



## LEBENSMITTELANALYSE

# ACHTUNG, ANTIBIOTIKA IN EI!

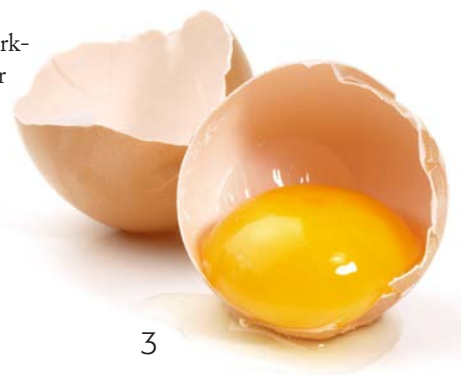
Für den Nachweis von Antibiotikawirkstoffen in der Matrix Ei ist die LC-MS/MS prädestiniert. US-amerikanische Applikationsexperten haben sich eine gängige manuelle Analysenmethode zur Brust genommen und vollständig automatisiert.

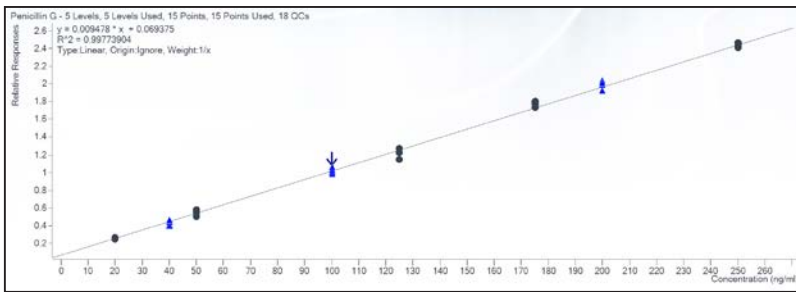
Text: Cuidido Deulifing; Foto: istock / ancoay (S. 3), istock / pagadesign (S. 1, Titel)

**S**ich mit Salmonellen zu infizieren, ist eine der Sorgen, die sich Verbraucher beim Verzehr von Eiern und Eierspeisen machen könnten. Infektionen kommen vor, allerdings eher selten. Ein weniger offensichtliches, dafür aber nicht zu unterschätzendes Gesundheitsrisiko zeichnet sich für den Liebhaber von Eierspeisen an anderer Stelle ab: Es geht um den Einsatz von Antibiotika in Hühnerställen. Die Verabreichung der Medikation erfolgt mit dem Ziel, Schadkeime zu bekämpfen und den Ausbruch von Epidemien zu verhindern. Dass so etwas im Tierreich

geschieht, also die seuchenartige Ausbreitung von Infektionskrankheiten, unterstreichen Bezeichnungen wie „Schweinepest“, „Rinderpest“ oder „Vogelgrippe“. Die Ausbreitung von Krankheitserregern wird durch Massentierhaltung begünstigt.

Der Einsatz von Antibiotikawirkstoffen im Hühnerstall, die, lapidar gesagt, im Gießkannenprinzip ausgebracht werden, birgt die Gefahr, dass Arzneimittelrückstände letztlich nicht nur äußerlich der Ei-





Kalibrationsgerade für Penicillin G.  
(Abbildung: GERSTEL)

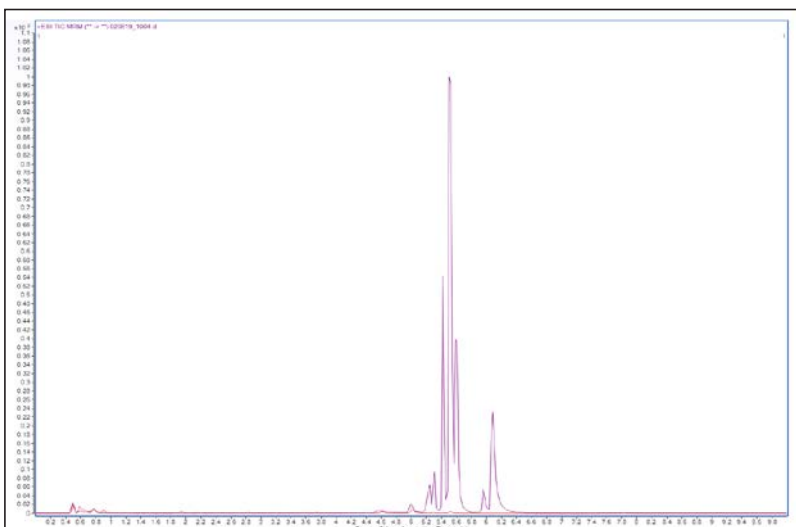
schale anhaften, sondern ebenso auch in das Innere des Eis gelangen können, indem sie von der Henne über den Atemweg und den Verdauungstrakt aufgenommen werden. Um die Verbraucher vor dem Konsum kontaminierter Eier und folglich vor Gesundheitsbelastungen zu bewahren, die sich als Allergien oder in der Entwicklung von Resistenzen gegenüber bestimmten Antibiotikawirkstoffen darstellen können, sind Eier auf Arzneimittelrückstände hin zu untersuchen.

