

Aus dem Institut für Lebensmitteltoxikologie und
Chemische Analytik der
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

**Colistin in Milch - Entwicklung einer Methode
und ihre Validierung nach der Entscheidung
der Kommission 2002/657/EG**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemikerin

Martha Anna Stappen

geboren am 07.10.1968 in Steinfurt-Burgsteinfurt

Hannover 2010

Wissenschaftlicher Betreuer

Prof. Dr. Gerd Hamscher

Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Referenten der Dissertation

Prof. Dr. Carla Vogt

Institut für Anorganische Analytik
der Universität Hannover

Prof. Dr. Gerd Hamscher

Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Prüfungskollegium

Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger (Vorsitzender)

Institut für Lebensmittelchemie
der Universität Hannover

Prof. Dr. Carla Vogt

Institut für Anorganische Analytik
der Universität Hannover

Prof. Dr. Gerd Hamscher

Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Datum der Disputation: 24.11.2009

Zusammenfassung

Im Rahmen des gesundheitlichen Verbraucherschutzes finden jährlich Untersuchungen auf Tierarzneimittelrückstände in tierischen Lebensmitteln statt, die nach Vorgaben der EU-Kommission (Rückstandskontrollplänen) durchzuführen sind. Innerhalb dieser Vorgaben sind Untersuchungen auf Rückstände an Colistin in Milch gefordert.

Die Analysemethode muss den Anforderungen der Entscheidung [2002/657/EG](#) genügen. Mit den bisher in der Literatur beschriebenen LC-Fluoreszenz-Methoden sind die erforderlichen drei Identifizierungspunkte für den Stoff der Gruppe B ([96/23/EG](#)) nicht zu erreichen. Auch die bislang publizierten LC-MS/MS-Methoden berichten nicht von entsprechend ermittelten Entscheidungsgrenzen ($CC\alpha$) und Nachweisvermögen ($CC\beta$).

In der vorliegenden Arbeit wird eine LC-MS/MS-Methode entwickelt, die es ermöglicht die entsprechenden Kriterien $CC\alpha$ und $CC\beta$ bei der Validierung zu bestimmen.

Die Milch wurde im ersten Schritt mit Oxalsäure und anschließend mit Trichloressigsäure/Salzsäure-Lösung deproteiniert, danach in dem jeweils auf die Extraktion folgenden Zentrifugierschritt, das Milchlaktat mit abgetrennt. Die weitere Reinigung des Extraktes erfolgte mittels Festphasenextraktion an einer C18-Phase (*reversed phase*) unter Aufkonzentrierung. Das auf ein definiertes Volumen aufgefüllte Eluat konnte direkt der LC-MS/MS-Messung zugeführt werden.

Als Standard diente der derzeit einzig vorhandene zertifizierte HPLC-Referenzstandard vom *Council of Europe*. Die Quantifizierung erfolgte über die Summe der beiden Hauptkomponenten Colistin A und Colistin B.

Beim angewandten alternativen Validierungsverfahren unter Verwendung der Software *InterVal* beschränkte sich die Anzahl der durchzuführenden Untersuchungen auf insgesamt 32. Durch die Erstellung von statistisch günstigeren Versuchsplänen mittels simultanen Variierens mehrerer Faktoren konnten so die erforderlichen Leistungsmerkmale ermittelt werden. Die Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ dieser Untersuchungsmethode liegt bei $43,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ Colistin in Milch und das Nachweisvermögen $CC\beta$ bei $51,3 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Die Stabilitätsuntersuchungen von Colistin erfolgten mittels LC-Fluoreszenzdetektion mit automatisierter Nachsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd. Die Untersuchungen ergaben, dass Colistin bei 6°C im Dunkeln mindestens 52 Wochen stabil ist.

Die entwickelte und validierte LC-MS/MS-Methode erfüllt somit die Anforderungen der Kommissionsentscheidung für Bestätigungsmethoden und kann folglich in der Analytik von Colistin in Milch routinemäßig eingesetzt werden.

Schlagwörter: Colistin, Polymyxin E, LC-MS/MS, Entscheidung [2002/657/EG](#), Validierung

Summary

Under health consumer protection laws regular analysis of antibiotic residues in animals feed is mandatory. In this graduation, bovine milk will be examined for residues of colistin. Colistin is included in group B of the Council Directive [96/23/EC](#) and the maximum residue limit in milk is set to 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (sum of colistin A and colistin B is 39 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Finally, the developed method should be validated in accordance to Commission Decision [2002/657/EC](#). Therefore it is necessary to determine important performance criteria such as the decision limit ($CC\alpha$) and the detection capability ($CC\beta$).

Last years publications about methods based on LC-FLD or LC-MS to determine colistin in bovine milk did not report any data regarding the decision limit and the detection capability. This assay reports the validation of an LC-MS method for the determination of colistin in bovine milk and its performance criteria $CC\alpha$ and $CC\beta$.

The method is based on an extraction with oxalic acid followed by another extraction with hydrochloric acid/trichloroacetic acid. After each extraction step the fat and denatured proteins were removed by centrifuge. The further cleaning of the analyte was achieved using solid-phase-extraction (*reversed phase*) and concentration of the extract. The eluate was filled up to a certain volume and became separated by LC and detected with MS/MS. The employed standard from the Council of Europe is the only certified reference standard for HPLC. This was quantified by adding the contents of colistin A and colistin B. The method has been validated in accordance to the standards of Decision [2002/657/EC](#) by using the alternative approach and the commercial software *InterVal*. Due to factorial sampling experiments in order to quantify the effects of factors separately the number of measurements could be decreased to 32. The necessary criteria $CC\alpha$ and $CC\beta$ were determined: The decision limit ($CC\alpha$) of the method was determined to be 43,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ colistin and the detection capability ($CC\beta$) is 51,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ colistin in milk. As part of the validation, the stability of the analyte was assessed in several different ways. The determination is carried out by HPLC using an online postcolumn derivatization with o-Phthaldialdehyd. As a result it can be concluded that a dilution of colistin is stable for at least 52 weeks at 6 °C in darkness.

The developed and validated confirmation method is in accordance to the Council Decision and can be used as such in the routine analysis.

Keywords: colistin, polymyxin E, LC-MS/MS, Commission Decision [2002/657/EC](#), validation

Inhaltsverzeichnis

Titel	i
Zusammenfassung	iii
Summary	iv
Inhaltsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	ix
Abbildungsverzeichnis	xiii
Akronyme, Abkürzungen und Symbole	xv
1 Einleitung	1
1.1 Rechtliche Beurteilung und Anforderungen	3
1.1.1 Rechtliche Anforderungen an die Analytik	5
1.2 Eigenschaften von Polypeptid-Antibiotika	8
1.2.1 Colistin	9
1.3 Analytik von Colistin in tierischer Matrix	14
1.3.1 Probenaufarbeitung	15
1.3.2 Standardlösungen und Standardsubstanzen	15
1.3.3 Chromatographische Trennung	17
1.3.4 Detektion	18
1.3.4.1 Fluoreszenzdetektion	18
1.3.4.2 Massenspektrometrische Detektion	19
2 Problemstellung	21
3 Ergebnisse	23
3.1 Colistin-Standards	23
3.2 Entwicklung einer Methode zur LC-Trennung und FL-Detektion	24
3.2.1 Anwendbarkeit der Methode	31
3.3 Entwicklung einer Methode zur LC-Trennung und MS-Detektion	32
3.3.1 Massenspektrometrische Detektion (<i>Varian</i>)	32

3.3.2	Massenspektrometrische Detektion (<i>Micromass</i>)	35
3.3.3	Anwendbarkeit der Methode	40
3.4	Probenaufarbeitung	44
3.4.1	Aufarbeitung von Milch - Extraktion mit TCA	44
3.4.1.1	Gelfiltrationschromatographie	44
3.4.2	Festphasenextraktion	46
3.4.3	Aufarbeitung von Milch - Extraktion mit TCA/ACN	50
3.4.4	Ultrafiltration	50
3.4.5	Anwendbarkeit auf Milchproben	51
3.5	Validierung	52
3.5.1	Stabilitätstest	54
3.5.2	Spezifität	58
3.5.3	Richtigkeit	64
3.5.4	Versuchsplan	64
3.5.5	Ergebnisse	66
3.5.5.1	Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen	67
3.5.5.2	Wiederfindung	68
3.5.5.3	Standardabweichungen (S_R und S_{WR})	69
3.5.5.4	Messunsicherheiten des Kalibrierbereiches	70
3.5.5.5	Kalibrierkurven - Vorhersageintervall	70
3.5.5.6	Robustheit und Auswirkung von Faktoren	71
3.5.5.7	Gütekurve	72
4	Diskussion	73
4.1	Colistin-Standard	73
4.2	Analytische Methode zur LC-Trennung mittels Fluoreszenzdetektion	75
4.2.1	Einfluss der Trennsäule und der Fließmittel	75
4.2.2	Anwendbarkeit der Methode	76
4.3	Analytische Methode zur LC-Trennung und MS-Detektion	77
4.3.1	ESI-MS/MS	77
4.3.2	Identifizierungspunkte	79
4.4	Probenaufarbeitung	79
4.4.1	Extraktionsverfahren	80
4.4.2	Gelfiltrationschromatographie	80
4.4.3	Festphasenextraktion	81

4.4.4	Ultrafiltration	82
4.4.5	Anwendbarkeit der Probenaufarbeitung auf Milch	83
4.5	Validierung	84
4.5.1	Stabilitätstest	84
4.5.2	Spezifität	85
4.5.3	Richtigkeit / Wiederfindung	85
4.5.4	Ergebnisse der Validierung	87
4.5.5	Anwendbarkeit der Analysemethode	88
4.6	Ausblick	88
4.6.1	Vorsäulenderivatisierung	88
4.6.2	Immunoaffinitätsextraktion	89
5	Experimentelles	91
5.1	Material, Geräte, Chemikalien und sonstiges Labormaterial	91
5.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel	91
5.1.2	Standardsubstanzen	93
5.1.3	Geräte und sonstiges Labormaterial	94
5.1.4	Verbrauchsmaterial	95
5.1.5	Sonstiges	96
5.2	LC-Anlagen	96
5.2.1	LC-Fluoreszenzdetektion (<i>Merck</i>)	96
5.2.1.1	LC-System	96
5.2.1.2	LC-Trennsäulen	97
5.2.1.3	LC-Bedingungen	97
5.2.2	LC-ESI-MS/MS (<i>Varian</i>)	103
5.2.3	LC-ESI-MS/MS (<i>Micromass</i>)	106
5.2.3.1	Massenspektrometer	106
5.2.3.2	LC-System	107
5.2.3.3	LC-Säulen	107
5.2.3.4	LC-Bedingungen	110
5.3	Erarbeitung der Probenaufarbeitung	110
5.3.1	Aufarbeitung von Milch - Extraktion mit TCA	110
5.3.2	Aufarbeitung für die Gelfiltrationschromatographie	112
5.3.2.1	Gelfiltration	112
5.3.3	Kartuschen für die <i>solid phase extraction</i>	113

5.3.4	Aufarbeitung - Extraktion mittels TCA/ACN	116
5.3.5	Ultrafiltration	117
5.3.6	Aufarbeitung - Extraktion mit Oxalsäure und TCA/HCl	118
5.4	Validierung der Untersuchungsmethode	119
5.4.1	Stabilitätstest	120
5.4.2	Probenvorbereitung und –aufarbeitung für die Validierung	121
5.4.3	Versuchsplan	123
5.4.4	Messung	125
5.4.5	Auswertung	125
5.4.6	Analytische Anforderungen für LC-MS-Analysemethoden	127
5.5	Herkunft und Probenahme der Milchproben	129
5.5.1	Statistik	129

