reaction Monitoring“ Methode (MRM-Methode). In einem Zyklus können dann zwei oder mehr Fragmentierungen erfasst werden [31].

Um exaktere Ergebnisse zu erhalten, kann ein interner Standard sowohl zu den Kalibrierstandards als auch zur Probe zugesetzt werden. Isotopenmarkierte Analyten eignen sich besonders gut als interne Standards. Erstens verhalten sich diese wie nichtmarkierte Analyten und zweitens sind beide durch das Massenspektrometer unterscheidbar [28].

1.8 Optimierung der HPLC-MS/MS für die Methode

Da die meisten Probleme bei diesem gekoppelten System beim Ionisationsprozess auftreten, sollte dieser für jeden Analyten zuerst optimiert werden. Grundsätzlich ist die Signalintensität im ESI positiv höher als im ESI negativ, jedoch verstärkt sich dadurch der Einfluss von der Matrix [32].

Dafür wird zuerst jeder Standard mit einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/l}$ hergestellt. Bei allen Optimierungsschritten wurde der für die Signalverstärkung zuständige Multiplier auf 300 EMV (Electron Multiplier Voltage) und der Fragmentor auf 380 V eingestellt. Es ist darauf zu achten, dass die Zyklen pro Sekunde zwischen 1 und 2 liegen. Weiters ist bei der HPLC anstelle der Säule ein Filter ohne Retentionseigenschaft eingebaut. Das Injektionsvolumen des Standards beträgt 10 μl , es wird kein Gradient verwendet, der Fluss beträgt 0.6 ml/min und die Säulentemperatur 40 ° C.

1.8.1 Scan

Um die optimalen Vorläufer-Ionen zu finden, werden im Scan die Ionisation im negativen sowie auch im positiven Modus durchgeführt. Der zweite Quadrupol und der Hexapol sind beim Scan durchlässig und der erste Quadrupol wird für die Messung verwendet.

Der Scan wird im Bereich von circa minus 5 bis circa plus 30 des Molekulargewichtes des Analyten durchgeführt. Wenn die Zyklen pro Sekunde nicht im geeigneten Bereich liegen, muss dementsprechend die Scan-Zeit geändert werden.

1.8.2 Produkt-Ion mit der dazugehörigen Kollisionsenergie (Collision Energy, CE)

Durch eine Fragmentierung des Vorläufer-Ions entstehen die Produkt-Ionen. Bei diesem Optimierungsschritt lässt der erste Quadrupol nur die spezifischen m/z , die im Scan ermittelten Vorläufer-Ionen, passieren. Diese werden dann im Hexapol durch stoß-induzierte Dissoziation (collision-induced dissociation, CID) fragmentiert, indem Ionen mit Inertgasatomen zusammenstoßen. Dies ermöglicht stabile Ionen in der Gasphase zu fragmentieren [31]. Im zweiten Quadrupol wird gescannt. Somit können in diesem Schritt zur Optimierung gleichzeitig die Produkt-Ionen und die geeignete Kollisionsenergie (CE) der einzelnen Übergänge (Vorläufer-Ion zum Produkt-Ion) ermittelt werden.

Je nachdem ob die Vorläufer-Ionen aus dem ESI positiv beziehungsweise negativ ermittelt wurden, wird dementsprechend die Ionisierung ausgewählt. Es kann auch vorkommen, dass beide (positiv und negativ) zu messen sind. Falls die Zyklen pro Sekunde nicht zwischen 1 und 2 liegen, muss auch hier die Scan-Zeit angepasst werden. Um die Produkt-Ionen mit der dazugehörigen Kollisionsenergie zu ermitteln, wird der Analyt bei verschiedenen Kollisionsenergien injiziert.

1.8.3 Beschleunigungsspannung der Kollisionszelle (Collision Cell Accelerator Voltage, CAV)

Nachdem die Fragment-Ionen beschleunigt und fokussiert wurden, werden diese durch die Beschleunigungsspannung vom Hexapol zum zweiten Quadrupol (Q2) weitergeleitet [31]. Ohne

dieser Beschleunigungsspannung würde die Kollisionszelle zu einer Ionenfalle, die Ionen immer weiter fragmentiert, werden.

Die optimale Beschleunigungsspannung der Kollisionszelle (CAV) wird bestimmt, indem der Analyt bei unterschiedlichen CAVs mit den zuvor ermittelten Übergängen und der dazugehörigen Kollisionsenergie eingespritzt wird. Sofern die Zyklen pro Sekunde nicht im angegebenen Bereich liegen, muss hier die Dwell-Zeit geändert werden. Unter der Dwell-Zeit wird die Messzeit pro Messpunkt verstanden. Hierfür ist wichtig, dass ausreichend viele Datenpunkte für ein Chromatogramm aufgezeichnet werden.

1.8.4 Retentionszeit, Quantifier und Qualifier

Um die Retentionszeit, Quantifier und Qualifier für jeden Analyten zu bestimmen, muss die Säule, die für die Methode zu verwenden ist, eingebaut werden. Die zuvor ermittelten Parameter werden dann in die Messmethode hineingeschrieben und jeder Standard einzeln gemessen. Als Quantifier wird der Übergang von Vorläufer-Ion zum Produkt-Ion mit der höchsten Signalintensität bezeichnet, die anderen als Qualifier. Der Quantifier ist für die Quantifizierung des Analyten und die Qualifier für die Bestätigung notwendig. Der Matrixeinfluss kann dies noch verändern.

2 Problemstellung

Antibiotika sind pharmakologisch wirksame Stoffe und werden zur Behandlung von erkrankten landwirtschaftlichen Nutztieren eingesetzt. Wird die gesetzlich vorgeschriebene Wartezeit nach einer Behandlung nicht eingehalten, können Lebensmittel tierischer Herkunft gesundheitlich bedenkliche Rückstände für den Menschen beinhalten. Ein Lebensmittel tierischen Ursprungs darf nach dem geltenden Lebensmittelrecht, Verordnung (EU) Nr. 37/2010, erst dann in den Verkehr gebracht werden, wenn dieses keinen Rückstand enthält, der zu einer Schädigung des Verbrauchers führen kann.

In dieser Diplomarbeit sollte die Normmethode BVL L 06.00-60 - Bestimmung von Amphenicol-Rückständen in Muskel und Milch (HPLC-MS/MS-Verfahren) – die Basis für die Etablierung und Entwicklung einer HPLC-MS/MS Methode für die Bestimmung von Amphenicolen (Chloramphenicol, Florfenicol, Florfenicolamin und Thiamphenicol) in Milch und Milchprodukten sein. Zusätzlich sollte eine Schnellmethode entwickelt und evaluiert werden.

Entsprechende Bestimmungsgrenzen sollten angestrebt werden, mit dem Ziel, die Einhaltung der Grenzwerte, die in der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 festgelegt sind, zu überprüfen. Die entwickelten Methoden sollten an Milch (Rohmilch) und ausgewählten Milchprodukten (Käse) angewendet und evaluiert werden.

Weiters sollen diese Methoden validiert, in die Routineanalytik eingeführt und der Akkreditierungsstatus erhalten werden.

3 Materialien und Geräte

In diesem Kapitel werden die für die Diplomarbeit relevanten Standards, isotopenmarkierte Standards, Chemikalien, Lösungen, Hilfsmaterialien und Geräte sowie die verwendeten Lebensmittel aufgelistet.

3.1 Standards

Die nachfolgenden Standards wurden verwendet.

3.1.1 Chloramphenicol

IUPAC: 2,2-dichloro-N-[1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide

CAS-Nr.: 56-75-7

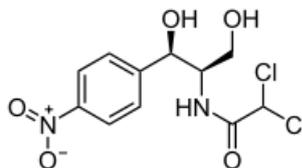
Summenformel: $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

Molmasse: 323,13 g/mol

Reinheit: $\geq 98\%$

Hersteller: Sigma-Aldrich

Lotnummer: 120M0175V



3.1.2 Florfenicol

IUPAC: 2,2-dichloro-N-[(1R,2S)-3-fluoro-1-hydroxy-1-(4-methanesulfonylphenyl)propan-2-yl]acetamide

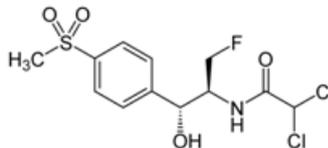
CAS-Nr.: 73231-34-2

Summenformel: $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$

Molmasse: 358,21 g/mol

Hersteller: Sigma-Aldrich

Lotnummer: SLBC5951V



3.1.3 Florfenicolamin

IUPAC: (1R,2S)-2-amino-3-fluoro-1-(4-methylsulfonylphenyl)propan-1-ol

CAS-Nr.: 76639-93-5

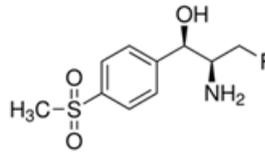
Summenformel: C₁₀H₁₄FNO₃S

Molmasse: 247,29 g/mol

Reinheit: 99,6%

Hersteller: Sigma-Aldrich

Lotnummer: SZBC223XV



3.1.4 Thiamphenicol

IUPAC: 2,2-dichloro-N-[(1R,2R)-1,3-dihydroxy-1-(4-methylsulfonylphenyl)propan-2-yl]acetamide

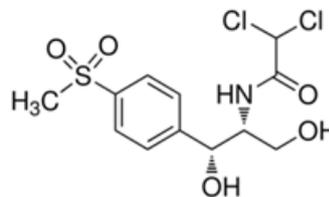
CAS-Nr.: 15318-45-3

Summenformel: C₁₂H₁₅Cl₂NO₅S

Molmasse: 356,22 g/mol

Hersteller: Sigma-Aldrich

Lotnummer: STBC9810V



3.2 Isotopenmarkierte Standards

Als interne Standards wurden folgende isotopenmarkierte Standards eingesetzt.

3.2.1 DL-threo-Chloramphenicol-d5

IUPAC: 2,2-dichloro-N-[(1R,2R)-1-deuterio-1,3-dihydroxy-1-(2,3,5,6-tetradeuterio-4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide

CAS-Nr.: 202480-68-0

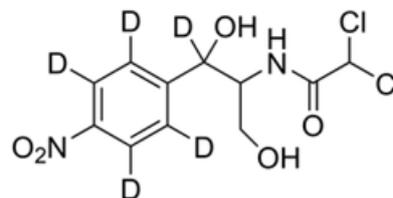
Summenformel: C₁₁D₅H₇Cl₂N₂O₅

Molmasse: 328,16 g/mol

Reinheit: 99,5%

Hersteller: Sigma-Aldrich

Lotnummer: BCBL1530V



3.2.2 Florfenicol-d3

IUPAC: 2,2-Dichloro-N-[(1S,2R)-1-(fluoromethyl)-2-hydroxy-2-[4-[(methyl-d3)

sulfonyl]phenyl]ethyl] acetamide

CAS-Nr.: 73231-34-2-unlabelled

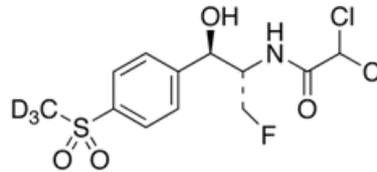
Summenformel: C₁₂H₁₁D₃Cl₂FNO₄S

Molmasse: 361,23 g/mol

Reinheit: 98,9%

Hersteller: LGC Standards GmbH

Lotnummer: 1JMS972



3.2.3 Florfenicol-d3-Amin

IUPAC: R-(R *, S *)]- α -(1-Amino-2-Fluorethyl) -4 - (methylsulfonyl-d3) benzol

CAS-Nr.: 108656-33-3-unlabelled

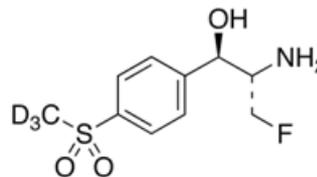
Summenformel: C₁₀H₁₁D₃FNO₃S

Molmasse: 250,30 g/mol

Reinheit: 98,8%

Hersteller: LGC Standards GmbH

Lotnummer: 21-SHG-115-1



3.2.4 Thiamphenicol-methyl-d3

IUPAC: Dd-threo-2-Dichloroacetamido-1-(4-methylsulfonylphenyl-d3) -1,3 - propandiol

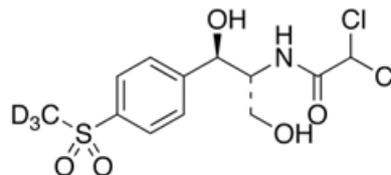
CAS-Nr.: 15318-45-3-unlabelled

Summenformel: C₁₂H₁₂D₃Cl₂NO₅S

Molmasse: 359,24 g/mol

Hersteller: LGC Standards GmbH

Lotnummer: 7-XAL-171-2



3.3 Chemikalien

Die anschließend aufgelisteten Chemikalien wurden für die in der Diplomarbeit behandelten Methoden benötigt.

3.3.1 Wasser für LC/MS

z.B.: Millipore Milli-Q

3.3.2 Methanol für LC/MS

z.B.: J.T. Baker 9822

3.3.3 Methanol LC-Grade

z.B.: Merck 1.06007.1000

3.3.4 Ethanol p.a.

z.B.: Merck 1.00983.1011

3.3.5 n-Hexan, HPLC-Qualität

z.B.: Merck 1.04368.2500

3.3.6 25% Ammoniumhydroxidlösung

z.B.: Sigma-Aldrich 30501-1L

3.3.7 Ammoniumacetat, LC-MS-Grade

z.B.: VWR 153164R

3.3.8 Glucuronidase/Arylsulfatase

z.B.: Merck 1.04114.0002

3.3.9 Natriumacetat Trihydrat

z.B.: Merck 1.06267.1000

3.3.10 99-100% Essigsäure p.a.

z.B.: VWR 1.00063.2511

3.3.11 Ethylacetat p.a.

z.B.: VWR 83660.320

3.3.12 Aceton p.a.

z.B.: VWR 83656.320

3.4 Lösungen

So wurden die relevanten Lösungen hergestellt.

3.4.1 6%-ige Essigsäurelösung

12 ml 99 - 100% Essigsäure werden in einem 200 ml Messkolben vorgelegt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

3.4.2 Acetatpuffer pH 4,8

13,61 g Natriumacetat Trihydrat werden in 200 ml Wasser gelöst und mit 154 ml 6%-ige Essigsäurelösung gemischt. Der pH-Wert des Puffers wird überprüft und gegebenenfalls nachgestellt.

3.4.3 Laufmittel A: Wasser, 5 mmol/l Ammoniumacetat

0,3854 g Ammoniumacetat werden in 1 l Wasser gelöst.

3.4.4 Laufmittel B: Methanol, 5 mmol/l Ammoniumacetat

0,3854 g Ammoniumacetat werden in 1 l Methanol gelöst.

3.4.5 Lösung Anfangsbedingung des HPLC-Gradienten

95% Laufmittel A und 5% Laufmittel B

3.5 Hilfsmaterialien

Folgende Hilfsmaterialien wurden gebraucht.