### Manuell ist effektiv, aber ...

Klingt einfach, ist es aber nicht, was mit der Probenmatrix zusammenhängt: Eier enthalten Lecithin, Phospholipide und Fette, und damit Stoffe, die den Nachweis von Antibiotika erschweren. Um Arzneimittelrückstände sicher qualifizieren und quantifizieren zu können, sind die Analyten möglichst *in toto* von der Matrix abzutrennen beziehungsweise umgekehrt. Die Unterschiedlichkeit der verschiedenen Matrixbestandteile bedingt einen nicht unerheblichen Aufwand an Probenvorbereitung, die Extraktionsschritte einschließt, die sich, so man sie von Hand ausführt, mehr oder minder arbeits- und zeitintensiv gestalten.

Mit dem Ziel einer erhöhten Effizienz beim Nachweis von Antibiotikawirkstoffen in der Matrix

Überlagernde Massenchromatogramme des Monitorings der Phospholipide in der Probe: Mit Oasis PRIME HLB SPE-Aufreinigung (rot) und ohne (violett).  
(Abbildung: GERSTEL)



Ei hat der Applikationsexperte Fred D. Foster gemeinsam mit Kollegen von der in Baltimore/USA ansässigen Unternehmenstochter GERSTEL Inc. eine bestehende, einfache und gleichsam effektive, wohl aber manuelle Analysenmethode für den LC-MS/MS-Nachweis von Antibiotika [1] mittels eines leistungsstarken Autosamplers erfolgreich automatisiert. Über das Resultat ihrer Methodenentwicklung, die unter anderem einen hohen Probendurchsatz zum Ziel hatte, berichteten Foster et al. auf der Pittsburgh Conference im März 2019 in Philadelphia/USA.

### ... Automatisierung fördert Effizienz

Will man die Konzentration der Analyten in der Eiprobe genau bestimmen, ist eine umfangreiche Probenvorbereitung erforderlich, die also mehrere Extraktions- und Aufreinigungsschritte beinhaltet: Im Anschluss an eine Flüssig-Flüssig-Extraktion etwa sei eine Festphasenextraktion notwendig, „um signifikante Mengen jener potenziell störenden Phospholipide zu entfernen, von denen bekannt ist, dass sie zusammen mit den antibiotischen Verbindungen extrahiert werden“, berichten Foster et al.

Die Applikationsexperten machten sich daran, eine bestehende Methode [1] möglichst eins zu eins auf einen geeigneten Autosampler zu übertragen, namentlich einen GERSTEL-MultiPurposeSampler (MPS robotic pro), der unter anderem sowohl für die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit einer Mischstation (GERSTEL-QuickMix), einer CF-200 Zentrifuge und einer Universal-Filtrationseinheit ausgestattet sowie für die Festphasenextraktion (SPE) konfiguriert war.

Nach Abschluss der Probenvorbereitung injiziert der MPS ein Aliquot der gereinigten Probe auf das gekoppelte LC-MS/MS-System. Im vorliegenden Fall handelte es sich um eine Agilent 1260 HPLC-Pumpe mit einer Waters Acquity UHPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm) sowie ein Agilent Ultivo Triple Quadrupole Massenspektrometer (QQQ-MS) mit Jet-Stream-Elektrosprayquelle.

### Von der Theorie in die Praxis

Nach Abschluss einer hinreichend umfangreichen Entwicklungsphase gelang Foster et al. die vollständige Automatisierung der Referenzmethode [2]. Ihre Wirksamkeit belegten die US-amerikanischen Applikationsexperten, indem Sie eine Auswahl verschiedener Antibiotikawirkstoffe sicher und sensitiv nachwies. Hierbei handelte es sich um Amprolium, Chlortetracyclin, Erythromycin, Penicillin G und



Verwendeter MPS-robotic-pro-Autosampler ausgestattet mit GERSTEL-QuickMix, CF-200 Zentrifuge, SPE- und Filtrations-einheit für die umfangreiche Vorbereitung von Eiprobe n zwecks Bestimmung von Antibiotikarückständen. (Foto: GERSTEL)