Tabellenverzeichnis

1.1	Jahresberichte zum Nationalen Rückstandskontrollplan (BVL)	3
1.2	MRL-Werte von Colistin gem. Anhang I VO (EWG) 2377/90	5
1.3	Colistin-Komponenten	11
1.4	Polymixin B-Komponenten	13
1.5	Arbeitsschritte bei chemisch-physikalischen Untersuchungen	14
1.6	Analysenmethoden-Übersicht	16
3.1	Colistinsulfat-Standards unterschiedlicher Lieferanten	27
3.2	Kalibrierung von Colistin über den Arbeitsbereich von 1,25 – 12,5 ng . .	29
3.3	Wiederholpräzision bei der Bestimmung mit LC-Fluoreszenzdetektion . .	29
3.4	NG und BG für Colistin A und Colistin B im Vergleich zum MRL-Wert .	30
3.5	<i>m/z</i> -Ionen von Colistin	32
3.6	Ergebnisse der unterschiedlichen <i>drying-gas</i> Temperaturen	34
3.7	Kalibrierung von fünf Konzentrationsstufen nach LC-ESI-MS/MS	43
3.8	Wiederholpräzision von Polymyxin B mit LC-ESI-MS/MS	43
3.9	Ergebnisse mit unterschiedlichen SPE-Kartuschen und Lösungsmitteln . .	48
3.9	Ergebnisse mit unterschiedlichen SPE-Kartuschen und Lösungsmitteln . .	49
3.10	Analysemethode zur Bestimmung von Colistin in Milch	53
3.10	Analysemethode zur Bestimmung von Colistin in Milch	54
3.11	Komponenten des Colistinsstandards nach 12 Monaten im Dunkeln/-20°C	57
3.12	Faktor-Level-Kombinationen	66
3.13	Informationen zur Validierung	67
3.14	Ergebnisse der Bestimmung von Colistin in Milch	68
3.15	Wiederholpräzision, “In-house”-Reproduzierbarkeit und Wiederfindung .	69
3.16	Effekte der einzelnen Faktoren	71
3.16	Effekte der einzelnen Faktoren	72

4.1	Geometrie von Kollisionszelle und Elektrospray-Ionisation-Interface	78
4.2	Mindestwerte der Richtigkeit von quantitativen Methoden	86
5.1	Chemikalien und Lösungsmittel zur LC und Probenaufarbeitung	91
5.1	Chemikalien und Lösungsmittel zur LC und Probenaufarbeitung	92
5.1	Chemikalien und Lösungsmittel zur LC und Probenaufarbeitung	93
5.2	Standardsubstanzen	93
5.2	Standardsubstanzen	94
5.3	Getestete stationäre Phasen	98
5.4	Derivatisierungsreagenz	99
5.5	Übersicht über die eingesetzten Fließmittel	99
5.5	Übersicht über die eingesetzten Fließmittel	100
5.6	Übersicht über die Bedingungen zur Analyse eines Colistin-Standards	100
5.7	Übersicht über die verwendeten LC-Gradienten	101
5.8	Übersicht über die Methodenoptimierung	102
5.9	Direktinjektion in das Massenspektrometer	104
5.10	Manuelle Injektion über eine Probenschleife	104
5.11	Fragmentierungsverhalten von Colistin und Polymyxin B	105
5.12	Säule zur chromatographischen Trennung von Colistin	107
5.13	Bedingungen zur Entwicklung der MS/MS-Methode	108
5.13	Bedingungen zur Entwicklung der MS/MS-Methode	109
5.14	Parametereinstellungen für die LC-ESI-MS/MS-Methode	109
5.15	Gradient zur chromatographischen Trennung - MS-Detektion	110
5.16	Gradient zur chromatographischen Trennung - FL-Detektion	111
5.17	Ergebnisse der SPE-Kartuschen-Versuche	114
5.17	Ergebnisse der SPE-Kartuschen-Versuche	115
5.18	Gradient zur Bestimmung von Colistin in Milch	116
5.19	Ultrafiltration der Milchproben	117
5.20	Gradient zur Bestimmung von Colistin in Milch mittels LC-FL-Detektion	119
5.21	Lagerungsbedingungen für den Kalibrierstandard	120
5.22	Ergebnisse der Kalibrierstandard-Stabilitäts-Untersuchungen in %	122
5.23	Merkmale (Faktoren) und deren verwendete Ausprägungen (Variationen)	123
5.24	Faktor Level-Kombination - Durchführungsplan	124
5.25	Konzentrationslevel und Dotierungsvolumen für die Validierung	124

5.26	Summe der Peakflächen von Colistin A und Colistin B	125
5.27	Mittlere Kalibrierfunktion	126
5.28	Summe der Konzentrationen von Colistin A und Colistin B	127
5.29	Verhältnis der Signalfächen von m/z 586 zu m/z 579	128
5.30	Retentionszeiten [min] der Analyten in den Analyseproben	128

Abbildungsverzeichnis

1.1	Colistin	10
1.2	Strukturformel von Colistinmethansulfonat	11
1.3	Polymyxin B	13
1.4	Derivatisierungsreaktion	19
3.1	Korrekturfaktor für die quantitative Bestimmung von Colistin	23
3.2	LC-Fluoreszenz-Chromatogramm eines Colistin-Standards (500 ng)	25
3.3	LC-Fluoreszenz-Chromatogramm eines Colistin-Standards (100 ng)	25
3.4	LC-Fluoreszenz-Chromatogramm eines Colistin-Standards (100 ng)	26
3.5	LC-Fluoreszenz-Chromatogramme von Colistin-Standards	28
3.6	LC-Fluoreszenz-Chromatogramme von Colistin und Polymyxin B	31
3.7	Massenspektrum eines Colistin-Standards in ACN/H ₂ O (b)	33
3.8	Massenspektrum eines Colistin-Standards in NH ₄ Ac/HFO	36
3.9	Fragmentierungskurven von Colistin (a) und Polymyxin B (b)	37
3.10	MS/MS-Spektren von Colistin-Standards verdünnt in 1 mM NH ₄ Ac / 0,5 % HFO	38
3.11	Massenspektrum und MS/MS-Spektrum von Polymyxin B	39
3.12	TIC- und MS/MS-Chromatogramme von Colistin und Polymyxin B	42
3.13	Chromatogramm einer Rohmilch-Leerwertprobe	45
3.14	Chromatogramme zweier Leerwertproben	46
3.15	Chromatogramme einer Leerwertprobe und einer dotierten Probe	50
3.16	MS/MS-Chromatogramme einer Leerwertprobe und einer dotierten Probe	52
3.17	Grafische Darstellung der Stabilitätsuntersuchungen (a & b)	55
3.18	Grafische Darstellung der Stabilitätsuntersuchungen (c & d)	55
3.19	Chromatogramme von Colistin nach 52-wöchiger Lagerung (Stabilitätstest)	56
3.20	Chromatogramme der vier Colistinstandards nach 52-wöchiger Lagerung (Stabilitätstest) und eines frisch hergestellten Colistinstandards	59

Abbildungsverzeichnis

3.21 Chromatogramme von Leerwertproben und dem Colistin- bzw. Polymyxin B-CR-Standard	61
3.22 MS/MS-Chromatogramme von mit dem CR-Standard auf das 0-, 0,5-, 1-, 1,5- und 2-fache Niveau des zulässigen Grenzwertes dotierten Leerwertproben (a,b: m/z 579 und c,d: m/z 586)	63
3.23 Messungenauigkeiten innerhalb des validierten Kalibrationsbereiches . . .	70
3.24 Gesamtkalibrierkurve und Vorhersageintervall	71
3.25 Gütekurve	72
5.1 Geradengleichung	126
5.2 Gleichung zur Berechnung der Konzentration von Colistin in Milch . . .	126

Akronyme, Abkürzungen und Symbole

$[M + nH]^{n+}$	positiv geladenes Molekölion
$[M - nH]^{n-}$	negativ geladenes Molekölion
<	kleiner als
>	größer als
\leq	kleiner gleich
\geq	größer gleich
\approx	ungefähr
Abk.	Abkürzung
ACN	Acetonitril
BG	Bestimmungsgrenze
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
C12	Dodecyl-derivatisierte stationäre Phase
C18	Octadecyl-derivatisierte stationäre Phase
C18ec	Octadecyl-derivatisierte endcapped stationäre Phase
C30	Triacontyl-derivatisierte stationäre Phase
C8	Octyl-derivatisierte stationäre Phase
CC α	<i>critical concentration</i> (kritische Konzentration [einschließlich des α -Fehlers] = Entscheidungsgrenze)

Akronyme, Abkürzungen und Symbole

CC β	<i>critical concentration</i> (kritische Konzentration [einschließlich des β -Fehlers] = Nachweisvermögen)
CE	<i>collision energy</i> (Kollisionsenergie)
CID	<i>collision induced decomposition</i> (kollisionsinduzierte Spaltung/Zerfall)
CITAC	<i>Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry</i> (Kooperation über die internationale Rückverfolgbarkeit in der analytischen Chemie)
CRS	<i>certified reference standard</i> (zertifizierter Referenzstandard)
CR-Standard	<i>certified reference standard</i> (zertifizierter Referenzstandard)
Dab	L-2,4-Diaminobuttersäure
DA	Dioden-Array
DIMDI	Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA/EIA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunsorptinstest)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Europäische Arzneimittelagentur)
EN	Europäische Norm
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i> (Elektrospray-Ionisierung)
ESI-MS/MS	Elektrospray-Tandemmassenspektrometrie
EU	Europäische Union
EURACHEM	Organisation, die den Fokus auf analytische Chemie und sachbezogene Qualität in Europa setzt
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft (ab 1995: EG = Europäische Gemeinschaft)
FL	Fluoreszenz

GFC	Gelfiltrationschromatographie
HCl	Salzsäure
HFO	<i>formic acid</i> (Ameisensäure)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigchromatographie)
i.D.	innerer Durchmesser [mm]
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i> (Internationale elektrotechnische Kommission)
Ile	Isoleucin
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Internationale Organisation für Normung)
IU	<i>international unit</i> (Internationale Einheit)
k. A.	keine Angabe
KAc	Kaliumacetat
K ₃ BO ₃	Kaliumborat
kDa	kiloDalton
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie, wird auch synonym für HPLC verwendet)
LC-ESI-MS/MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Elektrospray-Tandemmassenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MeOH	Methanol
MOA	Methyloctansäure
MHA	Methylheptansäure
MRL	<i>maximum residue limit</i> (Rückstandshöchstgrenze)

Akronyme, Abkürzungen und Symbole

MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MUNLV	Ministerium für Umwelt, Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz in NRW
n	Anzahl
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NH ₄ FO	Ammoniumformiat
NMWL	<i>nominal molecular weight limit</i> (nominelle Molekulargewichtsgrenze)
NRKP	Nationaler Rückstandskontrollplan
NG	Nachweisgrenze
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PTFE	Polytetrafluorethylen
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
RSD	<i>relative standard deviation</i> (relative Standardabweichung)
RT	Retentionszeit
S/N	<i>signal to noise (ratio)</i> (Signal/Rausch [-Verhältnis])
SCX	<i>strong cation exchange</i> (starker Kationenaustauscher zur Festphasenextraktion)
SIM	<i>selected ion monitoring</i> (Einzelmassenregistrierung)
SPE	<i>solid phase extraction</i> (Festphasenextraktion)
SVUA-Krefeld	Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Krefeld; jetzt: CVUA-RRW (Arbeitsgemeinschaft Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr-Wupper)