**3.5.1 20-200 μ l-Eppendorf Kolbenhubpipette
mit 200 μ l-Einmalplastikspitzen**

**3.5.2 100-1000 μ l-Eppendorf Kolbenhubpipette
mit 1000 μ l-Einmalplastikspitzen**

**3.5.3 500-5000 μ l-Eppendorf Kolbenhubpipette
mit 5000 μ l-Einmalplastikspitzen**

**3.5.4 1-10 ml-Eppendorf Kolbenhubpipette
mit 10 ml-Einmalplastikspitzen**

3.5.5 50 ml Zentrifugenröhrchen

z.B.: Sarstedt, Falcon

3.5.6 15 ml Zentrifugenröhrchen

z.B.: Falcon

3.5.7 Pasteur-Pipetten

z.B.: Brand

3.5.8 Chromatographievials, 2 ml braun

z.B.: Agilent Technologies

3.5.9 Chromatographievials, 0,1 ml

z.B.: Supelco

3.5.10 Kappen für die Vials

z.B.: Agilent Technologies

3.5.11 Whatman™Mini-UniPrep™Vial 0,2 μm

z.B. GE Healthcare Life Sciences

3.5.12 Spitzkolben 100ml

z.B.: Duran

3.5.13 1 L Glasflaschen

z.B.: Schott Duran

3.6 Geräte

Diese Geräte wurden verwendet.

3.6.1 Homogenisator

z.B.: Robot Coupe Blixer 3, Retsch Grindomix

3.6.2 Waage

Auflösung 0,1 g und Auflösung 0,001g

3.6.3 Wasserbad

z.B.: GFL 1003

3.6.4 pH-Meter

z.B.: Sartorius Professional Meter PP-20

3.6.5 Überkopfschüttler

z.B.: Heidolph

3.6.6 Zentrifuge

z.B.: Hettich EBA 21, eppendorf

3.6.7 Rotavapor

z.B.: Büchi Rotavapor R-200 mit Büchi Heating Bath B-490 und Vakuumpumpe ILMAC VCZ324

3.6.8 Ultraschallbad

z.B.: Bandelin Sonorex RK 510 S

3.6.9 Vibrationsschüttelgerät

z.B.: Vortex Heidolph REAX control

3.6.10 Agilent Technologies HPLC 1290 gekoppelt mit Agilent Technologies 6490 Triple Quad LC/MS

3.6.11 Agilent Technologies Säule RRHD Eclipse Plus C18 2.1 x 100 mm; 1.8 μ m

3.7 Lebensmittel

Bei der Auswahl der Lebensmittel wurden die Matrices Milch und Käse ausgewählt. Da am Schluss der Aufarbeitung ein Entfettungsschritt durchzuführen ist, wurde bei der Matrix Käse verschiedene Käsesorten mit unterschiedlichen Fettgehalt genommen und zwar einen Hartkäse, einen Schnittkäse, einen Schimmelkäse und einen Frischkäse. Für die Matrix Milch wurde Rohmilch ausgewählt.

3.7.1 Rohmilch

3,5 bis 5 % Fett

3.7.2 Heumilch-Emmentaler

Hartkäse, 30 % Fett absolut, 45 % F.i.T.

3.7.3 Edamer

Schnittkäse, 16 % Fett absolut, 30 % F.i.T.

3.7.4 Camembert

Weißschimmelkäse, 21 % Fett absolut, 45 % F.i.T.

3.7.5 Frischkäse

Frischkäsezubereitung Natur, 22 % Fett absolut, 65% F.i.T.

4 Ergebnisse der Methodik-Etablierung

Zuerst wurden die Standards und die isotope markierten Standards für die Messung mittels HPLC-MS/MS optimiert.

4.1 Optimierung der Standardsubstanzen und der isotope markierten Standardsubstanzen

Die einzelnen Optimierungsschritte wurden über die qualitative Software von Agilent (Qualitative Analysis B.06.00) ausgewertet.

4.1.1 Scan

Im Scan wurden die Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) der Vorläufer-Ionen für jeden Standard einzeln ermittelt. In der Abbildung 4.1 wird ein Beispiel eines Scans von TAP veranschaulicht.

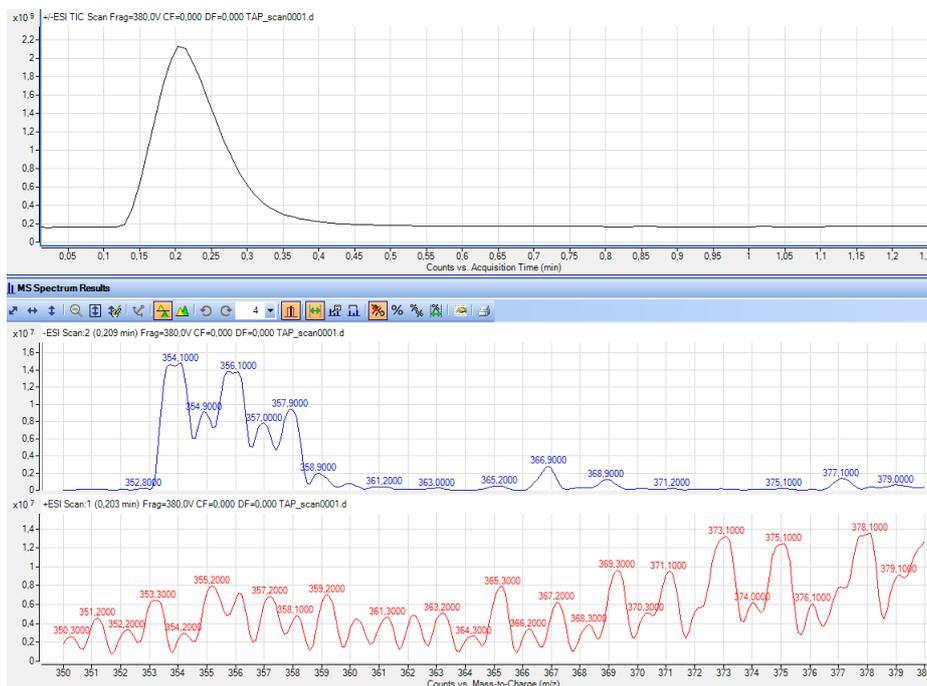


Abbildung 4.1: Scan von TAP

Oben: Totalionen chromatogramm (TIC, schwarz), x-Achse: Messzeit [min], y- Achse: Signalintensität

Mitte: ESI negativ Scan (blau), x-Achse: Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z), y- Achse: Signalintensität

Unten: ESI positiv Scan (rot), x-Achse: Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z), y- Achse: Signalintensität

Da TAP ein Molekulargewicht von 356,22 g/mol hat, wurde der Scan im Bereich von 350 bis 380 aufgezeichnet. Im ESI negativ Scan (Abbildung 4.1, Mitte) sind drei Peaks mit einer höheren Signalintensität zu sehen und zwar die Peaks mit m/z 354, 356, und 358. Diese Werte sind sinnvoll, weil es im ESI negativ zu einer Abspaltung von einem oder mehreren Wasserstoffatomen kommen kann. Zu berücksichtigen ist auch, dass TAP zwei Chlor-Atome besitzt und es somit auch auf die Isotope (^{35}Cl und ^{37}Cl) ankommt. Beim ESI positiv Scan (Abbildung 4.1, Unten) sind keine nennenswerten/eindeutige Peaks im Bereich m/z 357, 358 beziehungsweise 379 zu sehen. Deshalb wurde für TAP nur ESI negativ verwendet und als Vorläufer-Ionen m/z 354, 356 und 358 genommen.

4.1.2 Produkt-Ion mit der dazugehörigen Kollisionsenergie („Collision Energy“, CE)

In diesem Schritt werden die verschiedenen Übergänge mit der passenden Kollisionsenergie (CE) ermittelt. Dafür wurde jeder Standard achtmal mit unterschiedlichen CEs eingespritzt. Die verwendeten CEs waren 1, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 eV. In Abbildung 4.2 sind anhand des Beispiels TAP die Produkt-Ionen der verschiedenen Vorläufer-Ionen bei der CE von 5 eV zu sehen.



Abbildung 4.2: Produkt-Ionen der verschiedenen Vorläufer-Ionen bei der CE von 5 eV anhand des Beispiels TAP, x-Achse: Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z), y-Achse: Signalintensität

Oben: Produkt-Ionen des Vorläufer-Ions m/z 358 (schwarz)

Mitte: Produkt-Ionen des Vorläufer-Ions m/z 354 (blau)

Unten: Produkt-Ionen des Vorläufer-Ions m/z 356 (rot)

In der Abbildung 4.2 ist ersichtlich, dass ziemlich die gleichen Produkt-Ionen entstehen. Jedoch ist in diesem Optimierungsschritt noch schwer zu sagen, welcher der quasi gleichen

Übergänge in der Laufmethode der bessere ist.

Bei verschiedenen CEs entstehen aber andere Produkt-Ionen, was in Abbildung 4.3 gezeigt wird.

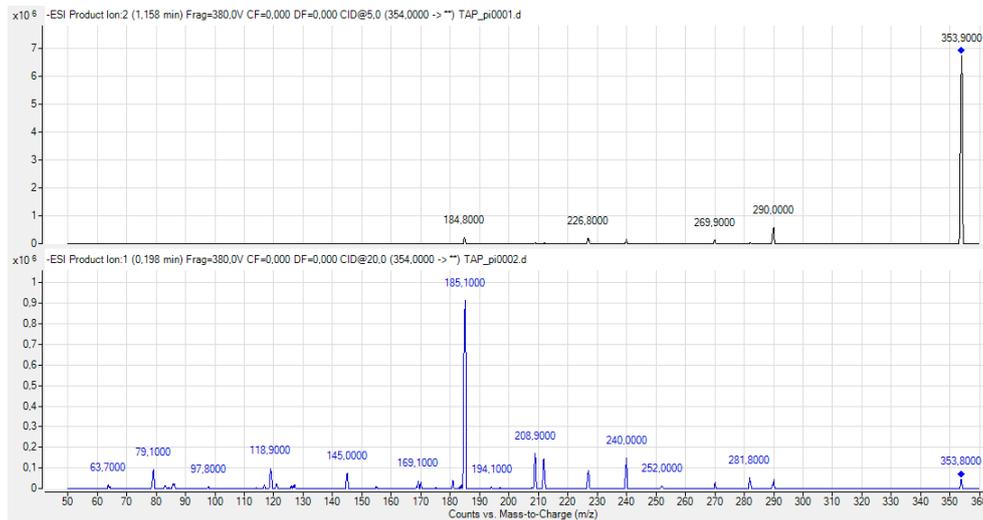


Abbildung 4.3: Produkt-Ionen eines Vorläufer-Ions bei unterschiedlichen CEs anhand des Beispiels TAP, x-Achse: Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z), y- Achse: Signalintensität
Oben: Produkt-Ionen des Vorläufer-Ions m/z 354 und bei CE von 5 eV(schwarz)
Unten: Produkt-Ionen des Vorläufer-Ions m/z 354 und bei CE von 20 eV (blau)

Wird in der Abbildung 4.3 die Produkt-Ionen des Vorläufer-Ions m/z 354 bei den CEs von 5 eV (oben, schwarz) und 20 eV (unten, blau) miteinander verglichen, ist zu erkennen, dass bei der höheren Kollisionsenergie die Anzahl der Produkt-Ionen steigt und dass vom Vorläufer-Ion weniger vorhanden ist.

Um die passende Kollisionsenergie für jedes Produkt-Ion zu ermitteln, wurde von jedem Produkt-Ion die Signalintensität (Peak) bei den unterschiedlichen Kollisionsenergien miteinander verglichen. Die jeweils höchste Signalintensität wurde genommen, siehe dazu Abbildung 4.4.

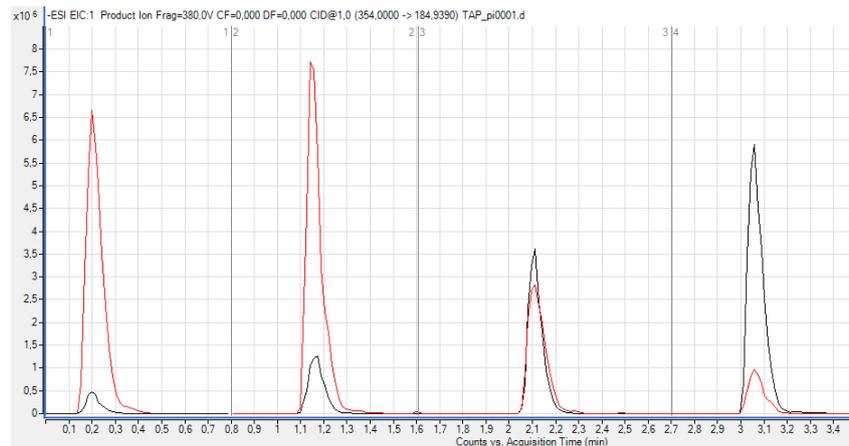


Abbildung 4.4: Peaks des Produkt-Ions m/z 185 bei unterschiedlichen CEs anhand des Beispiels TAP, x-Achse: Messzeit [min], y- Achse: Signalintensität
schwarz: von links nach rechts – CE 1 eV, CE 5 eV, CE 10 eV und CE 15 eV
rot: von links nach rechts – CE 20 eV, CE 25 eV, CE 30 eV und CE 35 eV

In der Abbildung 4.4 ist das Beispiel des Überganges m/z 354 zu 185 von TAP bei allen acht verschiedenen CEs ersichtlich. Wie zu sehen ist, ist die höchste Signalintensität dieses Überganges bei der Kollisionsenergie von 25 eV. Dies wurde mit allen zuvor ausgesuchten Produkt-Ionen gemacht.

4.1.3 Beschleunigungsspannung der Kollisionzelle (Collision Cell Accelerator Voltage, CAV)

Bei diesem Optimierungsschritt wurde der Analyt bei vier verschiedenen Beschleunigungsspannungen der Kollisionzelle eingespritzt. Die verwendeten CAVs waren 1, 3, 5 und 8 eV. Die CAV mit dem höchsten Signalintensität-Peak wird genommen, dies wird in Abbildung 4.5 veranschaulicht.