Tylosin, die zum Teil nicht allein in der Veterinär-, sondern auch in der Humanmedizin zum Einsatz kommen. d5-Penicillin G wurde als interner Standard zur Qualitätssicherung der Methode verwendet, Kalibrationsstandards wurden mit Bio-Eiextrakten hergestellt. Und so gestaltet sich die Analysemethode von Foster et al. beim automatisierten Nachweis genannter Antibiotikawirkstoffe in Ei:

Die Eiprobe n werden von Hand homogenisiert, alsdann werden 2 Gramm des resultierenden Homogenates in ein sauberes 10-mL-Vial mit Schraubverschluss pipettiert und mit 10 Mikrolitern ( $\mu\text{L}$ ) des internen Arbeitsstandards versetzt. Die Vials werden verschlossen und auf dem Autosampler in Position gebracht. Alle weiteren Schritte der Probenvorbereitung verlaufen automatisiert: Der MPS pipettiert 8 Milliliter einer Acetonitril-Wasser-Lösung (80:20) zur Eiprobe. Anschließend überführt der Sampler das Probenvial zur QuickMix-Station, auf der die Durchmischung der Probe bei Raumtemperatur für die Dauer von 2,5 Minuten bei 2000 U/min erfolgt. Der Autosampler setzt die Vials danach in die Zentrifuge, entnimmt sie nach 10 Minuten Behandlung bei 2000 g und zieht aus dem Überstand 2 Milliliter, um diese der Festphasenextraktion über Umkehrphasen zuzuführen.

## Homogene Extrakte fundieren Erfolg

Zuvor hat der MPS das Sorbens der kommerziell erhältlichen RP-Kartuschen (Oasis PRIME HLB) mit 2 Millilitern der Acetonitril-Wasser-Lösung konditioniert. 250  $\mu\text{L}$  des resultierenden und gefilterten Extraktes werden in ein sauberes Probenvial überführt und mit einer wässrigen 5 mM Ammoniumacetat-Lösung (750  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Die Durchmischung erfolgt vor der Probenaufgabe in das HPLC-System in der Spritze, die mit einem Lösungsmittelgradienten (Ameisensäure/Acetonitril; 0,4 mL/min; 30 °C) be-

trieben wird. Die Detektion erfolgt mittels Elektrosprayionisation im Positivmodus.

Foster et al. ist es gelungen, mit ihrer automatisierten LLE-SPE-LC-MS/MS-Methode antibiotische Verbindungen in Eiprobe n mit Erfolg zu extrahieren und zu bestimmen. Ob eine Methode zufriedenstellende Resultate liefert, hängt von unterschiedlichsten Faktoren ab. Die vollständige Durchmischung einer Eiprobe etwa während der Extraktion, wie die Forscher sie erreicht hätten, sei wichtig für die Maximierung des Transfers der antibiotischen Rückstände aus der viskosen Eimatrix in die Extraktionslösung, sind Foster et al. überzeugt.

Für die Effizienz der Methode spielen zudem der Faktor Zeit eine wichtige Rolle, in der die Durchmischung der Probe erfolgt: „Durch den Einsatz des GERSTEL-QuickMix konnten wir ein Höchstmaß an Homogenität innerhalb von 2,5 Minuten erreichen, was einem Zeitgewinn von 27,5 Minuten gegenüber der Referenzmethode ausmacht“, berichten die Applikationsexperten. Zudem sei es ihnen mittels Oasis-PRIME-HLB-SPE-Kartuschen gelungen, die störenden Lipide und Phospholipide aus den Eiextrakten zu entfernen. Die Präzision und Richtigkeit der Methode sei für alle analysierten Antibiotikawirkstoffe bestimmt worden, und zwar unter Verwendung von QC-Proben bei hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationen. Laut Foster et al. habe die Richtigkeit zwischen 94,6 und 115 Prozent gelegen; die Präzision wurde von ihnen mit einer durchschnittlichen relativen Standardabweichung (RSD) von 3,9 Prozent angegeben. Regressionsanalysen für alle mit dieser Methode analysierten antibiotischen Substanzen hätten  $R^2$ -Werte von 0,99 oder darüber ergeben.

## REFERENZEN

- [1] Simple and Effective Cleanup for UPLC-MS/MS Determination of Veterinary Drug Residues in Egg, Waters Application Note (2018), <http://bit.ly/39ehEIO>
- [2] Fred D. Foster, John R. Stuff, Laurel A. Vernarelli und Jacqueline A. Whitecavage, Completely Automated Extraction and Analysis of Antibiotics in Eggs using a New Robotic Autosampler and LC-MS/MS Platform, Poster-Präsentation während der Pittsburgh Conference im März 2019 in Philadelphia/USA