TAM	Tierarzneimittel
TCA	<i>trichloric acid</i> (Trichloressigsäure)
TEA	Triethylamin
TFA	<i>trifluoric acid</i> (Trifluoressigsäure)
TIC	Totalionenchromatogramm
UV	ultraviolettes Licht
UV/VIS	ultraviolettes und sichtbares (visible) Licht
<i>v/v</i> oder <i>v/v/v/v</i>	Volumenverhältnis
VO	Verordnung
WDF	Wiederfindungsrate [%]
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)

1 Einleitung

Colistin ist eine seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts bekannte antimikrobiell wirkende Substanz bei der Therapie von durch gramnegativen Bakterien wie *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella ssp.* und *P. aeruginosa* verursachten Infektionen wie beispielsweise Darminfektionen und Mastitis bei lebensmittelliefernden Tieren im Veterinärbereich. Im Humanbereich wird dieses Antibiotikum zur Behandlung von Mukoviszidose-Patienten (cystischer Fibrose) eingesetzt ([AKTORIES U. A. \(2005\)](#); [LÖSCHER U. A. \(2006\)](#); [EMEA \(2002\)](#); [KOYAMA U. A. \(1950\)](#)). Colistin ist ein verschreibungspflichtiges Arzneimittel und als Sulfat oder Methansulfonat erhältlich. Während für den Veterinärbereich ausschließlich Colistinsulfat angeboten wird, kommt in der Humanmedizin auch das Colistinmethansulfonat zum Einsatz ([DIMDI \(2004, 2006\)](#)).

Lange Zeit wurde Colistin aufgrund der ihm zugeschriebenen Nephro- und Neurotoxizität, die in neueren Studien nicht belegt werden konnte, selten verwendet. Im Zuge von vermehrt auftretenden Multiresistenzen bei gramnegativen Erregern gewinnt Colistin seit den 1990er Jahren an Bedeutung und kommt vermehrt zum Einsatz, da Resistenzentwicklung selten stattfindet ([LITTLEWOOD U. A. \(2000\)](#); [LI U. A. \(2005\)](#); [FALAGAS U. KASIAKOU \(2006A\)](#); [MUTSCHLER U. A. \(2008\)](#)). Durch die fast ausschließliche lokale Anwendung bezeichnet man Colistin auch als Lokalantibiotikum. Nach oraler Aufnahme findet eine Resorption nur geringfügig statt, so dass es sich auch bei dieser Applikation um eine lokale Anwendung handelt ([LÖSCHER U. A. \(2006\)](#); [EMEA \(2002\)](#); [KIETZMANN \(2004\)](#); [DIMDI \(2004, 2006\)](#)).

Im Gegensatz zur Humanmedizin werden Antibiotika in der Veterinärmedizin für lebensmittelliefernde Tiere nicht nur zur Therapie, sondern auch zur Prophylaxe und zur Metaphylaxe eingesetzt. Die Verwendung als leistungsfördernder Zusatzstoff in Futtermitteln ist seit dem 01.01.2006 nicht mehr zulässig. Neben der Anwendung von Antibiotika beim Menschen wird deren Einsatz im Veterinärbereich auch als eine Ursache für die Zunahme der Resistenzen bei Problemkeimen in der Mikrobiologie diskutiert. Allerdings wird Colistin in dem Sinne kein verbrauchergefährdendes Potential zugesprochen, da es praktisch nicht resorbiert wird und kaum Resistenzen bildet ([SCHWARZ U. KEHREN-](#)

1 Einleitung

BERG (2000); EMEA (1999); KIETZMANN (2004)). Grundsätzlich sind Rückstände an Colistin in Milch dennoch nicht auszuschließen, da die Applikation zur Behandlung der Mastitis über direkte Injektion in den Euterzitzenkanal erfolgt.

Im Rahmen des vorbeugenden Verbraucherschutzes werden Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen durchgeführt (Richtlinie 96/23/EG; Entscheidung 97/747/EG). Ziel des Nationalen Rückstandskontrollplans ist die Aufdeckung illegaler Anwendungen verbotener oder nicht zugelassener Stoffe sowie die Kontrolle des vorschriftsmäßigen Einsatzes von zugelassenen Tierarzneimitteln. Bei den zugelassenen Tierarzneimitteln wird die Einhaltung der in der Verordnung (EWG) 2377/90 festgelegten Höchstmengen überprüft. Der jährlich vom BVL aufgestellte Rückstandskontrollplan enthält für jedes Bundesland konkrete Vorgaben über die Anzahl der zu untersuchenden Tiere oder tierischen Erzeugnisse, die zu untersuchenden Stoffe, die anzuwendende Methodik und die Probenahme. Die Probenahme erfolgt überwiegend zielorientiert, dabei werden Kenntnisse über saisonale, örtliche oder regionale Gegebenheiten mitberücksichtigt. Der Rückstandskontrollplan umfasst alle der Lebensmittelgewinnung dienenden Tiere sowie Primärerzeugnisse vom Tier wie Milch, Eier und Honig.

Der jährliche Untersuchungsumfang wird von jedem Bundesland als eigenständige gesetzliche Aufgabe im Rahmen der amtlichen Kontrollen durchgeführt. Nordrhein-Westfalen soll entsprechend dem Nationalen Rückstandskontrollplan u. a. Untersuchungen auf das Polypeptid-Antibiotikum Colistin durchführen.

Nähere Informationen sind dem nicht veröffentlichten Nationalen Rückstandskontrollplan (SVUA-Krefeld) zu entnehmen. Danach wird zwischen den Polypeptid-Antibiotika Bacitracin und Virginiamycin M1 und den Polymyxinen Colistin und Polymyxin B unterschieden. Untersuchungen im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplans auf Polymyxine wurden bisher weder in Nordrhein-Westfalen noch bundesweit durchgeführt (Tabelle 1.1; BVL).

Tabelle 1.1: Jahresberichte zum Nationalen Rückstandskontrollplan bezüglich Polypeptid-Antibiotika (BVL)

Jahr	Angaben über durchgeführte Untersuchungen auf Polypeptid-Antibiotika	Matrix
1999	nicht aufgeführt	
2000	31	Milch
2001	7	Milch
2002	14	Milch
2003 ¹	23 (Bacitracin)	Milch
2003	28 (Virginiamycin M1)	Eier
2004	3	Eier
2005	nicht aufgeführt	
2006	nicht aufgeführt	
2007	nicht aufgeführt	

1.1 Rechtliche Beurteilung und Anforderungen

Verbraucherschutz ist eine europäische und damit auch eine nationale Aufgabe, die umfassend in vielen Rechtsvorschriften geregelt ist ([KOMMISSION \(2000\)](#)). Der hohe Stellenwert des Verbraucherschutzes in der Europäischen Union spiegelt sich in der Gesetzgebung wieder. Auch im Bereich der Tierarzneimittel hat die Europäische Union schon sehr früh einheitliche Höchstmengen für Rückstände festgelegt, beispielsweise mit der Verordnung ([EWG](#)) [2377/90](#), die Grundsätze der Unbedenklichkeitsprüfungen und der Verfahren für Höchstmengen an Rückständen regelt. Arzneimittel, die neue pharmakologische Stoffe enthalten, werden zur Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren nur dann zugelassen, wenn sie gesundheitlich unbedenklich sind und für die verwendeten Wirkstoffe Rückstandshöchstwerte in essbaren Geweben und anderen tierischen Produk-

¹im Jahr 2003 wurden Einzelergebnisse aufgeführt

1 Einleitung

ten festgelegt sind, dabei werden neue wissenschaftliche Kenntnisse in laufenden Änderungsverordnungen berücksichtigt. Die Rückstandshöchstmengen sind Beurteilungsgrenzen und als legale Konzentrationsobergrenzen von Marker-Rückständen in den essbaren Geweben (Zielgeweben) definiert. Marker-Rückstände sind Leitrückstände und bezeichnen jene Komponenten eines Tierarzneimittels, die für die Rückstandsüberwachung relevant sind. Zielgewebe sind jene essbaren Gewebe, in denen Marker-Rückstände bestimmt werden. Fett oder Muskel werden immer als Zielgewebe untersucht. Eier, Milch oder Honig sind immer dann Zielgewebe, wenn der Wirkstoff für Legegeflügel, milchliefernde Tiere oder Honigbienen vorgesehen ist. Grundsätzlich kann es durch die Behandlung lebensmittelliefernder Tiere mit Arzneimitteln zu Rückständen in Produkten dieser Tiere kommen. Zum Schutz der Verbraucher dürfen die aus diesen Produkten gewonnenen Lebensmittel gewerbsmäßig nicht in den Verkehr gebracht werden, wenn in oder auf ihnen Stoffe mit pharmakologischer Wirkung oder deren Umwandlungsprodukte vorhanden sind, die die nach der Verordnung (EWG) 2377/90 festgesetzten Höchstmengen überschreiten (§ 10(1) LFGB (2005)). Verstöße wie Höchstmengenüberschreitungen, Verwendung nicht für die Tierart zugelassener Stoffe oder Verwendung nicht zugelassener oder registrierter Stoffe werden strafrechtlich verfolgt.

Colistin wurde mit der Verordnung (EG) 1181/2002 in den Anhang I der Verordnung (EWG) 2377/90 aufgenommen, nachdem es zuvor im Anhang III gelistet war (Tabelle 1.2). In der Verordnung (EWG) 2377/90 werden die in Tierarzneimitteln verwendeten pharmakologisch wirksamen Substanzen in vier Kategorien eingeteilt:

- Anhang I enthält Stoffe mit endgültig festgelegten Rückstandshöchstmengen;
- Anhang II enthält Stoffe, bei denen im Interesse der öffentlichen Gesundheit eine Festsetzung von Rückstandshöchstmengen nicht erforderlich ist;
- Anhang III ist ein Verzeichnis der Stoffe, für die vorläufige Höchstmengen festgelegt sind;
- Anhang IV führt die Stoffe auf, für die keine unbedenklichen Rückstandshöchst-mengen festgelegt werden können, da das Vorhandensein dieser Stoffe in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs in jedem Falle eine Gefährdung der Gesundheit des Verbrauchers darstellt.

Tabelle 1.2: MRL-Werte von Colistin gem. Anhang I VO (EWG) 2377/90

Pharmakologisch wirksamer Stoff	Marker-Rückstand	Tierart	Rückstandshöchstmenge	Zielgewebe
Colistin	Colistin	Alle zur Lebensmittel- erzeugung genutzten Arten	150 µg/kg	Fett
			150 µg/kg	Muskel
			150 µg/kg	Leber
			200 µg/kg	Niere
			50 µg/kg	Milch
			300 µg/kg	Eier

Stoffe, die nicht im Anhang I-III der Verordnung (EWG) 2377/90 aufgeführt sind, dürfen in der Europäischen Union nicht an zur Nahrungsmittelerzeugung genutzte Tiere verabreicht werden.