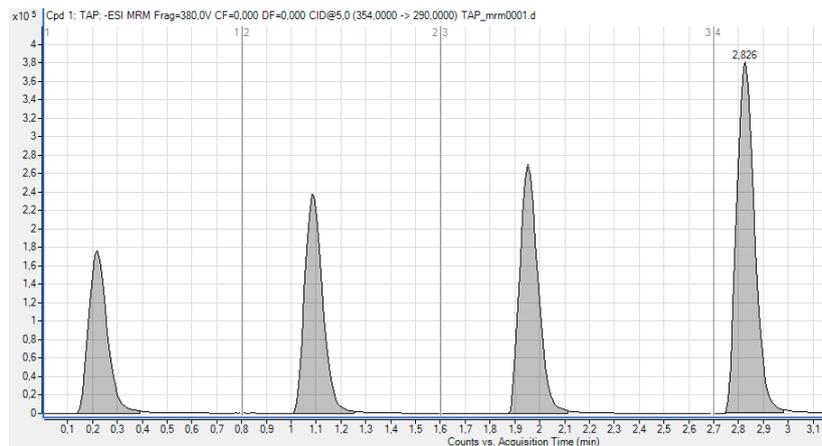


Abbildung 4.5: Peaks des Überganges 354 zu 290 bei unterschiedlichen CAVs anhand des Beispiels TAP, x-Achse: Messzeit [min], y- Achse: Signalintensität
von links nach rechts: CAV 1 eV, CAV 3 eV, CAV 5 eV und CAV 8 eV

Aus der Abbildung 4.5 ist die optimale CAV vom Übergang 354 zu 290 bei 8 eV ersichtlich. Für jeden Übergang wurde so die CAV bestimmt.

4.1.4 Retentionszeit, Quantifier und Qualifier

Für diese Bestimmungen wurde in die HPLC die für die Methode zu verwendende Säule eingebaut. Jeder Analyt wurde mit der Messmethode, die die davor ermittelten Parameter enthält, gemessen. In der Abbildung 4.6 werden alle Übergänge von TAP gezeigt.

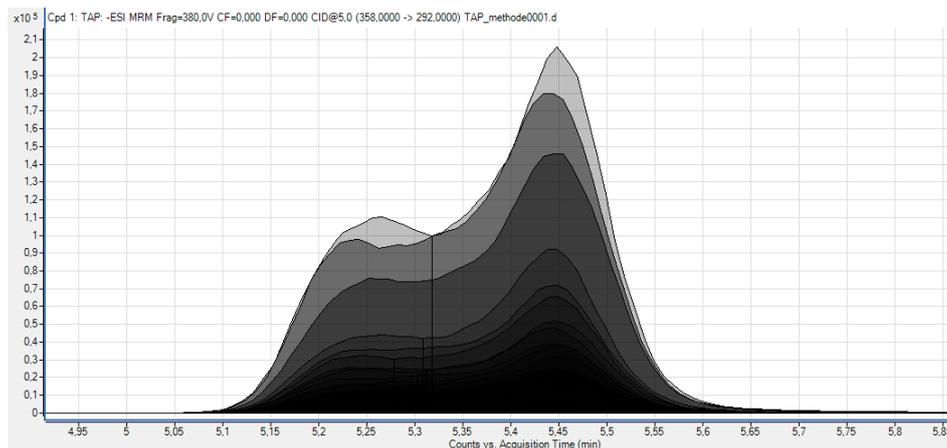


Abbildung 4.6: Alle Übergänge von TAP, x-Achse: Messzeit [min], y- Achse: Signalintensität

In der Abbildung 4.6 ist zu sehen, dass die Retentionszeit bei ca. 5,4 min liegt. Weiters wird mit Hilfe des Auswerteprogramms Qualitative Analysis B.06.00 die fünf Übergänge mit den höchsten Signalintensitäten herausgesucht. Der Übergang mit der höchsten Signalintensität

wird vorerst als Quantifier und die anderen als Qualifier genommen. Von allen zuvor ermittelten Übergängen werden allerdings nur die fünf höchsten Übergänge genommen. Diese wurden jedoch bei der Etablierung der Methode auf maximal drei Übergänge reduziert, weil sich manche Qualifier bei der am Ende verwendeten Methode nicht als nützlich erwiesen haben. Es kann auch durch den Matrixeinfluss die Möglichkeit bestehen, dass der Quantifier mit einem Qualifier getauscht wird.

4.2 Etablierung der Methode zur Bestimmung von Amphenicolen in Milch und Milchprodukten

4.2.1 Abweichungen zur Norm BVL L 06.00-60

Da das zu verwendende HPLC-MS/MS-Gerät auch für andere Methoden im Einsatz ist, wurde, um die neue Methode besser in die Routine einzuführen, auf ein weiteres Laufmittel verzichtet. Umso mehr verschiedene Laufmittel in Verwendung sind, desto öfters muss diese für die unterschiedlichen Methoden gewechselt werden. Aus diesem Grund wurde im Laufmittel als Puffer Ammoniumformiat anstelle von Ammoniumacetat verwendet. Weiters wurde das Laufmittel mit 1 ml konzentrierter Ameisensäure angesäuert.

In der Norm wird eine Phenomenex Gemini C18 (3 mm x 150 mm; 3 μm) als Trennsäule vorgeschlagen. Es wurde jedoch eine Eclipse Plus C18 (2.1 mm x 100 mm; 1.8 μm), die schon für andere Methoden verwendet wurde, genommen, weil sonst zusätzliche Umbauarbeiten wie beim Laufmittel entstehen würden.

Anstelle der vorgeschlagenen Vorsäule Phenomenex Security Guard C18-Material (2 mm x 4 mm) wurde ein Filter vor der Trennsäule eingebaut.

Anstelle eines Heizblock mit Ablaseinrichtung wurde ein Rotavapor verwendet.

Bei der Probenaufarbeitung werden laut Norm 25 μl isotopenmarkierte Standardlösung dazu pipettiert. Bei so einer geringen Menge besteht die Gefahr, dass ein minimaler Pipettierverlust zu einem großen Fehler führt. Aus diesem Grund wurde die Konzentration dieser Lösung um das Vierfache verdünnt hergestellt und dafür wurden 100 μl zur Probe zugesetzt.

Um die gesamte Laufzeit zu halbieren, wurde die Säulentemperatur auf 40 ° C erhöht. Somit

werden die Analyte früher retentiert und es können in gleicher Zeit doppelt so viele Proben analysiert werden.

4.2.2 Versuche ohne isotoopenmarkierte Standards

In Vorversuchen wurde einmal ein Mischstandard mit den vier Standards in drei verschiedenen Konzentrationen hergestellt, um zu sehen, ob mit dem anderen Laufmittel und der anderen Säule brauchbare Ergebnisse erzielt werden können.

Weiters wurden auch Milchproben nach der Norm aufgearbeitet. Es kam jedoch beim Abrotieren und Filtrieren der Proben zu Problemen. Beim Abrotieren war darauf zu achten, dass langsam und schrittweise das Vakuum angelegt wird und beim Filtrieren nicht ein Syringe-Filter, sondern ein Vial mit integriertem Filter (einen WhatmanTM Mini-UniPrepTM Vial) zu verwenden ist, weil die Menge, die zu filtrieren ist, sehr gering ist und es sonst nicht möglich wäre, die Filtration durchzuführen.

Als der erste Versuch vielversprechend war, wurden zwei Lösungen zum Dotieren von Proben hergestellt, weil es sich bei den zu verwendeten Proben um sogenannte Blindproben handelt. Damit ist gemeint, dass eine Blindprobe keinen zu analysierenden Analyt enthält. Diese Annahme wurde von vornherein durch eine externe Überprüfung der Proben für CAP bestätigt. Es wurden dann zuerst einmal Milchproben dotiert und analysiert. Jedoch war es ohne isotoopenmarkierte Standards nicht aussagekräftig.

4.2.3 Versuche mit zwei isotoopenmarkierten Standards

In der Norm steht, dass nur zwei isotoopenmarkierte Standards als interner Standard zur Quantifizierung benötigt werden. CAP-d5 als interner Standard für CAP und FAP-d3 für FAP, FAPA und TAP. Es wurde eine Kalibration mit allen sechs Standards in sieben verschiedenen Levels hergestellt. Bei der Kalibration wurde festgestellt, dass es nicht, wie in der Norm, um eine lineare Kalibrierfunktion handelt, sondern um eine quadratische. Weiters wurde bemerkt, dass die Quantifizierung von FAPA und TAP schwierig ist. Zum einen stimmen die Retentionszeiten von FAP-d3 mit FAPA beziehungsweise TAP nicht überein und somit kann eine Retentionszeitverschiebung, zum Beispiel durch einen Matrixeinfluss, nicht eindeutig erkennbar sein. Zum anderen passt die Peakform nicht zusammen. Diese kann sich durch einen Matrixeinfluss ändern.

4.2.4 Aufarbeitung von Milchproben mit zwei isoto­penmarkierten Standards

Es wurden je drei Milchproben mit zwei verschiedenen Konzentrationen dotiert. Jedoch zeigte dieser Versuch, dass es doch sinnvoller ist, wenn alle vier isoto­penmarkierte Standards verwendet werden und somit wurde die Vermutung bei der Kalibration bestätigt. FAPA und auch TAP haben tatsächlich durch den Matrixeinfluss der Probe eine Veränderung der Peakform und eine minimale Retentionszeitverschiebung. Durch den isoto­penmarkierten Standard in der Probe werden Verluste des Analyten bei der Probenaufarbeitung korrigiert. Aus diesen Gründen ist eine Quantifizierung mit einem isoto­penmarkierten Standard als interner Standard in der Probe für alle Analyten eindeutiger und genauer. Dies wurde auch durch Aufarbeitung von zwei Milchproben mit der gleichen Dotier-Konzentration beobachtet. Wo kein isoto­penmarkierter Standard verwendet wurde, kamen zwei unterschiedliche Werte heraus und somit ist die Aufarbeitung nicht repräsentativ.

4.2.5 Aufarbeitung von Milchprodukten mit der Methode in Anlehnung an die Norm

Die Norm BVL L 06.00-60 ist für die Bestimmung von Amphenicol-Rückständen in Muskel und Milch. Deshalb musste getestet werden, ob es auch mit Käseproben möglich ist. Bei der ersten Aufarbeitung der Käseproben wurde festgestellt, dass die Proben gerade noch vom Acetatpuffer bedeckt waren. Aus diesem Grund wurde beschlossen, dass bei solchen Proben das Volumen des Puffers auf 8 ml erhöht wird. Denn es ist wichtig, dass sich die gesamte Probe in der Flüssigkeit befindet, um sicher zu sein, dass alles aufgeschlossen wird.

4.2.6 Austestung von Membranmaterial der Whatman™Mini-UniPrep™Vial

Da in der Norm nur von einem Mebranfilter die Rede ist, wurden zwei verschiedene Membranmaterialien von Whatman™Mini-UniPrep™Vial ausgetestet und zwar eine Membran aus regenerierter Zellulose (RC) und eine aus Polytetrafluorethylen (PTFE). Dafür wurde eine dotierte Milchprobe mit beiden Membranen filtriert. Da nicht wirklich ein Unterschied zwischen den zwei Materialien zu sehen war, fiel die Entscheidung auf das Membranmaterial RC, weil diese Membran für wässrige/organische Lösungsmittel vorgesehen ist.

4.2.7 Probleme mit Chloramphenicol

Da die Kalibration von CAP nicht mehr zu akzeptieren war und um sicher zu gehen, das CAP nicht abgebaut war, wurden die Kalibrierlösungen, die eingefrorenen waren, neu abgefüllt und gemessen. Das Ergebnis der neu abgefüllten Kalibration war nicht mit der ersten Kalibration vergleichbar. Deswegen wurden die Kalibrierlösungen frisch von den Stammlösungen hergestellt. Aber die Signalintensität von CAP war niedriger als im Vergleich zu den anderen Standards.

Deshalb wurden verschiedene Versuche unternommen. Die Ionenquelle und die Transferkapillare wurden gereinigt, ein Laufmittel ohne Säurezusatz verwendet, die CAP-Stammlösung noch einmal frisch hergestellt, eine CAP-Lösung bestellt und das Injektionsvolumen geändert. Auch die Durchführung mit einer ähnlichen Trennsäule wie in der Norm (Trennsäule: Phenomenex Gemini C18, 5 μ m, 2 mm x 150 mm) und der vorgeschlagenen Vorsäule brachte kein positives Ergebnis.

Bei der Recherche, warum es auf einmal nicht mehr funktioniert, wurde entdeckt, dass Chloramphenicol lichtempfindlich ist und deswegen wurden ab diesen Zeitpunkt die Lösungen in dunkle Vials abgefüllt. Weiters wurde herausgefunden, dass der pH-Bereich von Ammoniumformiat bei 3-5 und der von Ammoniumacetat bei 4-6 liegt. Da jetzt Chloramphenicol ein pH-Optimum bei pH 6 hat, könnte das der mögliche Grund sein. Mit dem Puffer Ammoniumacetat wurde das Problem schließlich behoben. Somit musste das Laufmittel nach Norm für die Methode genommen werden.

4.2.8 Herstellung der Kalibrierlösung

Wenn die Kalibrierlösung anstelle mit Ethanol mit der Lösung Anfangsbedingung des HPLC-Gradienten hergestellt wird, verändert sich die Peakform von FAPA und TAP. Somit sind die Analyte in der Kalibrierlösung und in den Proben in der gleichen Lösung. Dadurch ist die Quantifizierung der Analyte leichter und eindeutiger.

4.2.9 FAP und FAPA

Da die Norm BVL L 06.00-60 für die Bestimmung von Amphenicol-Rückständen in Milch ist, wurden die in dieser Norm vorgeschlagenen Konzentrationen der Kalibrierstandards für FAP und FAPA übernommen. Jedoch wurde im Laufe der Etablierung festgestellt, dass FAP und FAPA bei Tieren, deren Milch für den menschlichen Verzehr bestimmt ist, nicht angewendet werden darf.

Somit wurden die gleichen Konzentrationen der Kalibrierstandards wie für CAP genommen.

4.2.10 Einsparung von Abrotieren

Da das Abrotieren sehr zeitaufwändig ist, wurde geprüft, ob auch ohne diesen Schritt eine Analyse möglich ist. Dafür wird ein sogenanntes „dilute and shout“-Verfahren angewendet. Damit ist gemeint, dass die Analyten nicht wie beim Abrotieren aufkonzentriert, sondern verdünnt werden. Deshalb muss allerdings mehr injiziert werden. Dementsprechend ist auch eine niedrigere Kalibration erforderlich.

Nach der Extraktion sind die Analyte in Ethylacetat gelöst. Jedoch sollte die Lösung, die in die HPLC eingespritzt wird, so nahe wie möglich an der Anfangsbedingung des HPLC-Gradienten liegen. Deshalb musste einmal getestet werden, ob Ethylacetat mit der Lösung Anfangsbedingung des HPLC-Gradienten mischbar ist. Ethylacetat ist aber mit Wasser nicht mischbar. Deshalb wurden verschiedene Verhältnisse Wasser : Methanol für die Verdünnung mit Ethylacetat ausgetestet. Bei der Auswertung wurde festgestellt, umso mehr Ethylacetat in der Lösung, die injiziert wird, vorhanden ist, desto schlechter wurden die Peaks. Aus diesem Grund wurde dann die Verdünnung mit n-Hexan entfettet, was zwar schönere Peaks zur Folge hatte, aber letztendlich waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend und somit wurde diese Idee verworfen.