Polymyxin B gehört zu den Polymyxinen und ist weder im Anhang I noch III der Verordnung (EWG) 2377/90 aufgeführt. Nationale Ausnahmen wurden zum April 2002 (FLHV (2002)) aufgehoben und damit dem europäischen Recht angeglichen.

1.1.1 Rechtliche Anforderungen an die Analytik von pharmakologisch wirksamen Substanzen

Messwerte weisen mehr oder weniger große Messunsicherheiten auf, die sich aus der Summe systematischer und zufälliger Fehler ergeben.

Systematische Fehler führen unter identischen Messbedingungen immer zu gleich großen positiven oder negativen Abweichungen eines Messwertes vom „wahren“ Wert, d.h. der gemessene Wert ist entweder immer größer oder kleiner als der „wahre“ Wert. Ursachen systematischer Fehler können z.B. Umwelteinflüsse oder Störungen der Messgeräte sein.

Demgegenüber führen zufällige (oder statistische) Fehler unter identischen Messbedingungen sowohl zu positiven als auch zu negativen aber nicht gleich großen Abweichungen.

²MRL=Maximum Residue Limit

1 Einleitung

Zufällige Fehler sind unvermeidlich und nicht exakt bestimmbar, sie lassen sich jedoch mit statistischen Methoden berechnen (z.B. Standardabweichungen), und die ermittelten Messwerte können entsprechend korrigiert werden (z.B. ausreißerfreie Messwerte).

Um sowohl systematische als auch zufällige Fehler zu erfassen, legte die Kommission mit ihrer Entscheidung [2002/657/EG](#) neue Anforderungen an die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen hinsichtlich der Untersuchung auf pharmakologisch wirksame Rückstände im Rahmen der amtlichen Kontrolle fest. Das Konzept der standardisierten Methoden wird - unter Berücksichtigung der Fortschritte in der chemischen Analytik - durch einen Kriterienansatz ersetzt, bei dem Leistungskriterien und Verfahren für die Validierung von Screening- und Bestätigungsmethoden festgelegt werden. Die in der Entscheidung der Kommission [2002/657/EG](#) verbindlich vorgegebenen Kriterien für die Auswertung der Ergebnisse dienen einer harmonisierten Umsetzung der Richtlinie [96/23/EG](#) und gelten für akkreditierte, amtliche Kontrolllaboratorien. Der Kriterienansatz beinhaltet grundsätzliche inhaltliche Änderungen:

1. Neu eingeführt werden die Entscheidungsgrenze und das Nachweisvermögen. „Die Entscheidungsgrenze ($CC\alpha$) ist der Grenzwert, bei und über dem mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von α bestimmt werden kann, dass eine Probe positiv ist.“ Der α -Fehler muss bei Stoffen der Gruppe B, in diesem Fall auch für Colistin, kleiner oder gleich 5% sein. „Das Nachweisvermögen ($CC\beta$) ist der kleinste Gehalt des Stoffs, der mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von β in einer Probe nachgewiesen, identifiziert und/oder quantifiziert werden kann. Im Fall von Stoffen mit einem festgelegten zulässigen Grenzwert bedeutet dies, dass das Nachweisvermögen die Konzentration ist, bei der die Methode zulässige Grenzkonzentrationen mit einer statistischen Sicherheit von $1 - \beta$ nachzuweisen vermag“. Die Entscheidungsgrenze und das Nachweisvermögen für MRL-Substanzen entsprechen nicht den bisher gebräuchlichen Nachweis- oder Bestimmungsgrenzen. Diese sind nach den Anforderungen der Kommissionsentscheidung nicht mehr erforderlich, da sie für die Kontrolle und die rechtliche Beurteilung von Grenzwerten keine Relevanz haben. Für die Beurteilung von Bedeutung ist allein der $CC\alpha$ -Wert. Eine Probe ist ab einer Konzentration, die gleich oder oberhalb des $CC\alpha$ liegt, nicht mehr rechtskonform. In der Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ ist bereits die in der [EN ISO/IEC 17025:2005 \(2005\)](#) geforderte Messunsicherheit in Form der laborinternen Reproduzierbarkeit berücksichtigt. Der $CC\alpha$ liegt definitionsgemäß stets oberhalb des festgelegten MRL-Wertes. Das Nachweisvermögen $CC\beta$ hat für die rechtliche Beurteilung keine Funktion. $CC\beta$ ist ein Parameter, der zur Einschätzung der Leistungsfähigkeit der

Methode hinsichtlich der falsch-negativ Rate der Methode (β -Fehler) herangezogen werden kann. Er steht im Zusammenhang mit der Streuung der ermittelten Messwerte und dem ermittelten $CC\alpha$. Das Risiko, ein falsch-negatives Ergebnis zu erhalten, entspricht dem β -Fehler β und ist in der Entscheidung der Kommission [2002/657/EG](#) auf maximal 0,05 festgelegt worden ([GOWIK \(2003\)](#)).

2. Ein weiteres, neues Element der Kommissionsentscheidung ist bei Bestätigungsmethoden die Etablierung des Systems der Identifizierungspunkte. Identifizierungspunkte werden bestimmten Detektionsverfahren zugeordnet, wobei die Vergabe der Punkte in Abhängigkeit der jeweiligen Selektivität erfolgt. Mögliche Methoden zur Bestätigung von Colistin sind LC mit Fluoreszenzdetektion und LC mit massenspektrometrischer Detektion. Mit den Methoden sind drei Punkte zu erreichen. Zur Erhaltung der Mindestzahl an Identifikationspunkten dürfen maximal drei separate Verfahren kombiniert werden.
3. Die chromatographische Trennung mittels LC-Verfahren muss mit geeigneten LC-Säulen durchgeführt werden, wobei als Leistungskriterium für den Analyten mindestens das Zweifache der Retentionszeit des Totvolumens dient. Weiterhin muss die Retentionszeit des Analyten in Matrix mit einer Toleranz von $\pm 2,5\%$ der des Kalibrierstandards entsprechen.

Bei der massenspektrometrischen Detektion unter Verwendung von Triple-Quadrupol-Systemen (MRM Modus) wird für jede im ersten Quadrupol fixierte Vorläufermasse ein und für jedes im dritten Quadrupol gemessene diagnostische Fragmentation jeweils 1,5 Punkte angerechnet. Zusätzlich ist dabei mindestens ein Ionenverhältnis zu messen. Die Ionenintensitäten der einzelnen Fragmentationen sind relativ zur Intensität des Basisions (100%) auszudrücken und für das Fragmentationsintensitätsverhältnis gelten konzentrations- und technikabhängige Toleranzen.

Die LC-Fluoreszenzdetektion darf nur für Stoffe der Gruppe B (Tierarzneimittel) angewendet werden und eignet sich für Moleküle, die eine natürliche Fluoreszenz oder eine Fluoreszenz nach Derivatisierung zeigen. Anregungs- und Emissionswellenlängen sind so zu wählen, dass störende Bestandteile in Leerwertprobenextrakten auf ein Mindestmaß reduziert sind. Für die LC-Fluoreszenzdetektion kann ein Identifizierungspunkt angerechnet werden.

4. Validierung ist entsprechend der [EN ISO/IEC 17025:2005 \(2005\)](#) „die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden“. Mit der Validierung müssen die in der Entscheidung [2002/657/EG](#) geforderten Kriterien für die Leistungsmerkmale erfüllt sein. Die Kommissionsentscheidung ermöglicht ein herkömmliches und ein alternatives Verfahren zur Validierung. In dieser Arbeit fiel die Wahl auf die alternative Vorgehensweise, da mit ihr erheblich weniger Untersuchungen erforderlich sind und mittlerweile kommerziell erhältliche Auswertprogramme zur Verfügung stehen, um die Vorgaben der Entscheidung zu erfüllen.

Unabhängig vom Validierungsverfahren müssen allgemeine Leistungsmerkmale wie Spezifität, Richtigkeit, Robustheit und Stabilität bestimmt werden. In Abhängigkeit der Analytkonzentration gibt es für die Richtigkeit vorgeschriebene Toleranzbereiche. Darüber hinaus sind bei der quantitativen Bestätigungsmethode - neben der Entscheidungsgrenze und dem Nachweisvermögen - Wiederfindung, Wiederholpräzision pro Konzentrationsstufe, laborinterne Reproduzierbarkeit pro Konzentrationsstufe, Robustheit und Kalibrierkurven zu bestimmen.

1.2 Eigenschaften von Polypeptid-Antibiotika

Peptide (von griech.: *peptos* = verdaulich) und Proteine (von griech.: *proteuein* = der Erste sein), spielen in Lebensprozessen eine große und bedeutende Rolle. Ihre enorme Bedeutung wird in ihren vielfältigen Funktionen deutlich: Enzymatische Katalyse, Transport und Speicherung, Koordination der Bewegung, Stützfunktion, Erzeugung und Übertragung von Signalen sowie Kontrolle von Wachstum und Immunabwehr. Die bemerkenswerte Bandbreite der Aktivität wird ermöglicht durch die charakteristischen Strukturen der Peptide und Proteine. Die Strukturvielfalt der ribosomal synthetisierten Peptide und Proteine basiert auf den elementaren Untereinheiten, den 20 proteinogenen L- α -Aminosäuren.

Peptide und Proteine können nicht nur ribosomal, sondern auch nicht-ribosomal synthetisiert werden. Während alle Spezies einschließlich Bakterien Peptide und Proteine ribosomal bilden, können Bakterien diese zusätzlich in einer großen strukturellen Vielfalt nicht-ribosomal synthetisieren.

Im Gegensatz zur ribosomalen Peptidsynthese ist die nicht-ribosomale Peptidsynthese an nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (große modular aufgebaute Multienzymkomple-

xe) nicht auf den Einbau von 20 Aminosäuren limitiert. Monomere Bausteine der nicht-ribosomal synthetisierten Peptide sind somit nicht nur die proteinogenen L- α -Aminosäuren, sondern auch (L)- und (D)- α -Aminosäuren, α -Hydroxy- und Carbonsäuren sowie β -, γ - und δ -Aminosäuren. Eine große Anzahl an Peptiden mit antimikrobieller Wirkung wird nicht-ribosomal synthetisiert (DÜRFAHRT U. MARAHIEL (2005)). Polypeptid-Antibiotika, deren Aminosäure-Sequenzen zum Ring geschlossen sind, bezeichnet man als homodet zyklische Peptid-Antibiotika. Weiterhin können die Polypeptid-Antibiotika entsprechend ihrer weiteren Bausteine in homomere, die nur aus Aminosäuren aufgebaut sind, und in heteromere, die außer Aminosäuren auch andere Bausteine (z.B. Fettsäuren) enthalten, klassifiziert werden. Durch den zyklischen Aufbau und dem hohen Anteil an nicht-proteinogenen Aminosäuren sind diese Polypeptid-Antibiotika resistent gegenüber Proteolyse (SEWALD U. JAKUBKE (2002); HANCOCK U. CHAPPLE (1999)).