4.2.11 Analyse direkt nach der Hydrolyse - Schnellmethode

Da die Aufarbeitung nach der Norm zeitintensiv ist, wurde das „dilute and shout“-Verfahren direkt nach der Hydrolyse probiert. Dazu wird nach der Hydrolyse 500 μ l entnommen, zentrifugiert und filtriert. Es wurde auch getestet, ob diese Lösung mit n-Hexan entfettet werden muss. Die Entfettung stellte sich jedoch als nicht notwendig heraus. Es wurde auch festgestellt, dass nicht mehr als zehn Proben in einer Messserie gemessen werden soll. Die Ionenquelle wird durch den Acetatpuffer stark verschmutzt und muss danach gereinigt werden. Da das Enzym Beta-Glucuronidase dazu führt, dass sich die Lebensdauer der Trennsäule verkürzt, sollte dieses vor der Messung aus der Probe entfernt werden. Dies kann durch Zentrifugieren bei hoher Drehzahl erreicht werden [33].

Bereits beim Beginn der Validierung der Schnellmethode wurde bemerkt, dass dieses Verfahren nicht für eine quantitative Analyse zu verwenden ist. Trotzdem wurde es validiert um zu sehen, ob damit eine qualitative Aussage getroffen werden kann, also ob ein Analyt vorhanden ist oder nicht. Sollte die Validierung zu einer positiven qualitativen Aussage führen, wäre aber

noch die Probe für eine quantitative Bestimmung nach der anderen Methode aufzuarbeiten.

4.2.12 Bestimmung von Florfenicolamin in Proben

Die Auswertung von FAPA ist durch den Matrixeinfluss nicht möglich. Da in niedriger Konzentration untersucht wird, ist der Matrixeinfluss einfach zu groß und FAPA beziehungsweise FAPA-d3 kann nicht eindeutig bestimmt werden. Da die im Vorfeld festgelegte Bestimmungsgrenze dadurch nicht erreichen werden konnte, wurde FAPA nach der Validierung aus der Methode Amphenicole in Milch und Milchprodukten gestrichen.

4.3 Analysebedingungen

Beide Methoden haben bis auf das Injektionsvolumen die gleichen Einstellungen der HPLC-MS/MS. Bei der Methode in Anlehnung an die Norm werden 5 μ l und bei der Schnellmethode werden 40 μ l eingespritzt.

Die Parameter der HPLC sind in der Tabelle 4.1 veranschaulicht.

Tabelle 4.1: Parameter der HPLC

Mobile Phase	Laufmittel A: Wasser, 5 mmol/L Ammoniumacetat		
	Laufmittel B: Methanol, 5 mmol/L Ammoniumacetat		
Säule	Agilent Technologies Säule RRHD Eclipse Plus C18 2,1 mm x 100 mm; 1,8 μ m		
Injektionsvolumen des Standards/der Probe	5 μ l beziehungsweise 40 μ l		
Probengeber-Thermostat	8 °C		
Fluss	0,4 ml/min		
Säulentemperatur	40 °C		
Gesamte Laufzeit	15 min		
Gradient der HPLC	Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
	0	95	5
	2	95	5
	12	5	95
	12.1	95	5
	15	95	5

Die Einstellungen der Ionenquelle sind aus der Tabelle 4.2 zu entnehmen.

Tabelle 4.2: Einstellungen der Ionenquelle

Gastemperatur	200 ° C
Gasfluss	15 l/min
Metallkapillare (Nebulizer)	30 psi
Sprühgastemperatur	375 ° C
Sprühgasfluss	11 l/min
Kapillarspannung	3500 V (Positive) / 3000 V (Negative)
Düsenanspannung	300 V (Positive) / 500 V (Negative)

Die Detektion erfolgt durch die MRM-Methode, wo zwischen positiv und negativ gewechselt wird. In der Tabelle 4.3 sind alle relevanten Parameter der MRM-Methode aufgelistet.

Tabelle 4.3: Parameter der MRM-Methode

Analyt	Retentionszeit [min]	Vorläufer-Ion m/z	Produkt-Ion m/z	CE [eV]	CAV [eV]	ESI	Quantifier/Qualifier
CAP	7,0	321	152	10	1	Negative	Quantifier
		321	257	1	1	Negative	Qualifier
		323	152	10	1	Negative	Qualifier
CAP-d5	7,0	326	157	20	1	Negative	Quantifier
		328	157	20	3	Negative	Qualifier
FAP	6,1	356	336	5	5	Negative	Quantifier
		360	340	5	5	Negative	Qualifier
FAP-d3	6,1	359	339	1	8	Negative	Quantifier
		361	341	1	8	Negative	Qualifier
FAPA	2,6	248	130	15	5	Positive	Quantifier
		248	230	10	3	Positive	Qualifier
FAPA-d3	2,6	251	233	5	1	Positive	Quantifier
		251	131	20	1	Positive	Qualifier
		251	130	20	1	Positive	Qualifier
TAP	5,1	354	185	25	5	Negative	Qualifier
		354	290	5	8	Negative	Qualifier
TAP-d3	5,1	357	188	15	1	Negative	Quantifier
		357	293	5	1	Negative	Qualifier

4.4 Durchführung

4.4.1 Standardserie

4.4.1.1 Stammlösungen der Standardsubstanzen (1000 mg/l)

Es werden $10 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ der jeweiligen Standardsubstanz in je einen 10 ml Messkolben eingewogen und in 10 ml Methanol gelöst. Die Stammlösungen werden bei -18°C gelagert und sind nach Norm mindestens ein Jahr haltbar.

4.4.1.2 Stammlösungen der isotoopenmarkierten Standardsubstanzen (1000 mg/l beziehungsweise 100 mg/l)

Für FAPA-d3 und TAP-d3:

Ebenso werden $10 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ der jeweiligen isotoopenmarkierten Standardsubstanzen in je einen 10 ml Messkolben eingewogen und in 10 ml Methanol gelöst. Die Lösungen haben somit eine Konzentration von 1000 mg/l. Die Stammlösungen sind bei -18°C laut Norm mindestens ein Jahr stabil.

Für CAP-d5 und FAP-d3:

1 mg der jeweiligen isotoopenmarkierten Standardsubstanzen wird je in einen 10 ml Messkolben mittels Ethanol aufgelöst. Diese Lösungen erhalten somit eine Konzentration von 100 mg/l. Nach Norm sind die Stammlösungen bei -18°C mindestens ein Jahr verwendbar.

4.4.1.3 Isotoopenmarkierte Standardsubstanzen (ISTD-Mischstandard)

Von der TAP-d3- Stammlösung wird zunächst eine Verdünnung in der Konzentration 250 mg/l hergestellt. Hierzu werden $250 \mu\text{l}$ der 1000 mg/l Stammlösung in einen 1 ml Messkolben gegeben und bis zur Marke mit Ethanol aufgefüllt.

Aus der FAPA-d3-Stammlösung muss zuerst eine Verdünnung in der Konzentration von 100 mg/l hergestellt werden. Hierzu werden $100 \mu\text{l}$ der 1000 mg/l Stammlösung in einen 1 ml Messkolben pipettiert und in insgesamt 1 ml Ethanol gelöst.

Von den Lösungen CAP-d5, FAP-d3 und FAPA-d3 (jeweils mit der Konzentration von 100 mg/l) werden jeweils $100 \mu\text{l}$ in einem 10 ml Messkolben vorgelegt und bis zur Marke mit Ethanol aufgefüllt. Diese hergestellte Lösung hat eine Konzentration von 1 mg/l von CAP-d5, FAP-d3 und FAPA-d3. Dann werden $500 \mu\text{l}$ von der zuvor hergestellten Lösung 1 mg/l von

CAP-d5, FAP-d3 und FAPA-d3 und 100 μl der TAP-d3- Lösung (Konzentration von 250 mg/l) in einen 10 ml Messkolben pipettiert und mit Ethanol auf 10 ml aufgefüllt.

Dies ist dann der ISTD-Mischstandard mit den Konzentrationen von 50 $\mu\text{g/l}$ für CAP-d5, FAP-d3 und FAPA-d3 beziehungsweise 2500 $\mu\text{g/l}$ für TAP-d3.

4.4.1.4 ISTD-Lösung für die Proben

Der hergestellte ISTD-Mischstandard wird 1:2 mit Ethanol verdünnt.

4.4.1.5 Mischstandards

CAP, FAP, FAPA-Mischstandard:

Aus den CAP-, FAP-, und FAPA-Stammlösungen wird zunächst eine Verdünnung mit der Konzentration 10 mg/l hergestellt. Hierzu werden jeweils 100 μl der 1000 mg/l Stammlösung in einen 10 ml Messkolben pipettiert und nachfolgend in insgesamt 10 ml Ethanol gelöst. Von der so erhaltenen Mischstandard-Lösung (CAP, FAP, FAPA mit 10 mg/l) werden 100 μl in einen weiteren 10 ml Messkolben gefüllt und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt. Dieser Mischstandard enthält eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/l}$ CAP, FAP und FAPA.

TAP-Standard:

Aus der 1000 mg/l TAP-Stammlösung werden 100 μl in einen 1 ml Messkolben pipettiert und mit Ethanol auf 1 ml aufgefüllt. Dieser Standard enthält eine Konzentration von 100 mg/l TAP.

CAP, FAP, FAPA, TAP-Mischstandard:

Um den CAP, FAP, FAPA, TAP-Mischstandard herzustellen, werden 1 ml von dem CAP, FAP, FAPA-Mischstandard (100 $\mu\text{g/l}$) und 200 μl von dem TAP-Standard (100 mg/l) in einen 10 ml Messkolben pipettiert und mit der Lösung Anfangsbedingung des HPLC-Gradienten bis zur Marke aufgefüllt. Dieser Mischstandard enthält eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/l}$ CAP, FAP, FAPA und 2000 $\mu\text{g/l}$ TAP.

4.4.1.6 Kalibrierstandards

Um die Kalibrierstandards herzustellen werden verschiedene Volumen des CAP, FAP, FAPA, TAP-Mischstandards mit einem fixen Volumen von 100 μl des ISTD-Mischstandards in einem 10 ml Messkolben vorgelegt und mit der Lösung Anfangsbedingung des HPLC-Gradienten auf 10 ml aufgefüllt. Dies ist in dem Fließschema in der Abbildung 4.7 veranschaulicht. Ganz oben

steht das Kalibrations-Level (L) und darunter die Verdünnung mit dem Volumen des CAP, FAP, FAPA, TAP-Mischstandards. Weiters sind auch die erhaltenen Konzentrationen von CAP, FAP, FAPA und TAP ersichtlich.

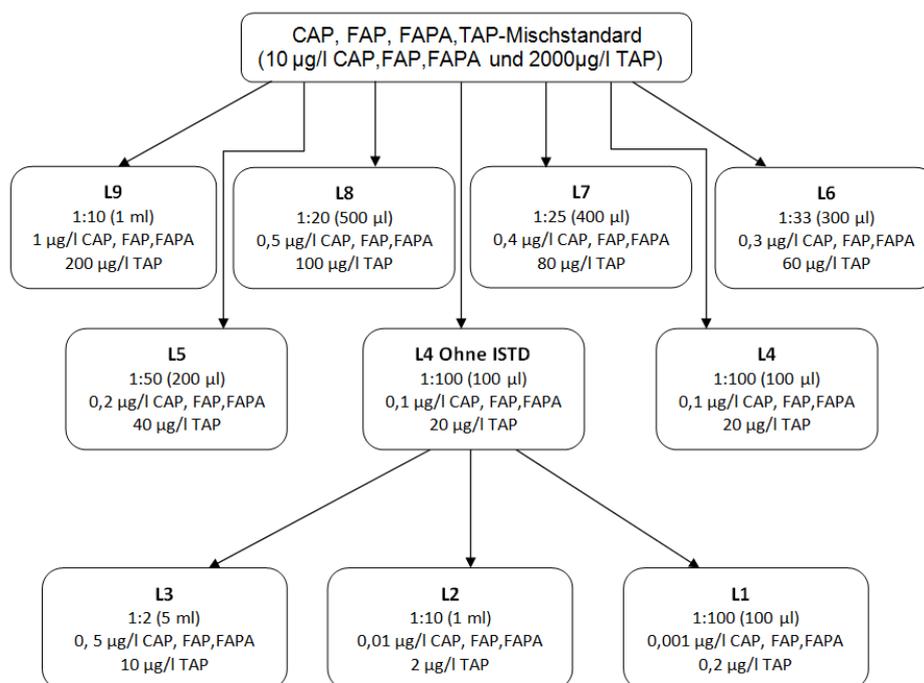


Abbildung 4.7: Verdünnungsschema der Kalibrierstandards für beide Methoden

In der Abbildung 4.7 sind die Levels L10 und L0 nicht abgebildet. Für L10 wird zuerst der ISTD-Mischstandard 1:100 verdünnt (100 µl werden in 10 ml Ethanol gelöst). Danach werden jeweils 500 µl des ISTD-Mischstandards und des CAP, FAP, FAPA, TAP-Mischstandards gut vermischt. Somit hat L10 eine Konzentration von 5 µg/l CAP, FAP, FAPA und 1000 µg/l TAP. Für L0 wird nur der ISTD-Mischstandard in einem 10 ml Messkolben vorgelegt und mit der Lösung Anfangsbedingung des HPLC-Gradienten bis zur Marke aufgefüllt.

Bei diesem Verdünnungsschema wurde davon ausgegangen, dass die Stammlösungen jeweils eine Konzentration von 1000 mg/l beziehungsweise 100 mg/l haben. Jedoch muss für die Berechnung der Konzentration die Einwaage und die Reinheit des Wirkstoffes miteinbezogen werden. Dies erfolgt nach der Formel 4.1.

$$c = EW \cdot \frac{p}{100} \cdot \frac{1000}{V} \quad (\text{Formel 4.1})$$

c ... Konzentration des Wirkstoffes [mg/l]

EW ... Einwaage des Wirkstoffes [mg]

p ... Reinheit des Wirkstoffes [%]

V ... Volumen des Messkolbens [ml]

Die berechneten Konzentrationen der Wirkstoffe sind in der Tabelle 4.4 aufgelistet.

Tabelle 4.4: Berechnete Konzentrationen der Wirkstoffe mit allen Angaben, die zur Berechnung benötigt werden.

Wirkstoff	EW [mg]	Reinheit [%]	Volumen des Messkolbens [ml]	Berechnete Konzentration [mg/l]
CAP	10,0	98	10	980
FAP	10,0	98	10	980
FAPA	10,0	99,6	10	996
TAP	10,0	98	10	980
CAP-d5	1,0	99,5	10	99,5
FAP-d3	1,0	98,9	10	98,9
FAPA-d3	10,0	98,8	10	988
TAP-d3	10,0	98,7	10	987

Wenn die berechnete Konzentration des Wirkstoffes nun in das obere Fließschema (Abbildung 4.7) eingesetzt werden, wird die genauen Konzentrationen der verschiedenen Kalibrations-Levels (L0-L10) erhalten, die aus der Tabelle 4.5 zu entnehmen sind.

Tabelle 4.5: Konzentrationen der Kalibrations-Levels

Kalibrations-level	CAP [µg/l]	FAP [µg/l]	FAPA [µg/l]	TAP [µg/l]	CAP-d5 [µg/l]	FAP-d3 [µg/l]	FAPA-d3 [µg/l]	TAP-d3 [µg/l]
L10	4,900	4,900	4,980	980,0	0,498	0,495	0,494	24,7
L9	0,980	0,980	0,996	196,0	0,498	0,495	0,494	24,7
L8	0,490	0,490	0,498	98,0	0,498	0,495	0,494	24,7
L7	0,392	0,392	0,398	78,4	0,498	0,495	0,494	24,7
L6	0,294	0,294	0,299	58,8	0,498	0,495	0,494	24,7
L5	0,196	0,196	0,199	39,2	0,498	0,495	0,494	24,7
L4	0,098	0,098	0,100	19,6	0,498	0,495	0,494	24,7
L3	0,049	0,049	0,050	9,8	0,498	0,495	0,494	24,7
L2	0,010	0,010	0,010	1,96	0,498	0,495	0,494	24,7
L1	0,001	0,001	0,0001	0,196	0,498	0,495	0,494	24,7
L0	0	0	0	0	0,498	0,495	0,494	24,7

4.4.2 Probenahme für beide Methoden

Flüssige Proben (z.B. Milch) werden geschüttelt, homogene Proben (z.B. Frischkäse) werden durchgerührt und feste inhomogene Proben (z.B. Käse, Frischkäse mit Kräutern) werden mit Hilfe eines Robot Coupe oder Grindomix mit Trockeneis zerkleinert.

5 g ± 0,1 g von der homogenisierten Probe werden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen.

4.4.3 Probenaufarbeitung in Anlehnung an die Norm BVL L 06.00-60

4.4.3.1 Hydrolyse

Nach der Zugabe von 100 µl ISTD-Lösung, 50 µl Glucuronidase/Arylsulfatase sowie 5 ml (bei Milch und Frischkäse) beziehungsweise 8 ml (bei Käse) Acetatpuffer pH = 4,8 erfolgt die Hydrolyse im Wasserbad bei 37 ° C für zwei Stunden.

4.4.3.2 Extraktion

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur im kalten Wasser erfolgt der Zusatz von 10 ml Ethylacetat und 2 ml Ammoniumhydroxidlösung. Es wird 1 min schonend mit dem Überkopfschüttler extrahiert. Bei Gelbildung (bei Milch) kann eine Verdoppelung der Ethylacetatmenge hilfreich sein. Das Homogenisat wird 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wird vollständig abgenommen, in einen 100 ml Spitzkolben überführt und bei 50 ° C am Rotavapor bis zur Trockene abrotiert. Der Rückstand wird in 2 ml n-Hexan gelöst (30 sec Vortexer und

30 sec Ultraschallbad), in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 0,5 ml der Lösung Anfangsbedingungen des HPLC-Gradienten extrahiert (30 sec Vortexer).

Anschließend wird 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Die obere organische Phase wird verworfen. Die wässrige Phase wird in einem WhatmanTMMini-UniPrepTMVial 0,2 μ m filtriert und für die Messung mittels HPLC-MS/MS verwendet. Bei manchen Proben (z.B. bei Camembert) wurde beobachtet, dass bei der wässrigen Phase eine weißliche Phase entsteht. Dann kann es von Vorteil sein, erneut zu zentrifugieren.

4.4.4 Probenaufarbeitung nach der Schnellmethode

Die Hydrolyse im Wasserbad bei 37 °C für zwei Stunden erfolgt nach der Zugabe von 100 μ l ISTD-Lösung, 50 μ l Glucuronidase/Arylsulfatase sowie 5 ml (bei Milch und Frischkäse) beziehungsweise 8 ml (bei Käse) Acetatpuffer pH = 4,8. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur im kalten Wasser kann ein Aliquot der Lösung in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 13400 rpm in der Zentrifuge Eppendorf zentrifugiert werden. Der Überstand wird in einem WhatmanTMMini-UniPrepTMVial 0,2 μ m filtriert und direkt der Messung mittels HPLC-MS/MS zugeführt.

4.5 Methodenvalidierung

Da die Proben keinen Gehalt der gesuchten Antibiotika enthalten, kann für die Validierung eine Standardaddition vorgenommen werden. Dafür wurde jeder Probenmatrix zweimal ohne und je siebenmal mit drei verschiedene Konzentrationen dotiert analysiert. Somit wird die Wiederfindungsrate in jeder Matrix bestimmt und es wird damit die Präzision der Methode überprüft. Dabei ist auch wichtig, dass diese Bestimmung an verschiedenen Tagen durchgeführt wird, um auch die Zeitunabhängigkeit eines Verfahrens zu gewährleisten.

Von jeder Matrix wurde 23 mal 5 g \pm 0,1 g von der homogenisierten Probe in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen. Zwei davon dienten als Blank (Bl 1, Bl 2), sieben für die Reproduzierbarkeit von niedriger Konzentration (N1-N7), sieben für die Reproduzierbarkeit von mittlerer Konzentration (M1-M7) und sieben für die Reproduzierbarkeit von hoher Konzentration (H1-H7). Dafür wurde jeder Probe bis auf die zwei Blanks mit 100 μ l Dotierlösung mit einer bestimmten Konzentration dotiert, die in der Tabelle 4.6 aufgelistet ist.

Tabelle 4.6: Konzentration der Dotierlösungen für die Validierung

	Konzentration CAP/FAP [$\mu\text{g/l}$]	Konzentration FAPA [$\mu\text{g/l}$]	Konzentration TAP [$\mu\text{g/l}$]
Dotierlösung für N	2,45	2,49	490
Dotierlösung für M	9,80	9,96	1960
Dotierlösung für H	19,60	19,92	3920

Die endgültigen Konzentrationen in der Probe werden nach Formel 4.2 berechnet.

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (\text{Formel 4.2})$$

c ... Konzentration [$\mu\text{g/kg}$]

V ... Volumen [kg]

Daraus ergeben sich folgende Konzentrationen in der Probe, die in der Tabelle 4.7 zu entnehmen sind.

Tabelle 4.7: Konzentration der Dotierlösungen für die Validierung

	Konzentration CAP/FAP in der Probe [$\mu\text{g/kg}$]	Konzentration FAPA in der Probe [$\mu\text{g/l}$]	Konzentration TAP in der Probe [$\mu\text{g/l}$]
N dotiert	0,049	0,050	9,800
M dotiert	0,196	0,199	39,200
H dotiert	0,392	0,398	78,400

Nach dem Dotieren wurden die Proben nach den zwei Methoden aufgearbeitet und analysiert. Diese wurden dann mittels der MassHunter Workstation Software von Agilent (QQQ Quantitative Analysis) ausgewertet. In den Abbildungen 4.8 und 4.9 sind Beispielchromatogramme der Analyten dargestellt. Bei den Auswertungen wurde festgestellt, dass die Ergebnisse von FAPA für beide Methoden nicht verwendbar sind, weil der Matrixeinfluss zu groß ist, siehe dazu Abbildung 4.9c. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse von FAPA in den Ergebnissen aus der Validierung nicht dokumentiert.

4 Ergebnisse der Methodik-Etablierung

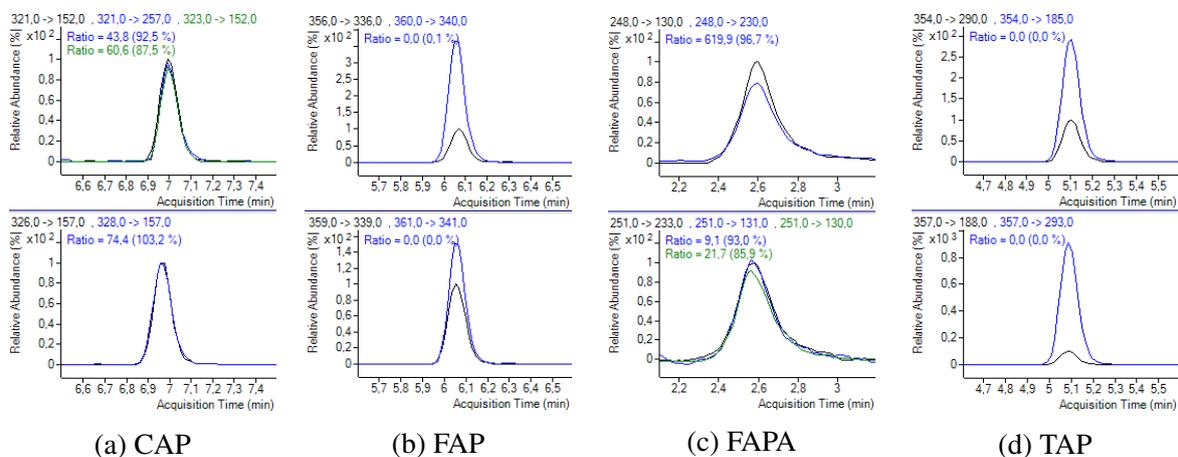


Abbildung 4.8: Beispielchromatogramme der Analyten einer Kalibration, x-Achse: Messzeit [min], y- Achse: Relative Häufigkeit [%]
Oben: Quantifier und Qualifier des Analyten
Unten: Quantifier und Qualifier des isotope-markierten Analyten

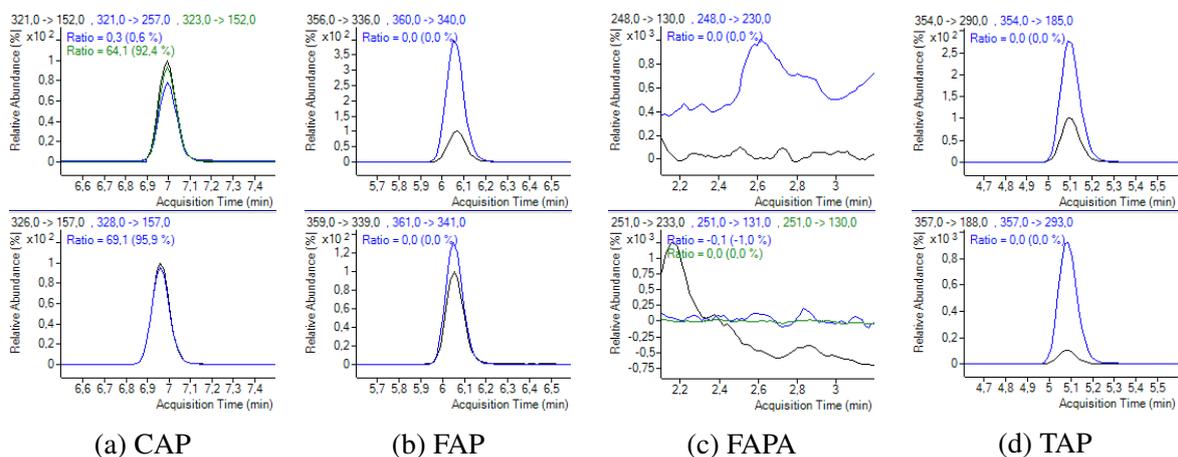


Abbildung 4.9: Beispielchromatogramme der Analyten einer Milchprobe, x-Achse: Messzeit [min], y- Achse: Relative Häufigkeit [%]
Oben: Quantifier und Qualifier des Analyten
Unten: Quantifier und Qualifier des isotope-markierten Analyten

4.5.1 Ergebnisse aus der Validierung in Anlehnung an die Norm

Für jede Matrix werden die Wiederfindungsraten (WF), die dazugehörigen Standardabweichungen (Stabw.) und der Mittelwert der Messungen (MW) berechnet. Diese werden in den Tabellen 4.8-4.12 veranschaulicht.

In den Tabellen 4.8, 4.10 und 4.12 wurden manche Ergebnisse rot markiert. Diese rot-markierten Ergebnisse wurden dann nicht zur Berechnung der Wiederfindung berücksichtigt, weil bei diesen Messungen die Signalintensität zu gering war. Bei der Rohmilch (Tabelle 4.8, Ergebnisse H2) und beim Camembert (Tabelle 4.10, Ergebnisse N3) waren die Signalintensität von den Analyten und den isopenmarkierten Standards auf einmal gegenüber den anderen Messungen sehr niedrig. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse verfälscht und konnten nicht verwendet werden. Beim Emmentaler (Tabelle 4.12, Ergebnisse M4) waren nur die Signalintensität der Analyte niedrig, was darauf schließen lässt, dass die Dotierlösung zu pipettieren vergessen wurde.