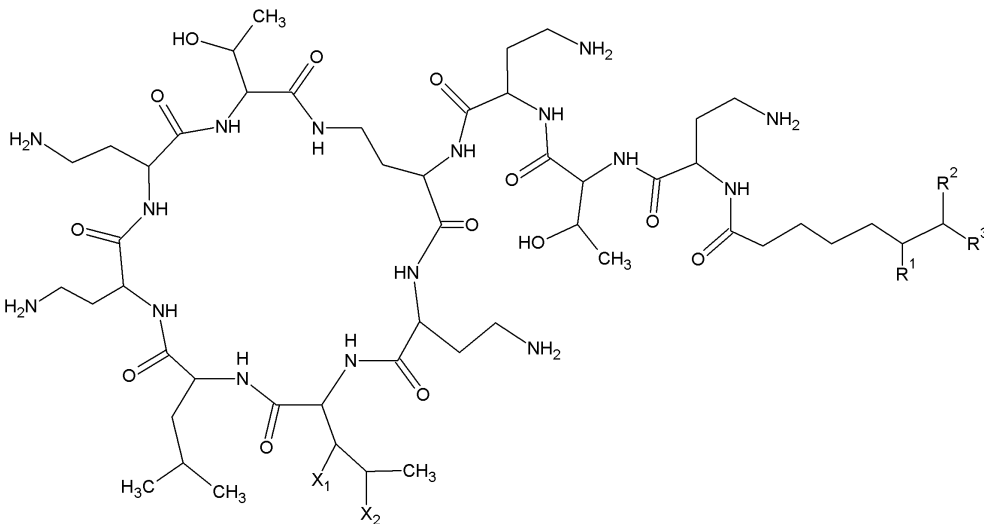
1.2.1 Colistin

Colistin, ein nicht-ribosomal synthetisiertes Polypeptid-Antibiotikum, war das erste in Japan entdeckte Antibiotikum (KOYAMA U. A. (1950)). Es ist identisch mit Polymyxin E (SUZUKI U. FUJIKAWA (1965)), wird von *Paenibacillus polymyxa* var. *colistinus* (synonym: *Bacillus polymyxa*) produziert und setzt sich aus einer komplexen Mischung ähnlich strukturierter Polymyxine zusammen. Colistin besteht insgesamt aus zehn Aminosäuren: sechs L-2,4-Diaminobuttersäure, zwei L-Threonin, eine L-Leucin und eine D-Leucin bzw. D-Isoleucin. Die Verbindung ist ein zyklisch verzweigtes Heptapeptid mit einem L-2,4-Diaminobuttersäure-Rest in der Verzweigungsposition, der über die 4-Aminofunktion mit der Carboxygruppe einer weiteren Aminosäure die Ringstruktur ausbildet und an dessen 2-Aminogruppe eine Tripeptidsequenz geknüpft ist. Die terminale Aminogruppe der Tripeptidseitenkette trägt einen verzweigten Fettsäurerest. Bemerkenswert ist der hohe Anteil an nicht-proteinogenen L-2,4-Diaminobuttersäuren und das Vorkommen einer D-Aminosäure (SEWALD U. JAKUBKE (2002)). Bisher konnten mindestens 30 Colistin-Komponenten isoliert werden, von denen 13 identifiziert wurden (ORWA U. A. (2000, 2001); GOVAERTS U. A. (2003)). Sie unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung bezüglich einer Aminosäure und des Fettsäurerestes (ORWA U. A. (2001); GOVAERTS U. A. (2003); ELVERDAM U. A. (1981)). Die beiden Hauptkomponenten sind Colistin A (Polymyxin E 1) und Colistin B (Polymyxin E 2), Nebenkomponten sind beispielsweise die in der Monographie genannten Polymyxin E3, Polymyxin E3-Ile und Polymyxin E1-7 MOA (Tabelle 1.3, Abbildung 1.1) (PHARMACOPOEIA (2004)). Polymyxin E3-Ile wird in älterer Literatur auch als Circulin bezeichnet (ELVERDAM U. A.

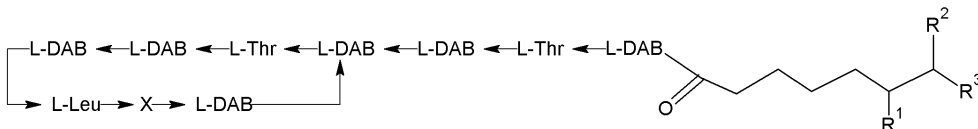
1 Einleitung

(1981); KIMURA U. A. (1981)) und zeichnet sich dadurch aus, dass die Aminosäure Leucin durch deren Isomer Isoleucin ersetzt ist.

Die Verhältnisse von Colistin A und Colistin B in kommerziell erhältlichen Produkten unterscheiden sich von Anbieter zu Anbieter und von Charge zu Charge. Dies könnte der Grund für das allgemein bekannte Problem der unterschiedlichen mikrobiologischen Wirksamkeit sein (THOMAS U. A. (1980); ELVERDAM U. A. (1981); KRISTENSEN U. HANSEN (1993); DECOLIN U. A. (1997)), zumal Colistin A einen wesentlichen Anteil an der antimikrobiellen Aktivität besitzt (KLINE U. A. (2001)).

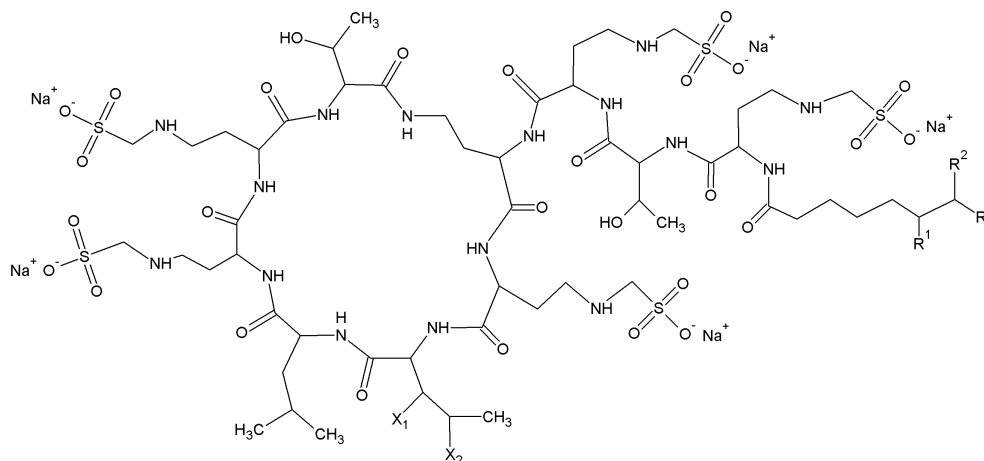


(a) Strukturformel von Colistin



(b) Formel (im internationalen 3-Buchstabencode) nach Pharmacopeia 2004

Abbildung 1.1: Colistin

**Abbildung 1.2:** Strukturformel von Colistinmethansulfonat**Tabelle 1.3:** Colistin-Komponenten

Polymyxin	X	X ₁	X ₂	R ¹	R ²	R ³	M _R	Summenformel	% ³
Polymyxin E1 (Colistin A)	D-Leu	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	1170	C ₅₃ H ₁₀₀ N ₁₆ O ₁₃	44,2
Polymyxin E1-Ile	D-Ile	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H	1170	C ₅₃ H ₁₀₀ N ₁₆ O ₁₃	3,3
Polymyxin E1-7 MOA	D-Leu	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	1170	C ₅₃ H ₁₀₀ N ₁₆ O ₁₃	3,1
Polymyxin E2 (Colistin B)	D-Leu	H	CH ₃	CH ₃	H	H	1155	C ₅₂ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₃	33,7
Polymyxin E3	D-Leu	H	CH ₃	H	CH ₃	H	1155	C ₅₂ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₃	2,6

Zwei verschiedene Formen von Colistin sind handelsüblich: Colistinsulfat für orale und topikale Anwendungen und Colistinmethansulfonat zur parenteralen und aerosolen Therapie (Tabelle 1.3, Abbildungen 1.1 und 1.2). Letzteres hydrolysiert in wässrigem Medium und bildet eine komplexe Mischung von teilsulfomethylierten Derivaten (LI U. A. (2003B)). In der Veterinärmedizin kommt ausschließlich Colistinsulfat zur Anwendung, so dass im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter auf Colistinmethansulfonat eingegangen wird.

³Anteil im CR-Standard nach European Pharmacopoeia

1 Einleitung

Colistinsulfat ist eine weiß bis fast weiße, hygroskopische Verbindung mit amphiphilem Charakter und enthält pro Mol Colistin 1,8- 2,1 mol SO_4^{2-} ([PHARMACOPOEIA \(2004\)](#)). Die Bezeichnung Colistin wird synonym für Colistin und Colistinsulfat verwendet.

Dem Fettsäurerest ist die hydrophobe und den fünf unmaskierten L-2,4-Diaminobuttersäuren die basische Eigenschaft zuzuschreiben. Als solches kann sich die amphiphile Verbindung in polarer und unpolarer Umgebung als basisches kationisches Detergenz zwischen den Phospholipiden der bakteriellen Cytoplasmamembran einlagern und so deren Funktion als Permeabilitätsbarriere stören ([AKTORIES U. A. \(2005\)](#); [LÖSCHER U. A. \(2006\)](#); [PETERSON U. A. \(1985\)](#)).

Eine 1%ige wässrige Lösung von Colistinsulfat liegt im pH-Bereich von 4,0 bis 6,0 ([PHARMACOPOEIA \(2004\)](#)). Colistin ist in wässrigen Lösungen von pH 2 bis 6 stabil, über pH 6 nimmt die Stabilität kontinuierlich ab. Bei Temperaturen von 4 °C ist Colistin in wässriger Lösung 60 Tage stabil. Eine Abnahme der Konzentration wurde bei 37 °C nach 120 Stunden beobachtet. Bei 60 °C und einem pH von 1,4 kann nach 60 Stunden ein Abbau festgestellt werden, der bei höherem pH von 7,4 schon nach 6 Stunden messbar ist. Für die Instabilität sind chemische Reaktionen wie Deaminierung, Hydrolyse und Racemisierung verantwortlich. Die im sauren pH-Bereich gebildeten Abbauprodukte unterscheiden sich von denen im neutralen Medium (pH 5,4 und 7,4) ([ORWA U. A. \(2002\)](#); [LI U. A. \(2003A\)](#)).

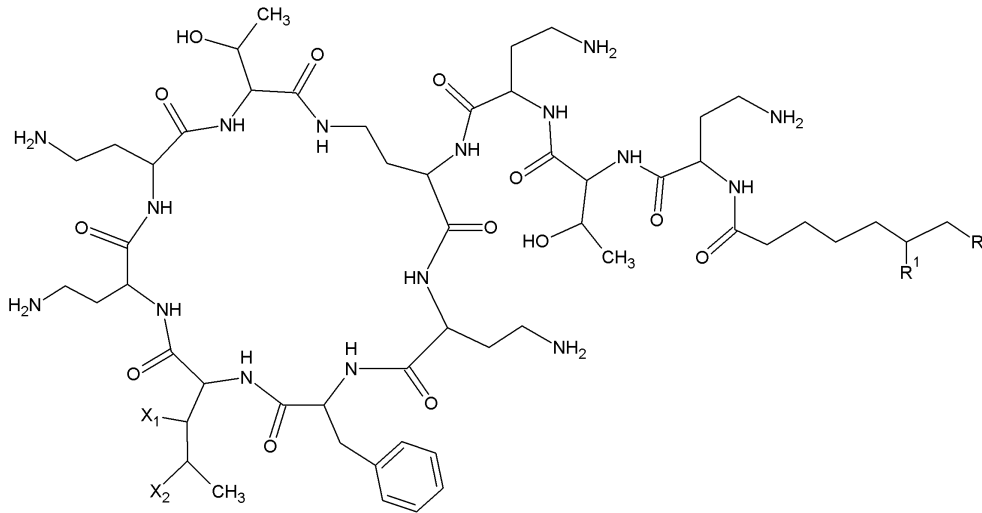
Colistin ist löslich in Wasser und sauren wässrigen Lösungen, schwer löslich in Methanol (MeOH) und praktisch unlöslich in Aceton und Ether. Colistin selbst besitzt keine spezifischen Fluorophore oder UV-Chromophore, so dass eine Detektion bei der Flüssigchromatographie im gewünschten Konzentrationsbereich nicht ohne einen geeigneten Derivatisierungsschritt möglich ist ([IKAI \(1995\)](#); [PHARMACOPOEIA \(2004\)](#)).