Tabelle 4.8: Ergebnisse der Validierung von Rohmilch

	Analyt		
	CAP	FAP	TAP
Bl 1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,001	0,016
Bl 2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,001	0,032
Soll-Wert N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,049	0,049	9,800
N1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,040	0,047	8,168
N2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,035	0,040	8,874
N3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,035	0,039	8,524
N4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,038	0,047	8,763
N5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,039	0,048	8,960
N6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,041	0,047	8,889
N7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,049	0,047	9,240
MW N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,040	0,045	8,774
WF N [%]	80,78	91,85	89,53
Stabw. N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,005	0,004	0,343
Soll-Wert M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,196	0,196	39,200
M1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,189	0,181	38,743
M2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,170	0,165	40,375
M3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,192	0,190	35,446
M4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,190	0,181	37,364
M5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,198	0,146	36,562
M6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,183	0,156	35,831
M7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,179	0,196	34,901
MW M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,186	0,174	37,032
WF M [%]	94,83	88,59	94,47
Stabw. M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,009	0,018	1,955
Soll-Wert H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,392	0,392	78,400
H1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,375	0,387	75,061
H2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,810	0,292	63,009
H3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,383	0,365	70,601
H4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,376	0,376	72,717
H5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,358	0,357	74,619
H6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,339	0,348	72,935
H7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,313	0,383	71,634
MW H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,357	0,369	72,928
WF H [%]	91,20	94,21	93,02
Stabw. H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,027	0,015	1,705

Tabelle 4.9: Ergebnisse der Validierung in Anlehnung an die Norm von Frischkäse

	Analyt		
	CAP	FAP	TAP
Bl 1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,002	0,008
Bl 2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,001	0,005
Soll-Wert N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,049	0,049	9,800
N1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,039	0,041	8,864
N2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,036	0,038	8,404
N3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,031	0,038	8,378
N4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,043	0,043	8,630
N5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,039	0,045	9,180
N6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,042	0,048	9,190
N7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,042	0,049	9,022
MW N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,039	0,043	8,810
WF N [%]	79,24	87,98	89,89
Stabw. N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,004	0,004	0,345
Soll-Wert M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,196	0,196	39,200
M1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,177	0,169	37,949
M2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,164	0,166	38,227
M3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,181	0,179	37,428
M4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,187	0,189	38,030
M5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,168	0,151	38,406
M6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,147	0,147	37,252
M7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,167	0,189	33,567
MW M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,170	0,170	37,265
WF M [%]	86,70	86,70	95,07
Stabw. M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,013	0,017	1,682
Soll-Wert H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,392	0,392	78,400
H1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,358	0,390	74,268
H2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,361	0,395	74,111
H3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,358	0,337	69,002
H4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,383	0,392	70,210
H5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,344	0,368	76,372
H6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,320	0,359	74,309
H7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,366	0,380	68,043
MW H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,356	0,374	72,331
WF H [%]	90,71	95,53	92,26
Stabw. H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,020	0,021	3,192

Tabelle 4.10: Ergebnisse der Validierung in Anlehnung an die Norm von Camembert

	Analyt		
	CAP	FAP	TAP
Bl 1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,004	0,019
Bl 2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,003	0,010
Soll-Wert N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,049	0,049	9,800
N1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,039	0,048	8,388
N2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,038	0,041	8,496
N3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,073	0,054	9,278
N4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,040	0,049	8,431
N5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,041	0,047	8,767
N6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,041	0,050	9,335
N7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,041	0,052	8,698
MW N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,040	0,048	8,686
WF N [%]	81,66	97,07	88,63
Stabw. N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,001	0,004	0,352
Soll-Wert M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,196	0,196	39,200
M1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,185	0,178	36,921
M2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,170	0,177	39,853
M3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,181	0,179	37,428
M4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,185	0,188	38,498
M5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,176	0,152	38,105
M6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,183	0,153	37,837
M7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,167	0,190	32,854
MW M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,178	0,174	37,357
WF M [%]	90,92	88,69	95,30
Stabw. M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,007	0,015	2,191
Soll-Wert H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,392	0,392	78,400
H1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,414	0,400	76,566
H2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,365	0,374	67,619
H3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,384	0,351	65,296
H4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,412	0,387	69,267
H5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,369	0,365	73,030
H6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,362	0,347	71,750
H7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,367	0,382	66,331
MW H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,382	0,372	69,980
WF H [%]	97,46	94,94	89,26
Stabw. H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,022	0,019	4,024

Tabelle 4.11: Ergebnisse der Validierung in Anlehnung an die Norm von Edamer

	Analyt		
	CAP	FAP	TAP
Bl 1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,003	0,049
Bl 2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,004	0,014
Soll-Wert N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,049	0,049	9,800
N1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,046	0,049	9,006
N2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,039	0,042	8,856
N3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,036	0,041	8,338
N4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,040	0,049	8,632
N5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,040	0,047	8,301
N6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,042	0,048	9,480
N7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,041	0,052	9,331
MW N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,041	0,047	8,849
WF N [%]	83,13	95,44	90,30
Stabw. N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,003	0,004	0,459
Soll-Wert M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,196	0,196	39,200
M1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,193	0,182	37,082
M2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,163	0,170	38,354
M3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,180	0,192	35,462
M4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,183	0,188	37,442
M5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,163	0,150	35,871
M6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,169	0,149	35,070
M7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,187	0,184	33,339
MW M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,177	0,174	36,089
WF M [%]	90,28	88,62	92,06
Stabw. M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,012	0,018	1,683
Soll-Wert H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,392	0,392	78,400
H1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,340	0,363	79,832
H2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,361	0,391	67,730
H3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,355	0,382	66,408
H4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,359	0,350	67,955
H5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,372	0,378	76,129
H6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,352	0,377	78,934
H7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,355	0,373	75,282
MW H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,356	0,374	73,181
WF H [%]	90,90	95,29	93,34
Stabw. H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,010	0,013	5,676

Tabelle 4.12: Ergebnisse der Validierung in Anlehnung an die Norm von Emmentaler

	Analyt		
	CAP	FAP	TAP
Bl 1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,003	0,021
Bl 2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,003	0,017
Soll-Wert N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,049	0,049	9,800
N1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,038	0,043	9,611
N2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,044	0,042	8,730
N3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,036	0,040	9,280
N4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,038	0,052	8,514
N5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,040	0,050	8,216
N6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,046	0,050	9,333
N7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,041	0,050	9,239
MW N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,040	0,047	8,989
WF N [%]	82,20	95,72	91,73
Stabw. N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,003	0,005	0,507
Soll-Wert M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,196	0,196	39,200
M1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,172	0,176	37,752
M2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,176	0,167	39,706
M3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,182	0,200	38,426
M4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,002	0,024
M5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,191	0,155	37,726
M6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,182	0,159	35,039
M7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,169	0,181	34,683
MW M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,179	0,173	37,222
WF M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	91,18	88,20	94,95
Stabw. M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,008	0,016	1,968
Soll-Wert H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,392	0,392	78,400
H1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,366	0,391	78,285
H2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,359	0,361	67,313
H3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,376	0,378	75,480
H4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,357	0,372	71,769
H5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,364	0,396	79,850
H6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,364	0,377	76,807
H7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,345	0,376	72,481
MW H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,361	0,379	74,569
WF H [%]	92,21	96,62	95,11
Stabw. H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,010	0,012	4,328

Um die Wiederfindungsraten von allen Matrices besser vergleichen zu können, werden diese in der Tabelle 4.13 noch einmal aufgelistet.

Tabelle 4.13: Wiederfindungsraten von allen Matrices (Anlehnung an die Norm)

Analyt	Matrix	WF N [%]	WF M [%]	WF H [%]	WF [%]
CAP	Rohmilch	80,8	94,8	91,2	88,9
	Frischkäse	79,2	86,7	90,7	85,6
	Camembert	81,7	90,9	97,5	90,0
	Edamer	83,1	90,3	90,9	88,1
	Emmentaler	82,2	91,2	92,2	88,5
FAP	Rohmilch	91,9	88,6	94,2	91,6
	Frischkäse	88,0	86,7	95,5	90,1
	Camembert	97,1	88,7	94,9	93,6
	Edamer	95,4	88,6	95,3	93,1
	Emmentaler	95,7	88,2	96,6	93,5
TAP	Rohmilch	89,5	94,5	93,0	92,3
	Frischkäse	89,9	95,1	92,3	92,4
	Camembert	88,6	95,3	89,3	91,1
	Edamer	90,3	92,1	93,3	91,9
	Emmentaler	91,7	95,0	95,1	93,9

Anhand der Tabelle 4.13 ist zu erkennen, dass die Wiederfindungsrate von CAP bei allen fünf Matrices am schlechtesten ist, jedoch noch in einem akzeptierbaren Bereich. Die Wiederfindungsraten von FAP und TAP sind nicht viel höher als von CAP. Weiters ist zu sehen, dass die Wiederfindung der Analyte in jeder Matrix nicht weit auseinander liegen. Auf Grund dieses Ergebnisses wurde festgestellt, dass die Norm BVL L 06.00-60, die eigentlich nur für Milch und Muskel gilt, auch für Milchprodukte anwendbar ist.

4.5.2 Ergebnisse aus der Validierung nach der Schnellmethode:

Bei dieser Validierung wurde zuerst ein Versuch mit anderen Milch- und Käse-Proben für Bl 1 und M1 gemacht. Danach wurde zeitgleich mit der anderen Methode validiert und Bl 1 und M1 sollte für alle Matrices nachvalidiert werden. Da die Auswertung für eine quantitative Bestimmung nicht möglich war, wurde die Nachvalidierung nicht gemacht. Bei der Auswertung wurde auch festgestellt, dass auch die Signalintensität von den isotope markierten Standards in jeder Matrix verschieden sind und diese daher nicht miteinander vergleichen kann. Somit ist es schwierig in einer Messserie einen „Ausreißer“ zu erkennen. Damit ist gemeint, dass es nicht möglich ist, einen Analytverlust bei der Aufarbeitung zu erkennen, wie bei der oberen erwähnten Methode in Anlehnung an die Norm.

Auch hier wurde wie oben die Wiederfindung (WF), die dazugehörigen Standardabweichungen (Stabw.) und der Mittelwert der Messungen (MW) berechnet. Diese sind in den Tabellen 4.14-4.18 dargestellt.

Die rot markierten Ergebnisse in den Tabellen 4.16, 4.17 und 4.18 werden nicht zur Berechnung der Wiederfindungsrate miteinbezogen. Beim Camembert (Tabelle 4.16, Ergebnis N4 und N5) und beim Edamer (Tabelle 4.17, Ergebnis N7) stimmt bei CAP der Quantifier mit den Qualifieren nicht überein. Somit können diese Ergebnisse nicht berücksichtigt werden. Jedoch dürfte beim Emmentaler (Tabelle 4.18, Ergebnisse M4) die Dotierlösung zu pipettieren vergessen worden sein, weil keiner der drei Analyte gemessen wurde.

Tabelle 4.14: Ergebnisse der Validierung nach der Schnellmethode von Rohmilch

	Analyt		
	CAP	FAP	TAP
BI 2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,0000	0,0004	0,0000
Soll-Wert N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,049	0,049	9,800
N1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,047	0,054	9,926
N2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,040	0,049	9,657
N3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,046	0,041	9,266
N4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,050	0,048	10,003
N5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,044	0,050	9,112
N6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,039	0,057	10,588
N7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,050	0,065	10,943
MW N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,045	0,052	9,928
WF N [%]	92,44	105,96	101,30
Stabw. N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,004	0,008	0,664
Soll-Wert M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,196	0,196	39,200
M2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,180	0,201	39,623
M3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,181	0,175	42,954
M4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,193	0,202	46,099
M5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,182	0,171	48,510
M6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,194	0,193	42,274
M7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,175	0,174	38,637
MW M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,184	0,186	43,016
WF M [%]	93,84	94,89	109,74
Stabw. M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,008	0,014	3,766
Soll-Wert H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,392	0,392	78,400
H1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,407	0,352	78,565
H2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,338	0,344	72,278
H3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,299	0,341	80,007
H4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,333	0,323	77,362
H5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,407	0,345	74,569
H6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,426	0,328	73,589
H7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,562	0,361	82,760
MW H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,396	0,342	77,018
WF H [%]	101,03	87,23	98,24
Stabw. H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,095	0,014	4,046

Tabelle 4.15: Ergebnisse der Validierung nach der Schnellmethode von Frischkäse

	Analyt		
	CAP	FAP	TAP
Bl 2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,0000	0,0003	0,0000
Soll-Wert N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,049	0,049	9,800
N1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,048	0,057	8,760
N2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,051	0,047	7,740
N3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,053	0,057	8,641
N4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,052	0,057	9,450
N5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,044	0,055	9,212
N6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,054	0,059	10,434
N7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,047	0,065	10,371
MW N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,050	0,057	9,230
WF N [%]	101,65	115,39	94,18
Stabw. N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,003	0,005	0,965
Soll-Wert M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,196	0,196	39,200
M2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,200	0,214	38,378
M3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,211	0,208	44,042
M4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,222	0,198	41,746
M5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,220	0,304	39,424
M6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,201	0,301	39,533
M7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,216	0,175	37,713
MW M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,212	0,233	40,139
WF M [%]	108,05	119,00	102,40
Stabw. M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,009	0,055	2,353
Soll-Wert H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,392	0,392	78,400
H1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,433	0,354	80,167
H2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,378	0,296	74,781
H3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,339	0,313	76,638
H4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,419	0,317	70,931
H5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,482	0,333	70,097
H6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,500	0,335	77,146
H7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,364	0,455	72,040
MW H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,416	0,343	74,543
WF H [%]	106,19	87,54	95,08
Stabw. H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,065	0,057	3,001

Tabelle 4.16: Ergebnisse der Validierung nach der Schnellmethode von Camembert

	Analyt		
	CAP	FAP	TAP
Bl 2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,0000	0,0000	0,0000
Soll-Wert N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,049	0,049	9,800
N1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,099	0,083	11,463
N2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,078	0,034	9,177
N3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,067	0,061	9,232
N4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,033	10,256
N5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,099	10,773
N6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,119	0,104	11,120
N7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,111	0,090	11,986
MW N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,095	0,072	10,572
WF N [%]	193,44	146,99	107,88
Stabw. N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,022	0,030	1,078
Soll-Wert M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,196	0,196	39,200
M2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,277	0,203	40,065
M3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,199	0,257	41,103
M4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,298	0,208	39,968
M5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,462	0,317	40,123
M6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,253	0,193	40,178
M7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,286	0,235	40,686
MW M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,296	0,236	40,354
WF M [%]	151,00	120,17	102,94
Stabw. M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,088	0,046	0,445
Soll-Wert H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,392	0,392	78,400
H1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,388	0,355	84,919
H2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,384	0,204	74,740
H3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,266	0,312	71,663
H4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,441	0,361	89,121
H5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,291	0,332	71,080
H6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,478	0,461	69,522
H7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,630	0,854	120,990
MW H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,411	0,411	83,148
WF H [%]	104,84	104,91	106,06
Stabw. H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,134	0,228	20,005

Tabelle 4.17: Ergebnisse der Validierung nach der Schnellmethode von Edamer

	Analyt		
	CAP	FAP	TAP
Bl 2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,0000	0,0000	0,0000
Soll-Wert N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,049	0,049	9,800
N1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,021	0,038	8,831
N2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,044	0,073	7,819
N3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,082	0,044	8,774
N4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,059	0,061	11,113
N5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,051	0,072	11,217
N6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,081	0,044	10,437
N7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,045	13,356
MW N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,056	0,054	10,221
WF N [%]	115,13	109,71	104,29
Stabw. N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,024	0,015	1,891
Soll-Wert M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,196	0,196	39,2
M2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,254	0,228	39,723
M3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,173	0,269	41,745
M4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,138	0,204	43,621
M5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,300	0,259	39,858
M6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,223	0,243	46,400
M7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,185	0,206	41,209
MW M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,212	0,235	42,093
WF M [%]	108,25	119,70	107,38
Stabw. M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,059	0,027	2,545
Soll-Wert H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,392	0,392	78,400
H1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,531	0,356	81,935
H2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,375	0,325	80,007
H3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,446	0,340	81,020
H4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,425	0,370	69,735
H5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,535	0,322	70,399
H6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,780	0,313	88,506
H7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,289	0,609	83,530
MW H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,483	0,376	79,305
WF H [%]	123,22	96,03	101,15
Stabw. H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,170	0,114	7,425

Tabelle 4.18: Ergebnisse der Validierung nach der Schnellmethode von Emmentaler

	Analyt		
	CAP	FAP	TAP
Bl 2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,0000	0,0000	0,0000
Soll-Wert N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,049	0,049	9,800
N1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,048	0,073	10,843
N2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,053	0,043	9,813
N3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,050	0,055	9,601
N4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,048	0,057	9,275
N5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,060	0,046	9,970
N6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,061	0,076	10,084
N7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,041	0,075	10,248
MW N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,052	0,061	9,976
WF N [%]	105,43	123,77	101,80
Stabw. N [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,007	0,014	0,499
Soll-Wert M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,196	0,196	39,200
M2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,204	0,195	40,288
M3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,196	0,203	40,152
M4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,000	0,000	0,000
M5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,182	0,291	37,272
M6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,247	0,183	34,974
M7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,253	0,189	38,918
MW M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,217	0,212	38,321
WF M [%]	110,49	108,22	97,76
Stabw. M [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,032	0,045	2,229
Soll-Wert H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,392	0,392	78,400
H1 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,419	0,338	85,867
H2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,489	0,325	71,382
H3 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,364	0,318	72,651
H4 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,359	0,345	73,200
H5 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,566	0,357	73,108
H6 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,660	0,367	81,822
H7 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,458	0,563	83,351
MW H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,474	0,373	77,340
WF H [%]	120,79	95,22	98,65
Stabw. H [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,117	0,092	5,228

Um den Vergleich der Wiederfindungsraten von allen Matrices besser vornehmen zu können, werden diese in der Tabelle 4.19 zusammengefasst.

Tabelle 4.19: Wiederfindungsraten von allen Matrices (Schnellmethode)

Analyt	Matrix	WF N [%]	WF M [%]	WF H [%]	WF [%]
CAP	Rohmilch	92,4	93,8	101,0	95,8
	Frischkäse	101,6	108,0	106,2	105,3
	Camembert	193,4	151,0	104,8	149,8
	Edamer	115,1	108,2	123,2	115,5
	Emmentaler	105,4	110,5	120,8	112,2
FAP	Rohmilch	106,0	94,9	87,2	96,0
	Frischkäse	115,4	119,0	87,5	107,3
	Camembert	147,0	120,2	104,9	124,0
	Edamer	109,7	119,7	96,0	108,5
	Emmentaler	123,8	108,2	95,2	109,1
TAP	Rohmilch	101,3	109,7	98,2	103,1
	Frischkäse	94,2	102,4	95,1	97,2
	Camembert	107,9	102,9	106,1	105,6
	Edamer	104,3	107,4	101,2	104,3
	Emmentaler	101,8	97,8	98,6	99,4

In der Tabelle 4.19 ist ersichtlich, dass die Wiederfindungsraten, die rot markiert sind, zu hoch und somit nicht zu akzeptieren sind. Die Wiederfindungsraten sollten zwischen 70 und 110 % liegen [34]. Da aber diese Schnellmethode nur für eine qualitative Bestimmung anwendbar ist, kann daher eine höhere Wiederfindungsrate insofern akzeptiert werden, denn es ist besser ein falsch positives Ergebnis mit der Methode in Anlehnung an die Norm abzusichern als ein falsch negatives Ergebnis abzugeben.

4.5.3 Ermittlung der Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze über die Kalibrierfunktion für die Methode in Anlehnung an die Norm

Diese Kenndaten werden statistisch mittels eines Programms (SQS- Statische Auswertung der Kalibration) ausgewertet. Die analytischen Grenzwerte werden laut DIN 38 645 berechnet.

Die **Nachweisgrenze** (limit of detection, LOD) ist für CAP und FAP 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und für TAP 2,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Für CAP ist die **Erfassungsgrenze** mit der Wahrscheinlichkeit von 95 % 0,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$, für FAP

0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und für TAP 4,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Die **Bestimmungsgrenze** (limit of quantification, LOQ) liegt für CAP bei 0,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$, für FAP bei 0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und für TAP bei 10,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Im Vorfeld wurde für CAP und FAP eine Bestimmungsgrenze von 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und für TAP 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ angestrebt. Dies wurde durch die Methodvalidierung und durch die Ermittlung der Bestimmungsgrenze abgesichert und kann somit verwendet werden.

4.6 Methodenvergleich

4.6.1 Vergleich der Methode in Anlehnung an die Norm mit der Schnellmethode

Die Methode in Anlehnung an die Norm eignet sich für eine quantitative Bestimmung von Amphenicolen in Milch und Milchprodukten. Die Schnellmethode ist jedoch nur für eine qualitative Bestimmung zu verwenden und wenn es ein positives Ergebnis darstellt, muss dieses mittels der Methode in Anlehnung an die Norm bestätigt und quantitativ bestimmt werden.

Die Schnellmethode ist deshalb eine Screening-Methode, weil dieses Verfahren schnell und ohne großen Aufwand anwendbar ist. Sie wurde etabliert, weil die Methode in Anlehnung an die Norm zeitaufwändig und auch kostspieliger als die Schnellmethode ist.

Der Nachteil der Schnellmethode besteht darin, dass das Gerät durch diese Analyse stark verunreinigt wird. Es können maximal zehn Proben in einer Messserie analysiert werden, weil bei dieser Anzahl die Ionenquelle vom Acetatpuffer schon so verschmutzt ist, dass die Ionenquelle unbedingt für weitere Messungen gereinigt werden muss. Weiters wird die HPLC-Säule vom Enzym belegt und kann trotz vorherigem zentrifugieren nicht genug abgetrennt werden, damit kein schneller Schaden an der Säule entsteht. Schon nach der Validierung wurde festgestellt, dass die Säule getauscht werden muss und aus diesem Grund wird dieses Verfahren in Zukunft nicht mehr angewendet.

4.6.2 Vergleich der Methode in Anlehnung an die Norm mit der Norm BVL L 06.00-60

Diese zwei Methoden kann nur für die Matrix Milch miteinander verglichen werden. Dafür werden zuerst in der Tabelle 4.20 die Wiederfindungsraten der Methoden aufgelistet.

Tabelle 4.20: Wiederfindungsraten der Methoden in Milch

Wiederfindungsrate von	Methode in Anlehnung an die Norm	Norm BVL L 06.00-60
CAP	88,90 %	101,80 %
FAP	91,60 %	104,60 %
FAPA	nicht bestimmbar	101,90 %
TAP	92,30 %	101,10 %

Anhand der Tabelle 4.20 ist zu sehen, dass die Wiederfindungsraten von der Norm BVL L 06.00-60 besser sind. Jedoch darf nicht vergessen werden, dass in der Norm BVL L 06.00-60 für FAP und FAPA höhere Dotierlevels verwendet wurden. Wie schon vorher erwähnt, konnte FAPA mit der Methode in Anlehnung an die Norm aufgrund der zu niedrigen Bestimmungsgrenze nicht bestimmt werden.

Der Unterschied zwischen den beiden Verfahren liegt darin, dass die Aufarbeitung etwas verändert wurde und zwar wird in der Norm BVL L 06.00-60 das Ethylacetat bei 50 °C im Stickstoffstrom bis zur Trockene abgeblasen. Bei der Methode in Anlehnung an die Norm wird abrotiert. Weiters wird in der Norm BVL L 06.00-60 eine Matrixkalibration verwendet. Jedoch ist dieses für eine Routineanalyse nicht machbar, weil verschiedene Matrices in einer Messserie analysiert werden und es zu zeitintensiv wäre, für jede Matrix eine Kalibration laufen zu lassen. Allerdings können beide Aufarbeitungsverfahren zu einem Analytverlust führen und somit kann nur mehr die Matrixkalibration der Grund für eine bessere Wiederfindungsrate sein.

4.7 Ringversuch und Akkreditierungsstatus

Für die Methode in Anlehnung an die Norm wurde an einem internationalen Ringversuch für die Bestimmung von Chloramphenicol in lyophilisierter Milch teilgenommen. Bei diesem Ringversuch waren elf Labore beteiligt. Dabei wurden zwei Proben analysiert, wobei eine ein Blank war und bei der anderen 1,37 µg/kg Chloramphenicol gemessen wurde. Dieser Ringversuch wurde mit einem z-Score von -0,56 erfolgreich bestanden. Weiters wurde der Akkreditierungsstatus für die Methode in Anlehnung an die Norm erhalten.

5 Diskussion

Die Problematik des breiten Einsatzes von Antibiotika in der Vergangenheit ist schon seit längerer Zeit bekannt. In den 1960er und 70er Jahren wurden sogar Arzneimittel, die ein breites Wirkungsspektrum gegen Mikroorganismen haben, in Lebensmitteln eingesetzt, um damit die hygienische Sicherheit zu erhöhen. Dadurch kam es aber zu einer Resistenzhöhung von Antibiotika, dem sogenannten „Hospitalismus“. Deshalb wurde der Leitsatz eingeführt, dass Antibiotika, die bei Menschen angewendet werden, nicht in Lebensmitteln verwendet werden dürfen [18].

Weiters können Rückstände von Tierarzneimitteln, die dem Tier zur Erzielung bestimmter Zwecke verabreicht werden, Schaden am Verbraucher verursachen. Diese Rückstände können nachgewiesen werden, wenn die Zeit zwischen dem letzten Einsatz des Tierarzneimittels und der Gewinnung des Lebensmittels (Schlachtung, Melken, Eiablage) nicht ausreichend ist und sich diese Stoffe und/oder deren Um- und Abbauprodukte noch in dem lebenden Schlachttier beziehungsweise der Milchkuh oder der Legehennen befinden [18]. Aus diesem Grund werden in der EU die Rückstandshöchstmengen von Tierarzneimitteln in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in der Verordnung (EU) Nr.37/2010 festgelegt.

Um die Messmethode zur Bestimmung von Amphenicolen in Milch und Milchprodukten zu etablieren, wurde die Norm BVL L 06.00-60 angewendet. Da die Norm BVL L 06.00-60 für Muskel und Milch ausgelegt ist, sollte getestet werden, ob dieses Verfahren auch für Milchprodukte anwendbar ist. Dafür wurden verschiedene Käsesorten ausgewählt. Dabei spielte auch der Fettgehalt der Käseproben eine wichtige Rolle, weil am Schluss der Methode ein Entfettungsschritt, bei dem ein Analytverlust passieren kann, durchzuführen ist.

Im Folgenden werden die kritischen Schritte und analytischen Abläufe bei der Etablierung der Methode in Anlehnung an die Norm, die den vorhandenen analytischen Ausrüstungen angepasst ist, näher ausgeführt und diskutiert.

Falls eine „Norm-Methode“ vorhanden ist, ist ein akkreditiertes Institut verpflichtet diese grundsätzlich anzuwenden beziehungsweise diese auszuprobieren und diese mit anderen Methoden gegenüber zu stellen. Da diese Norm allerdings sehr zeitaufwändig ist, sollte für die Routineanalyse ein abgekürztes Verfahren etablieren werden. Dafür wurde ein sogenanntes

„dilute and shout“ Verfahren ausprobiert. Damit wurde versucht den Schritt zum Abrotieren zu ersparen, weil hier vermutlich die größte Wahrscheinlichkeit besteht, dass ein Analyt verloren geht. Die Schwierigkeit liegt darin, dass durch dieses Verfahren die Analyte anstelle einer Aufkonzentration verdünnt werden. Somit mussten auch die Konzentrationen der Kalibration verringert werden. Dies stellte eher kein Problem dar, jedoch waren die Signalintensitäten der Standards sehr niedrig. Weiters wurde bemerkt, dass nach der Extraktion nicht die vollständigen 10 ml Ethylacetat, die dafür eingesetzt wurden, abgenommen werden konnten. Demnach müsste dies bei der Berechnung der Analyt-Konzentrationen mit einberechnet werden. Es musste auch mehr verdünnt werden, weil umso mehr Ethylacetat in den Proben noch vorhanden war, desto schlechter waren die Peaks zum Auswerten. Bei diesem Versuch stellte sich heraus, dass diese „dilute and shout“ - Methode zu keinem akzeptierbaren Ergebnis führte.

In weiterer Folge wurde dann die Schnellmethode entwickelt. Da bei der Schnellmethode die Proben nach der Hydrolyse mit mehr Injektionsvolumen eingespritzt werden, kommt es dadurch zu verschiedenen Problemen. Für die Hydrolyse wird ein Acetatpuffer verwendet, der direkt in die HPLC-MS/MS eingespritzt wird. Dadurch wird die Ionenquelle schon nach wenigen Proben stark verschmutzt, dass diese folglich gereinigt werden muss. Auch die Transferkapillare war nach kurzer Zeit belegt und musste gesäubert werden. Aus diesen Gründen musste die MS/MS öfters komplett gereinigt werden. Deshalb stellten sich schnell die Fragen, wie lange das Gerät dieser Belastung stand hält und inwieweit die anderen Messmethoden, die auch auf diesem Gerät laufen, dadurch beeinflusst werden. Weiters wurde am Anfang der Validierung bemerkt, dass diese Schnellmethode nur für eine qualitative Aussage zu verwenden ist. Dies wäre allerdings bei diesen Matrices, die verwendet wurden, eher kein Problem. Da zwei von den drei Antibiotika sowieso verboten sind und nur wenn Thiamphenicol eingesetzt wurde, das Ergebnis mit der Methode in Anlehnung an die Norm abgesichert und quantifiziert werden müsste. Es wurde auch festgestellt, dass bei den Proben unterschiedliche Signalintensitäten von den isotoopenmarkierten Standards gemessen wurden, obwohl die gleiche Menge dieser Standards eingesetzt wurden. Jedoch sollte nicht vergessen, dass zwei verschiedene Mengen an Acetatpuffer verwendet wurden. Bei Rohmilch und Frischkäse waren es 5 ml und beim Rest 8 ml. Wenn dies berücksichtigt wird, können trotzdem die Signalintensitäten nicht miteinander verglichen werden und anscheinend ist die Extraktion mit Ethylacetat notwendig, um die Analyte aus der Probe zu extrahieren. Aber auch das Enzym, das bei der Hydrolyse verwendet wird, verursacht bei der HPLC-Säule eine Verkürzung der Lebensdauer. Obwohl das Enzym durch Zentrifugieren abgetrennt wurde, wurde nach der Validierung schnell festgestellt, dass die HPLC-Säule ausgetauscht werden muss. Das Enzym hat die HPLC-Säule schon nach rund 120

Proben so in Mitleidenschaft gezogen, dass diese nicht mehr zu verwenden ist. Folglich kann gesagt werden, dass diese Schnellmethode nicht für eine Routineanalytik geeignet ist.

Um die Methode Amphenicol-Rückstände in Milch und Milchprodukten besser routinemäßig einzusetzen, wurde auch das Laufmittel der Norm BVL L 06.00-60 getauscht. Es wurde anstelle von Ammoniumacetat Ammoniumformiat genommen. Jedoch stellte sich schnell heraus, dass dies nur für die Messung von Florfenicol, Florfenicolamin beziehungsweise Thiamphenicol geeignet ist, nicht aber für die Messung von Chloramphenicol, weil dadurch nicht der optimale pH-Wert für Chloramphenicol vorhanden ist.