Colistin wird aufgrund seines hohen Anteils an nicht-ribosomalen Aminosäuren von Peptidasen oder Proteasen nicht hydrolysiert oder metabolisiert ([LI U. A. \(2005\)](#); [RO-EMPP \(2005\)](#); [SEWALD U. JAKUBKE \(2002\)](#); [HANCOCK U. CHAPPLE \(1999\)](#)), so dass es bei Rückstandsuntersuchungen in tierischer Matrix selbst als Marker-Rückstand dient (VO ([EWG](#)) 2377/90).

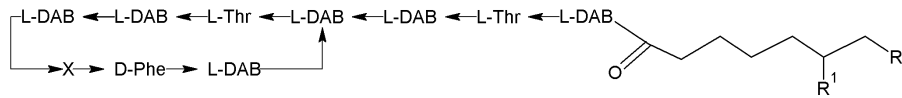
Die analytische Trennung und quantitative Bestimmung von dem aus homologen Verbindungen, die nicht im konstanten Verhältnis zueinander vorliegen, bestehenden Colistin in Milch ist aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaft eine große Herausforderung.

Polymyxin B (Abbildung 1.3) ist ein mit Colistin chemisch sehr nah verwandtes, unverzweigtes, zyklisches Decapeptid mit gleichem Wirkungsspektrum ([AKTORIES U. A. \(2005\)](#); [LÖSCHER U. A. \(2006\)](#); [PHARMACOPOEIA \(2004\)](#)). Polymyxin B wird in

Deutschland weder für den Human- noch für den Veterinärbereich angeboten (DIMDI (2004, 2006)).



(a) Strukturformel von Polymyxin B



(b) Formel (im internationalen 3-Buchstabencode) nach Pharmacopeia 2004

Abbildung 1.3: Polymyxin B

Tabelle 1.4: Polymyxin B-Komponenten

Polymyxin ⁴	X	X ₁	X ₂	R ¹	R ²	M _R	Summenformel
Polymyxin B1	L-Leu	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	1204	C ₅₆ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₃
Polymyxin B2	L-Leu	H	CH ₃	CH ₃	H	1190	C ₅₅ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₃
Polymyxin B3	L-Leu	H	CH ₃	H	CH ₃	1190	C ₅₅ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₃
Polymyxin B1-Ile	L-Ile	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	1204	C ₅₅ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₃

⁴Anteil im CR-Standard nach European Pharmacopoeia: Summe von B1, B2, B3, B1-Ile = 85,1 %

1.3 Analytik von Colistin in tierischer Matrix

Chemische Untersuchungsverfahren setzen sich aus Probennahme (einschließlich Transport und Lagerung), Probenvorbereitung, Probenaufarbeitung (Extraktion, Reinigung, Anreicherung), Messung (chromatographische Trennung und Detektion) und Auswertung zusammen (Tabelle 1.5).

Tabelle 1.5: Arbeitsschritte bei chemisch-physikalischen Untersuchungen

Schritt	rechtskräftige Regelung	
Probenahme, Transport, Lagerung	Entscheidung der Kommission 98/179/EG	präanalytischer Teil
Probenvorbereitung (Teilen, Homogenisieren)	Entscheidung der Kommission 98/179/EG	präanalytischer Teil/analytischer Teil
Probenaufarbeitung, -reinigung	Entscheidung der Kommission 2002/657/EG	analytischer Teil
Messung, chromatographische Trennung	Entscheidung der Kommission 2002/657/EG	analytischer Teil
Auswertung	Entscheidung der Kommission 2002/657/EG	analytischer Teil

Die Ergebnisse der Rückstandsanalytik können Grundlage für juristische Entscheidungen sein, verbunden mit zum Teil erheblichen wirtschaftlichen und strafrechtlichen Konsequenzen für die Betroffenen. Umso bedeutender ist die Justiziabilität analytischer Ergebnisse. Dies ist im Bereich amtlicher Rückstandskontrollen der Fall, wenn Ergebnisse den Anforderungen der Entscheidung [2002/657/EG](#) genügen. Unberücksichtigt bleibt bei Untersuchungen der präanalytische Teil, der außerhalb des Einflusses des Analytikers liegt. Die Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ berücksichtigt die in der [EN ISO/IEC 17025:2005 \(2005\)](#) geforderte Messunsicherheit und ist damit das justiziable Ergebnis.

In der Rückstandsanalytik werden Spurenstoffe u. a. in tierischer Matrix wie Milch, Eier und Muskulatur untersucht. Die einzelnen Arbeitsschritte richten sich dabei nach den chemisch-physikalischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanz und der jeweiligen Matrix, in der die Substanz analysiert wird. Zur Bestimmung von Rückständen

an Colistin in Milch oder anderer tierischer Matrix gibt es bisher nur wenige in der Literatur beschriebene Analysemethoden (Tabelle 1.6).

1.3.1 Probenaufarbeitung

Zur Bestimmung des Colistingehaltes in Arzneifuttermitteln wird in der Literatur eine einfache Extraktion mit 0,1 M Salzsäure beschrieben (MOROVJÁN U. A. (1998)), die für diese Problemstellung - aufgrund der hohen Colistin-Konzentrationen - ausreichend erscheint. Ebenso ist eine Aufreinigung des salzsauren Extraktes durch Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) zur Abtrennung der aus dem Futtermittel mitextrahierten Proteine (CANCHO GRANDE U. A. (2001)) erwähnt.

Die Untersuchung tierischer Matrix auf Rückstände an Polypeptid-Antibiotika erfordert vor der Aufreinigung eine vorherige Proteinfällung mit meist gleichzeitiger Extraktion. Verwendete Lösungsmittel sind Salzsäure und Trichloressigsäure in Kombination mit Oxalsäure oder Acetonitril (DECOLIN U. A. (1997); SUHREN U. KNAPPSTEIN (2005); SIN U. A. (2005)). Anschließend erfolgt in den meisten Fällen die Festphasenextraktion. Hauptziele der SPE sind Entfernung störender Matrixbestandteile sowie selektive Anreicherung und Isolierung der Analyten. An Sorbentien bieten sich hier modifizierte Kieselgele (C18, C8) zur Adsorption unpolarer Strukturen und starke Kationenaustauscherharze (aromatische Sulfonsäure) zur Extraktion ionischer Verbindungen an (DECOLIN U. A. (1997); GMUR U. A. (2003); SUHREN U. KNAPPSTEIN (2005)). Beschrieben wird auch eine Filtration über PTFE-Membranfilter (SIN U. A. (2005)).

1.3.2 Standardlösungen und Standardsubstanzen

Zum Nachweis der Leistungsfähigkeit eines Messverfahrens ist die Verwendung von entsprechenden Referenzstandards und Arbeitsstandards (Bezugsstandards) Voraussetzung. Colistin, als natürlich vorkommendes von Bacillus-Arten produziertes Antibiotikum, wird biosynthetisch gewonnen und ist für den Bereich der Veterinärmedizin kommerziell als Colistinsulfat erhältlich.

Tabelle 1.6: Analysemethoden-Übersicht (Schwerpunkt tierische Matrix und Futtermittel)

	Substanz	Technik	Matrix
KITAGAWA U. A. (1985)	Colistin	EIA	Forelle (Muskulatur, Leber, Niere, Serum)
LEROY U. A. (1989)	Colistinsulfat	Mikrobiologische Untersuchung	Kalb (Muskulatur, Leber, Niere, Fett)
HAMM U. A. (1990)	Colistinsulfat	Mikrobiologische Untersuchung	Schwein (Muskulatur, Leber, Fett)
DECOLIN U. A. (1997)	Colistinsulfat	LC-Fluoreszenzdetektion (Vorsäulenderivatisierung)	Rind (Muskulatur, Leber, Niere, Fett, Rohmilch)
MOROVJÁN U. A. (1998)	Colistin	LC-Fluoreszenzdetektion (Nachsäulenderivatisierung)	Futtermittel
HAMMER (1998)	Colistin	ELISA	Rohmilch
NOUWS U. A. (1999)	Colistin	Mikrobiologische Untersuchung	Rohmilch
CANCHO GRANDE U. A. (2001)	Colistinsulfat	LC-Fluoreszenzdetektion (Vorsäulenderivatisierung)	Futtermittel
GMUR U. A. (2003)	Colistin A (isoliert aus Colistin)	LC-Fluoreszenzdetektion (Vorsäulenderivatisierung)	Ratten-Plasma
SUHREN U. KNAPPSTEIN (2005)	Colistinsulfat	LC-Fluoreszenzdetektion (Vorsäulenderivatisierung)	Milch
SIN U. A. (2005)	Colistinsulfat	LC-MS/MS	Milch

Bislang waren ausschließlich mikrobiologische Standards auf dem Markt, deren Wirksamkeit in Internationalen Einheiten/mg (IU/mg) angegeben wird. Die Internationale Einheit (engl. *international unit* bzw. IU) ist eine Maßeinheit für in der Medizin verwendete Wirkstoffe. Es ist keine SI-Einheit im Sinne des Internationalen Einheitensystems. Die IU werden von der WHO durch Referenzpräparate oder international vereinbarte Standards definiert. Dies dient der reproduzierbaren Dosierung von Präparaten anhand ihrer Wirkung und nicht ihrer Stoffmenge oder Masse. Für jeden Wirkstoff wird das Verhältnis zwischen IU und Masse oder IU und Stoffmenge im Einzelfall festgelegt. Die reine Colistinbase hat eine Wirksamkeit von 1000 μg Basen-Aktivität pro mg Substanz, was einer Wirksamkeit von 30.000 IU/mg entspricht. Die theoretische Wirksamkeit von Colistinsulfat beträgt 24.000 IU/mg (EMEA (2002), Summary-Report 2). Chromatographische Bestimmungen solcher mikrobiologischen Standards zeigen, unabhängig von Lieferant und/oder Charge, zum einen ein nicht konstantes Verhältnis der beiden Komponenten Colistin A und Colistin B und zum anderen eine unterschiedliche Zusammensetzung der Komponenten. Dies erschwert die quantitative Bestimmung in tierischer Matrix enorm (DECOLIN U. A. (1997) und eigene Untersuchungen). Allen Standards gemein ist jedoch, dass Colistin A und Colistin B die Hauptkomponenten sind. Bei den in Tabelle 1.6 aufgeführten flüssigchromatographischen Analysemethoden wurde in allen Fällen ein mikrobiologischer Standard verwendet.