Die Verwendung von isotope-markierten Standards sowohl zu den Kalibrierstandards als auch zu den Proben hat den Vorteil, dass der Verlust der Analyte während der Aufarbeitung ausgeglichen wird. Aus diesem Grund wurden auch alle vier isotope-markierten Standards verwendet und nicht wie in der Norm BVL L 06.00-60 vorgeschlagen zwei.

Die Analyse von Florfenicolamin ist mit der Methode in Anlehnung an die Norm nicht durchführbar. Florfenicolamin und auch Florfenicol-d₃-amin kann in den niedrigeren Konzentrationsbereichen durch den Matrixeinfluss nicht eindeutig bestimmt werden. Die vorher festgelegte Bestimmungsgrenze konnte nicht erreicht werden und aus diesem Grund wurde Florfenicolamin nach der Validierung aus der Methode Amphenicole in Milch und Milchprodukten herausgenommen.

Wenn die Methode in Anlehnung an die Norm mit der Norm BVL L 06.00-60 verglichen wird, wird festgestellt, dass die Wiederfindungsraten von der Matrix Milch nicht so gut wie in der Norm BVL L 06.00-60 sind. In der Norm BVL L 06.00-60 wird eine Matrixkalibrierung verwendet, was zu einer besseren Wiederfindung führt. Dies ist jedoch routinemäßig etwas schwierig, weil dann für jede Matrix eine eigene Matrixkalibration hergestellt werden muss. Weiters werden in einer Messserie verschiedenen Matrices analysiert und dann würde alleine für die verschiedenen Matrixkalibrationen das Gerät zu lange in Anspruch genommen werden, was nicht rentabel ist. Aus diesem Grund ist eine externe Kalibration besser geeignet.

Im Allgemeinen ist zu sagen, dass die Methode in Anlehnung an die Norm trotz der vorhin beschriebenen Einschränkungen zur Norm BVL L 06.00-60 dennoch für die im Vorfeld festgesetzten Bestimmungsgrenzen der drei Antibiotika erreicht wurden und lediglich für Florfenicolamin nicht angewendet werden kann. Die Wiederfindungsraten der Analyte in den

verschiedenen Matrices liegen nicht weit auseinander. Die höchsten Wiederfindungsraten wurden für Chloramphenicol und für Florfenicol bei der Matrix Camembert und für Thiamphenicol bei der Matrix Emmentaler erreicht. Für Chloramphenicol und für Florfenicol bei der Matrix Frischkäse und für Thiamphenicol bei der Matrix Camembert wurden die niedrigsten Wiederfindungsraten erlangt.

Der Vorteil der Methode in Anlehnung an die Norm liegt darin, dass die Laufzeit der Messung halbiert wurde, wodurch doppelt so viele Proben in der gleichen Zeit analysiert werden können. Die Methode wurde bereits akkreditiert und es wurde auch bei einem internationalen Ringversuch für die Bestimmung von Chloramphenicol in Milch mitgemacht, der erfolgreich absolviert wurde.

Zusammenfassend ist noch zu erwähnen, dass die Methode Amphenicol-Rückstände in Milch und Milchprodukten erfolgreich etabliert wurde und in Zukunft dieses Verfahren für weitere Matrices nach einer Validierung erweitert werden kann. Vorausschauend kann dann auch Florfenicolamin mit analysiert werden, weil für die anderen Matrices die Rückstandshöchstmengen höher liegen und somit der Matrixeinfluss kein Problem mehr darstellen wird.

Literaturverzeichnis

- [1] H. BOCKER, H. THRUM: Antibiotika - woher, wofür?, Seiten 18, 28, 58f, 115f. Aulis Verlag Deubner, 1. Auflage, 1987.
- [2] H. SAHM, G. ANTRANIKIAN, K. STAHMANN und R. TAKORS: Industrielle Mikrobiologie, Seiten 150, 152. Springer Verlag, 2013.
- [3] W. LÖSCHER, F. RUPERT und R. KROKER: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren: Mit 87 Tabellen, Seiten 205, 208f, 227ff. Blackwell Verlag GmbH, 5. neubearbeitete Auflage, 2002.
- [4] O. KAYSER, R. H. MÜLLER: Pharmazeutische Biotechnologie, Ein Komendium für Forschung und Praxis, Seite 13f. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2000.
- [5] W. BALTES UND R. MATISSEK: Lebensmittelchemie, Seite 330. Springer Verlag, 7. Auflage, 2011.
- [6] H.-D. BELITZ UND W. GROSCH: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Seite 481. Springer Verlag, 4. Auflage, 1992.
- [7] R. MATISSEK, G. STEINER UND M. FISCHER: Lebensmittelanalytik, Seite 512f. Springer Verlag, 5. Auflage, 2014.
- [8] T. FRANKLIN, G. SNOW: Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe, Seiten 11 – 14, 112f. Springer Verlag, 1973.
- [9] E. MUTSCHLER: Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie, Seiten 773f, 809. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 8. Auflage, 2001.
- [10] G. FICJS, H. G. SCHLEGEL: Allgemeine Mikrobiologie: 53 Tabellen, Seiten 180 – 182. Thieme Verlag, 2., völlig neubearb. Auflage, 2007.
- [11] E. TEUSCHER: Biogene Arzneimittel, Seiten 442f, 456. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 5., überarb. und erw. Auflage, 1997.
- [12] A. M. WALTER, L. HEILMEYER: Antibiotika-Fibel: Antibiotika und Chemotherapie, Seite 5f. Thieme Verlag, 2., völlig neubearb. Auflage, 1965.
- [13] D. NELSON, M. COX: Lehninger Biochemie, Seiten 1126 – 1129. Springer Verlag, 3. vollst. überarb. und erw. Auflage, 2001.
- [14] G. KLEBE: Wirkstoffdesign, Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen, Seiten 13, 347f, 598 – 600. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage, 2009.
- [15] J. KOOLMAN, K-H. RÖHM: Taschenatlas der Biochemie, Seiten 250, 252. Thieme Verlag,

3. vollst. überarb. und erw. Auflage, 2002.
- [16] S. K. ALEXANDER, D. STRETE und E. KOTHE: Mikrobiologisches Grundpraktikum: ein Farbatlas, Seite 125f. Pearson Studium, 2006.
- [17] H-H. FREY, W. LÖSCHER: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, Seiten 458, 483, 683. Ferdinand Enke Verlag, 5. neubearbeitete Auflage, 1996.
- [18] HERAUSGEGEBEN VON DER EUROPÄISCHEN AKADEMIE FÜR UMWELTFRAGEN, TÜBINGEN: Fremdstoffe in Lebensmitteln: Zusätze, Verunreinigungen und Rückstände; mit 20 Tabellen, Seiten 35, 70f, 99, 102. Hirzel Verlag, 1997.
- [19] R. BRUNNER: Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol in der Veterinärmedizin, Seite 99f. Biochemie Gesellschaft mbH, 1956.
- [20] SIGMA: Chloramphenicol - Produkt Information.
http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c0378pis.pdf.
- [21] INSTITUT FÜR VETERINÄRPHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE: Informationssystem CliniPharm CliniTox.
http://www.vetpharm.uzh.ch/perldocs/index_i.htm.
- [22] HIPRA DEUTSCHLAND GMBH: Florfenicol Monographie: Injektions- und Oraltherapie bei Schweinen.
http://marketing.hipra.com/SELECTNEWS/SelectNews_FLORFENICOL_Swine_DE.pdf.
- [23] EUROPÄISCHE KOMMISSION: Die Regelung der Arzneimittel in der Europäischen Union, Seite 38f. Amt für Amtliche Veröff. der Europ. Gemeinschaften, Band VIII Auflage, 1996.
- [24] AGES: Rückstände von Chloramphenicol in Lebensmitteln.
<http://www.ages.at/ages/ernaehrungssicherheit/rueckstaende-kontaminanten/arzneimittel-und-hormonrueckstaende>.
- [25] H. WANG, X.J. ZHOU, Y.Q. LIU H.M. YANG und Q.L. GUO: Simultaneous Determination of Chloramphenicol and Aflatoxin M1 Residues in Milk by Triple Quadrupole Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Journal of agricultural and food chemistry, 59:3532–3538, 2011.
- [26] Norm BVL L 06.00-62 Bestimmung von Aminoglykosid-Rückständen in Rinder- und Schweinenieren HPLC-MS/MS-Verfahren. 2012.
<http://www.methodensammlung-bvl.de/>.
- [27] Norm BVL L 06.00-60 Bestimmung von Amphenicol-Rückständen in Muskel und Milch

HPLC-MS/MS-Verfahren. 2012.

<http://www.methodensammlung-bvl.de/>.

- [28] D.A. SKOOG, J.J. LEARY: Instrumentelle Analytik, Grundlagen – Geräte - Anwendungen, Seiten 463, 488, 490, 623f, 683. Springer Verlag, 1996.
- [29] H. BUDZIKIEWICZ, M. SCHÄFER: Massenspektrometrie, Seiten 38f, 88. WILEY-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, 6. vollst. überarb. und aktualisierte Auflage, 2012.
- [30] M.H. GEY: Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Seiten 261, 270, 320. Springer Verlag, 2. überarb. und erweiterte Auflage, 2008.
- [31] J.H. GROSS: Massenspektrometrie, Ein Lehrbuch, Seiten 46, 453, 472, 601, 703. Springer Verlag, 2013.
- [32] S. KROMIDAS: HPLC richtig optimiert, Ein Handbuch für Praktiker, Seite 563. WILEY-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, 2006.
- [33] S. HUQ, S. SADJADI. und S. COUNTRYMAN: Removal of Beta-Glucuronidase Enzyme from Urine Post-Hydrolysis to Improve Assay Performance and Column Lifetime.
http://phx.phenomenex.com/lib/po99161212_W_3.pdf.
- [34] W. FREDE: Handbuch für Lebensmittelchemiker, Seite 374. Springer Verlag, 3. Auflage, 2010.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Entdeckung der Antibiotika in zeitlicher Abfolge	3
1.2	Ribosom	6
1.3	Chloramphenicol (CAP)	8
1.4	Thiamphenicol (TAP)	8
1.5	Florfenicol (FAP)	9
1.6	Florfenicolamin (FAPA)	9
4.1	Scan von TAP	30
4.2	Produkt-Ionen der verschiedenen Vorläufer-Ionen bei der CE von 5 eV anhand des Beispiels TAP	31
4.3	Produkt-Ionen eines Vorläufer-Ions bei unterschiedlichen CEs anhand des Beispiels TAP	32
4.4	Peaks des Produkt-Ions m/z 185 bei unterschiedlichen CEs anhand des Beispiels TAP	33
4.5	Peaks des Überganges 354 zu 290 bei unterschiedlichen CAVs anhand des Beispiels TAP	34
4.6	Alle Übergänge von TAP	34
4.7	Verdünnungsschema der Kalibrierstandards für beide Methoden	44
4.8	Beispielchromatogramme der Analyten einer Kalibration	49
4.9	Beispielchromatogramme der Analyten einer Milchprobe	49

Tabellenverzeichnis

1.1	Einteilung nach dem Wirkungstyp	4
1.2	Auszug der Verordnung (EU) Nr. 37/2010	12
1.3	Auszug aus dem Gesetz 2003/181/EG	13
4.1	Parameter der HPLC	40
4.2	Einstellungen der Ionenquelle	41
4.3	Parameter der MRM-Methode	41
4.4	Berechnete Konzentrationen der Wirkstoffe mit allen Angaben, die zur Berechnung benötigt werden.	45
4.5	Konzentrationen der Kalibrations-Levels	46
4.6	Konzentration der Dotierlösungen für die Validierung	48
4.7	Konzentration der Dotierlösungen für die Validierung	48
4.8	Ergebnisse der Validierung von Rohmilch	51
4.9	Ergebnisse der Validierung in Anlehnung an die Norm von Frischkäse	52
4.10	Ergebnisse der Validierung in Anlehnung an die Norm von Camembert	53
4.11	Ergebnisse der Validierung in Anlehnung an die Norm von Edamer	54
4.12	Ergebnisse der Validierung in Anlehnung an die Norm von Emmentaler	55
4.13	Wiederfindungsraten von allen Matrices (Anlehnung an die Norm)	56
4.14	Ergebnisse der Validierung nach der Schnellmethode von Rohmilch	58
4.15	Ergebnisse der Validierung nach der Schnellmethode von Frischkäse	59
4.16	Ergebnisse der Validierung nach der Schnellmethode von Camembert	60
4.17	Ergebnisse der Validierung nach der Schnellmethode von Edamer	61
4.18	Ergebnisse der Validierung nach der Schnellmethode von Emmentaler	62
4.19	Wiederfindungsraten von allen Matrices (Schnellmethode)	63
4.20	Wiederfindungsraten der Methoden in Milch	65

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytosin
CAP	Chloramphenicol
CAP-d5	DL-threo-Chloramphenicol-d5
CAV	Collision Cell Accelerator Voltage (engl.) = Beschleunigungsspannung der Kollisionszelle
CE	Collision Energy (engl.) = Kollisionsenergie
CID	Collision-Induced Dissociation (engl.) = stoß-induzierte Dissoziation
DAD	Diode Array Detector (engl.) = Diodenzeilendetektor
DNA	Deoxyribonucleic acid (engl.) = Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (engl.) = Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (engl.) = Enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest
EU	Europäische Union
F.i.T.	Fett in der Trockenmasse
FAP	Florfenicol
FAP-d3	Florfenicol-d3
FAPA	Florfenicolamin
FAPA-d3	Florfenicol-d3-Amin
FLD	Fluoreszenzdetektor
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (engl.) = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ISTD	Isotopenmarkierter Standard
LC	Liquid Chromatography (engl.) = Flüssigchromatographie
LOD	Limit Of Detection (engl.) = Nachweisgrenze
LOQ	Limit Of Quantification (engl.) = Bestimmungsgrenze
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis

Mg	Magnesium
MRL	Maximum Residue Limits (engl.) = Rückstandshöchstmenge
MRM	Multiple Reaction Monitoring
mRNA	Messenger RNA
MRPL	Minimum Required Performance Limit (engl.) = Mindestleistungsgrenzen
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NH ₄ OH	Ammoniumhydroxid
p.a.	pro analysi (lat.) = zur Analyse
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q	Quadrupol
QQQ / QqQ	Triple Quadrupol Massenspektrometer
R-Plasmide	Resistenz-Plasmide
RC	regenerierte Zellulose
RNA	Ribonucleic acid (engl.) = Ribonukleinsäure
S	Svedberg
SPE	Solid-Phase-Extraction (engl.) = Festphasenextraktionssäulen
Stabw.	Standardabweichungen
T	Thymin
TAP	Thiamphenicol
TAP-d3	Thiamphenicol-methyl-d3
TIC	Totalionenchromatogramm
TPP	Triphenylphosphat
tRNA	Transfer RNA
U	Uracil
WF	Wiederfindungsraten