Als Marker-Rückstand bei Untersuchungen auf Colistinrückstände in tierischer Matrix dient Colistin ohne weitere Differenzierung (VO (EWG) 2377/90). Dies ist bei der chromatographischen Bestimmung ohne Weiteres nicht möglich, da durch die Chromatographie eine Trennung der Komponenten erfolgt. Legitimiert durch den Summary-Report 2 (EMEA (2002)) wird zur quantitativen Bestimmung von Colistin die Summe aus Colistin A und Colistin B gebildet. Im seit 2004 vom Europarat (*Council of Europe*) in Straßburg angebotenen zertifizierten Referenzstandard zur HPLC-Analyse sind Gehalte an Colistin A und Colistin B sowie drei weiterer Komponenten angegeben. Die Summe von Colistin A und Colistin B liegt demnach bei 77,9% und das Verhältnis von Colistin A zu Colistin B bei 1,31. Für die Analytik im Spuren- bzw. Rückstandsbereich sind die nicht quantifizierbaren Minorkomponenten zu vernachlässigen.

1.3.3 Chromatographische Trennung

Die Chromatographie ist eine physikalisch-chemische Methode zur Trennung von Stoffen durch Adsorptions- und Verteilungsvorgänge zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Die in der Literatur am Häufigsten erwähnten Verfahren in der Rück-

1 Einleitung

standsanalytik sind Gas- und Flüssigchromatographie. Für thermolabile, schwer oder nicht flüchtige, polare und mittel- bis hochmolekulare Verbindungen ist die Flüssigchromatographie geeignet. Der chromatographische Trennvorgang erfolgt in Säulen mit Innendurchmessern von 2 - 4,6 mm, Längen von 50 - 250 mm und Korngrößen von 2 - 10 μm . Neben der Säulenlänge und dem -durchmesser haben Säulentemperatur, Flussrate und Material Einfluss auf die Kapazität und die Trennleistung. Je nach analytischer Fragestellung steht eine große Auswahl an Trennmaterialien zur Verfügung. Das gängigste Material sind sogenannte Umkehrphasen (*reversed phase* (RP)) mit Kettenlängen von C8 - C30.

1.3.4 Detektion

Im Bereich amtlicher Kontrollen können - entsprechend der Entscheidung [2002/657/EG](#) - mit der Flüssigchromatographie UV-, UV/VIS-, DA-, FL- und MS-Detektoren kombiniert werden. Colistin kann mittels massenspektrometrischer und - nach Derivatisierung - mittels Fluoreszenzdetektion erfasst werden.

1.3.4.1 Fluoreszenzdetektion

Colistin weist keine natürliche Fluoreszenz auf, die Fluoreszenzdetektion ist deshalb erst nach Derivatisierung möglich. In der Literatur werden bei der Fluoreszenz-Derivatisierungsmethode sowohl Vorsäulen- als auch Nachsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd (OPA) oder Dansylchlorid beschrieben ([DECOLIN U. A. \(1997\)](#); [MOROVJÁN U. A. \(1998\)](#); [CANCHO GRANDE U. A. \(2001\)](#); [GMUR U. A. \(2003\)](#); [SUHREN U. KNAPPSTEIN \(2005\)](#)).

Beim Nachsäulen-Modus findet die Derivatisierung nach der chromatographischen Trennung und vor der Detektion statt. Die chromatographischen Bedingungen unterscheiden sich erheblich für derivatisierte und nicht-derivatisierte Analyten. Das Derivatisierungsverfahren mit OPA beruht auf der Reaktion von OPA, 2-Mercaptoethanol und einem primären Amin im alkalischen Medium, wobei sich das fluoreszierende Isoindolderivat 1-Mercaptoethanol-2-alkylisoindol bildet.

Das Isoindolderivat ist bei Raumtemperatur instabil. Während die Instabilität bei der Nachsäulenderivatisierung keine Bedeutung hat, muss bei der Vorsäulenderivatisierung bei einem pH-Wert von sieben chromatographiert werden, um die Derivate bei der Trennung zu stabilisieren ([ROTH \(1971\)](#); [ENDO U. A. \(1997\)](#); [DECOLIN U. A. \(1997\)](#); [SUHREN U. KNAPPSTEIN \(2005\)](#)). Dadurch ist der pH-Wert für den Eluenten festgelegt

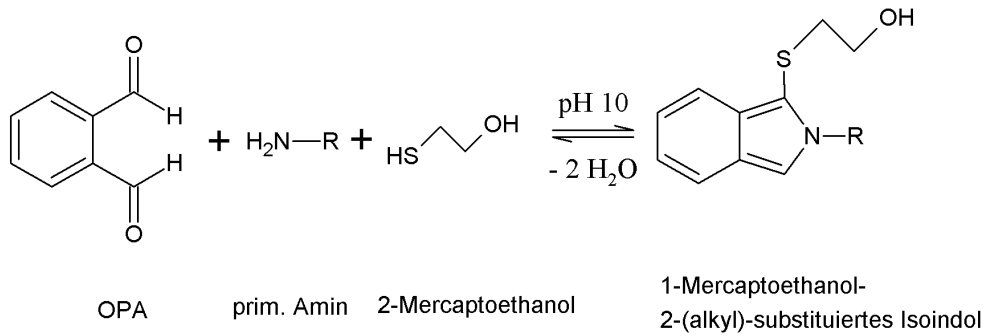


Abbildung 1.4: Derivatisierungsreaktion

und die Möglichkeit der Trennung von komplexen Substanzgemischen durch Variation des pH-Wertes eingeschränkt.

1.3.4.2 Massenspektrometrische Detektion

Colistin besitzt aufgrund der zahlreichen 2,4-Diaminobuttersäuren basische Eigenschaften, so dass sich, analog der bisher beschriebenen Literatur, das Elektrospray-Ionisationsverfahren (ESI) empfiehlt ([DECOLIN U. A. \(1997\)](#); [SIN U. A. \(2005\)](#)).

Beim ESI-Verfahren werden die in Lösung vorliegenden Ionen und Moleküle in die Gasphase überführt und damit einer massenspektrometrischen Detektion zugänglich gemacht. Üblicherweise erhält man Molekülionen ($[M + nH]^{n+}$ oder $[M - nH]^{n-}$), wobei Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 500 g/mol meist einfach geladen ($n=1$) und höhermolekulare Verbindungen vielfach geladen vorliegen ($n>1$). Die mehrfach geladenen höhermolekularen Verbindungen $[M + nH]^{n+}$ können aufgrund ihres Masse-Ladungsverhältnisses (m/z -Werte) mit dem üblichen Messbereich erfasst werden. Die Überführung von solvatisierten Ionen in die Gasphase ist ein endergonischer Prozess, der bei der ESI sehr schonend verläuft, da es bei der Gasphasenionen-Bildung in der Regel nicht zur Fragmentierung kommt ([KEBARLE U. TANG \(1993\)](#)).

Im Detail setzt sich die ESI aus der Dispersion der Probelösung in elektrisch geladene Tröpfchen, der Verkleinerung der geladenen Tröpfchen und der Bildung von desolvatisierten Gasphasenionen zusammen. Auf die Ionenausbeute beim ESI-Verfahren nehmen Analytstruktur, Fließmittelzusammensetzung sowie Konzentration von Analyt und ko-eluierenden Matrixbestandteilen Einfluss ([KEBARLE U. TANG \(1993\)](#)).

2 Problemstellung

Der Einsatz von Antibiotika im Veterinärbereich ist in der Europäischen Gemeinschaft umfassend reglementiert. Durch die Arzneimittelbehandlung von lebensmittelliefernden Tieren kann es zu Rückständen in Lebensmitteln von diesen Tieren kommen. Die Verordnung (EWG) 2377/90 legt für Colistin für alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten Rückstandshöchstmengen fest. Zur Gewährleistung der amtlichen Kontrollen müssen entsprechende Analysemethoden zur Verfügung stehen, die den Anforderungen der Entscheidung 2002/657/EG genügen.

Zur Bestimmung und Quantifizierung des Polypeptid-Antibiotikums Colistin in tierischer Matrix existieren bislang keine Analysemethoden, die diesen EG-Anforderungen entsprechen und die mittels HPLC zertifiziertem Referenzstandard durchgeführt wurden. Mit dieser Arbeit soll die analytische Lücke im Nationalen Rückstandskontrollplan geschlossen werden. Dazu wird neben der Entwicklung, Einführung und Optimierung einer Analysemethode zur Bestimmung von Colistin in Milch, die Methodvalidierung entsprechend der Entscheidung 2002/657/EG nach dem alternativen Modell durchgeführt. In diesem Rahmen sind für die Bestätigungsmethode u.a. die obligatorischen Leistungskriterien wie Entscheidungsgrenze ($CC\alpha$) und Nachweisvermögen ($CC\beta$) sowie Stabilität des Analyten zu bestimmen.

Eine besondere Herausforderung stellt die Quantifizierung mit dem zertifizierten Referenzstandard für die HPLC dar. Bisher erhältliche mikrobiologische Standards enthalten keine Angaben über die quantitative Zusammensetzung und weisen unterschiedliche Verhältnisse und Anteile der beiden Hauptkomponenten Colistin A und Colistin B auf. Zudem finden sich in der Verordnung (EWG) 2377/90 keine weiteren Angaben über einen möglichen Marker, so dass zur Quantifizierung die Summe der Anteile von Colistin A und Colistin B sowie deren Verhältnis zueinander im CR-Standard als Grundlage herangezogen wird.

In der vorliegenden Arbeit soll Colistin zunächst mittels der LC getrennt und anschließender Nachsäulenderivatisierung mit OPA detektiert werden. Zur optimalen Trennung und damit zur Erhöhung der Selektivität und Auflösung wird neueres Säulenmaterial

2 Problemstellung

unterschiedlicher Phasen eingesetzt, Fließmittelgeschwindigkeiten und verschiedene Derivatisierungsbedingungen wie Reaktionstemperatur, Reagenzien-Flussrate, unterschiedliche Thiole, ebenso Konzentrationen der Derivatisierungsprodukte werden geprüft. Zur Absicherung schließt sich die Untersuchung des Extraktes mittels Massenspektrometrie unter gleichen LC-Bedingungen an.

Mit der Einführung einer LC-Methode mit Fluoreszenzdetektion kann vor allem der Stabilitätstest durchgeführt werden. Da die chromatographischen Bedingungen für die LC-MS/MS-Bestimmung übertragen werden sollen, kommt die Nachsäulenderivatisierung in Betracht. Die Detektion mittels Fluoreszenz soll in Matrix den ersten Nachweis auf dieses Peptid-Antibiotikum liefern und im zweiten Schritt dann mittels MS/MS-Detektion bestätigt werden. Diese Vorgehensweise ist möglich, weil mit der Fluoreszenzdetektion ein Identifizierungspunkt gemäß der Entscheidung [2002/657/EG](#) erbracht wird. Außerdem sollte aus Gründen der Wirtschaftlichkeit nur eine Probenaufarbeitung durchgeführt und der Extrakt beiden chromatographischen Bestimmungen zugeführt werden.

Bislang wurde Milch vereinzelt auf Colistin hin untersucht. Alle in der Literatur beschriebenen Methoden arbeiten mit einem mikrobiologischen Standard, der die Quantifizierung bei chromatographischen Methoden enorm erschwert, wenn nicht sogar unmöglich gestaltet. [DECOLIN ET AL.](#) entwickelten eine LC-Methode mittels Fluoreszenzdetektion mit Vorsäulenderivatisierung, [HAMMER](#) untersuchte Rohmilch mittels ELISA als Screening-Methode, [NOUWS ET AL.](#) erarbeiteten eine mikrobiologische Methode, [SUHREN U. KNAPPSTEIN](#) untersuchten Milch mittels LC-Fluoreszenzdetektion mit Vorsäulenderivatisierung sowie ELISA und [SIN U. A.](#) veröffentlichten 2005 erstmals eine LC-MS/MS Methode zur Bestimmung von Colistin in Milch basierend auf einem mikrobiologischen Standard ([DECOLIN U. A. \(1997\)](#); [HAMMER \(1998\)](#); [NOUWS U. A. \(1999\)](#); [SIN U. A. \(2005\)](#); [SUHREN U. KNAPPSTEIN \(2005\)](#)).

Die Analytik von Proteinen und Peptiden ist mit vielfältigen Problemen verbunden, weil sie unterschiedliche und vielfältige Wechselwirkungen eingehen können. Beim Polypeptid Colistin kommt ergänzend die mehrkomponentige Zusammensetzung mit nahezu gleicher Struktur hinzu. Weiterhin ist zu bedenken, dass mit der hochselektiven MS/MS-Detektion Verbindungen selbst in Anwesenheit von Matrixkoextrakten gemessen werden können, aber störende Interferenzen, die die Ionisation der Verbindungen und damit die Quantifizierung stark beeinflussen können, nicht auszuschließen sind. Infolge dessen kommt der chromatographischen Trennung der Komponenten in eiweißreicher Matrix, gerade im Hinblick auf eine Quantifizierung, eine hohe Bedeutung zu.

3 Ergebnisse

3.1 Colistin-Standards

Als Basis dieser Arbeit dienten zur Entwicklung und Optimierung der Untersuchungsmethode einerseits ein mikrobiologischer Standard von *Sigma-Aldrich* als Arbeitsstandard mit Angaben in IU-Einheiten, andererseits der HPLC zertifizierte Referenzstandard (CR-Standard, CRS) mit Angaben über die prozentualen Anteile von fünf Komponenten. Die Dotierung der Milchproben zur Validierung erfolgte mit dem CR-Standard, da zertifiziertes Referenzmaterial nicht erhältlich war.

Im Veterinärbereich ist ausschließlich Colistinsulfat als Wirkstoff zugelassen. Colistinsulfat enthält pro Mol im Mittel 1,95 Mol Sulfat-Ionen ($= 187,4 \text{ g SO}_4^{2-}/\text{Mol}$) (Abschnitt 1.2.1). Daraus ergibt sich für den CR-Standard ein rechnerischer Korrekturfaktor von 0,86. Die Faktoren 0,5823 und 0,4177 leiten sich aus den jeweiligen Anteilen der Colistin-Komponenten mit $M_r = 1170 \text{ g/mol}$ und $M_r = 1155 \text{ g/mol}$ im CR-Standard ab.

$$f = \frac{(1170 * 0,5823) + (1155 * 0,4177)}{(1170 * 0,5823) + (1155 * 0,4177) + 187,4} = 0,86$$

Abbildung 3.1: Korrekturfaktor für die quantitative Bestimmung von Colistin aus Colistinsulfat

Das Verfahren für die Festsetzung der Rückstandshöchstmengen basiert auf der Grundlage von Colistinsulfat-Standards. Eine Korrektur unter Berücksichtigung des Sulfatgehaltes wurde dabei nicht durchgeführt, so dass in der vorliegenden Arbeit ebenfalls kein Korrekturfaktor angewandt wurde. Für die Quantifizierung mussten die prozentualen Anteile von Colistin A und Colistin B im CR-Standard berücksichtigt werden. Deren Anteil beträgt 77,9% im Gesamt-Colistin, woraus sich ein MRL-Wert für Milch von $39 \mu\text{g/kg}$ ($0,779 * 50 \mu\text{g/kg}$) für die Summe aus Colistin A und Colistin B ableiten lässt. Dieser Wert entspricht dem MRL-Wert von $50 \mu\text{g/kg}$ Gesamt-Colistin in Milch.

3.2 Entwicklung einer Methode zur LC-Trennung und Fluoreszenzdetektion von Colistin

DECOLIN U. A. (1997) beschrieben ein LC-Verfahren an einer RP-18-Phase mittels Vorsäulenderivatisierung mit OPA und Fluoreszenzdetektion bei 35 °C zur Bestimmung von Colistin in bovinem Gewebe. Durch die Anteile an dem Ionenpaarreagenz Triethylamin (TEA) und der Phosphorsäure im Fließmittel am Säulenausgang bzw. Detektoreingang war eine direkte Kopplung der LC an ein Massenspektrometer nicht möglich. Ein Auskristallisieren insbesondere der Phosphorsäure an der Kapillare würde diese verstopfen und der erhöhte Ionenanteil den Ionisierungsprozess von Colistin negativ beeinflussen. Das basische Ionenpaarreagenz TEA mit Zusatz von Phosphorsäure war durch ein saures Reagenz wie z.B. Trifluoressigsäure (TFA) zur Reduzierung der Ionenanteile im Fließmittel zu ersetzen. Zur Etablierung einer LC-Methode, bei der die Probenaufarbeitung und LC-Trennung unabhängig von dem verwendeten Detektionsverfahren angewandt werden konnten, wurde für die Fluoreszenzdetektion die *online* Nachsäulenderivatisierung gewählt.

Zunächst wurde das von DECOLIN U. A. (1997) verwendete isokratische Fließmittel und eine RP-C18 Phase eingesetzt, um festzustellen, ob eine Übertragung auf die LC-Anlage möglich war. Als Derivatisierungsreagenz diente OPA, das zur Analyse von primären Aminen (ROTH (1971)) verwendet und im SVUA-Krefeld zur Bestimmung von Histamin eingesetzt wird. Eine Trennung der Colistin-Hauptkomponenten konnte unter den Bedingungen erreicht werden (Abbildung 3.2). Allerdings war sie zum einen nicht sensitiv und selektiv genug, um Rückstände von Colistin nachzuweisen, zum anderen sollte ein ionenärmeres Fließmittel gefunden werden. In der Peptid- und Proteinanalytik werden verstärkt - in Verbindung mit der Elektrospray-Ionisierung - Acetonitril (ACN) und TFA, Ammoniumformiat (NH₄FO) oder Ammoniumacetat (NH₄Ac) als Fließmittel eingesetzt. Die Ammoniumsalze scheiden bei der Nachsäulenderivatisierung mit OPA aus. Der Versuch das Ionenpaarreagenz TEA und die Phosphorsäure durch das - auch für die Massenspektrometrie geeignete - TFA zu ersetzen, war viel versprechend. Nach Optimierung und Anpassung der Extinktions- und Emissionswellenlänge an das neue Fließmittel konnten, unter nahezu gleichen Bedingungen, TEA und Phosphorsäure durch TFA ersetzt werden (Abbildung 3.3). Es zeigte sich, dass die Sensitivität gesteigert werden konnte, die Trennung (Selektivität) der einzelnen Hauptkomponenten aber noch nicht zufrieden stellend war. Zur Erhöhung der Selektivität zeigten erste Ergebnisse mit der Gradientenelution einen entwicklungsfähigen Ansatz (Abbildung 3.4).

3.2 Entwicklung einer Methode zur LC-Trennung und FL-Detektion

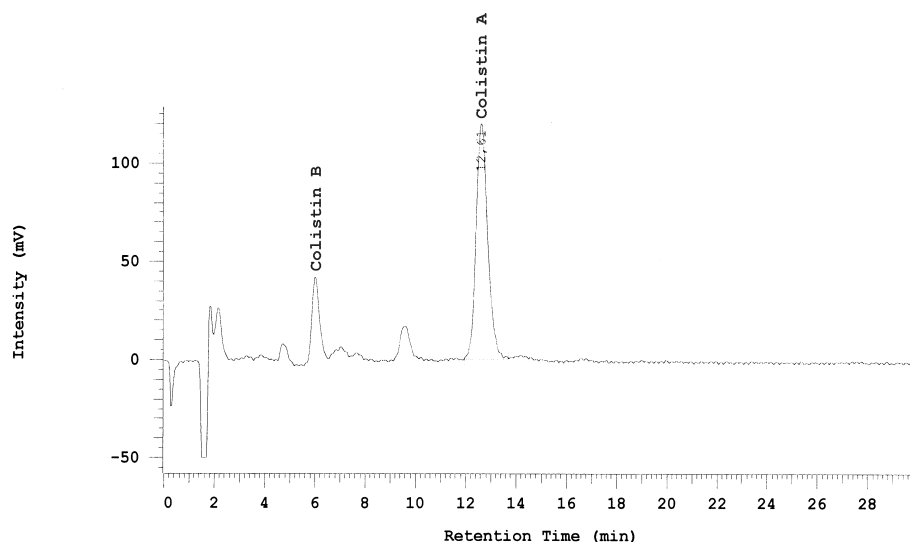


Abbildung 3.2: LC-Fluoreszenz-Chromatogramm eines Colistin-Standards (500 ng on column)

Trennsäule *Merck* "LichroCART Superspher 100", Säulentemperatur 35 °C, Flussrate von 0,2 mL/min, isokratisch, Fließmittel 1 (ACN und 0,035 M TEA-Lösung (18,5/81,5; v/v) mit Phosphorsäure auf pH = 2,5 eingestellt), $\lambda_{\text{excit}} = 305$ nm und $\lambda_{\text{emiss}} = 375$ nm

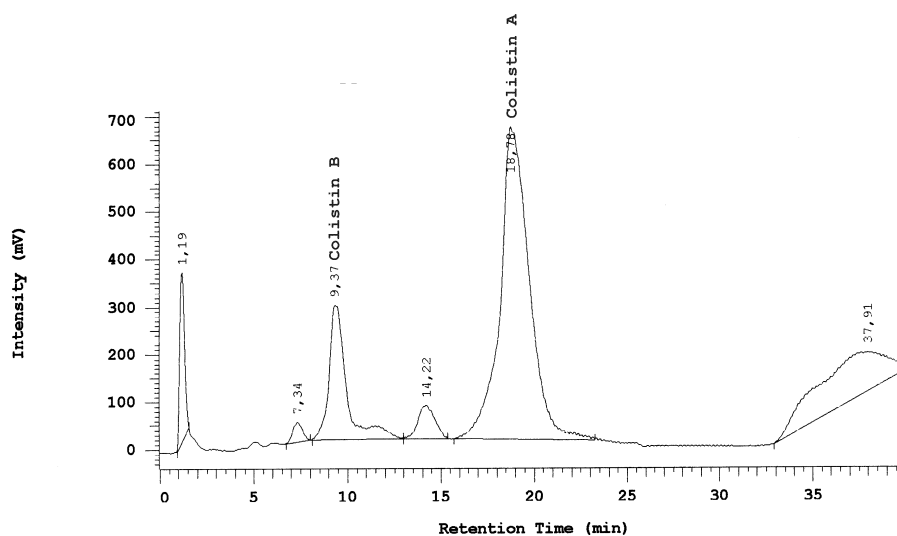


Abbildung 3.3: LC-Fluoreszenz-Chromatogramm eines Colistin-Standards (100 ng on column)

Trennsäule *Merck* „LichroCART Superspher 100“, Säulentemperatur 35 °C, Flussrate von 0,3 mL/min, isokratisch, Fließmittel 2 (ACN und 0,01 M wässrige TFA-Lösung (2/8; v/v) pH = 2,1), $\lambda_{\text{excit}} = 330$ nm und $\lambda_{\text{emiss}} = 465$ nm

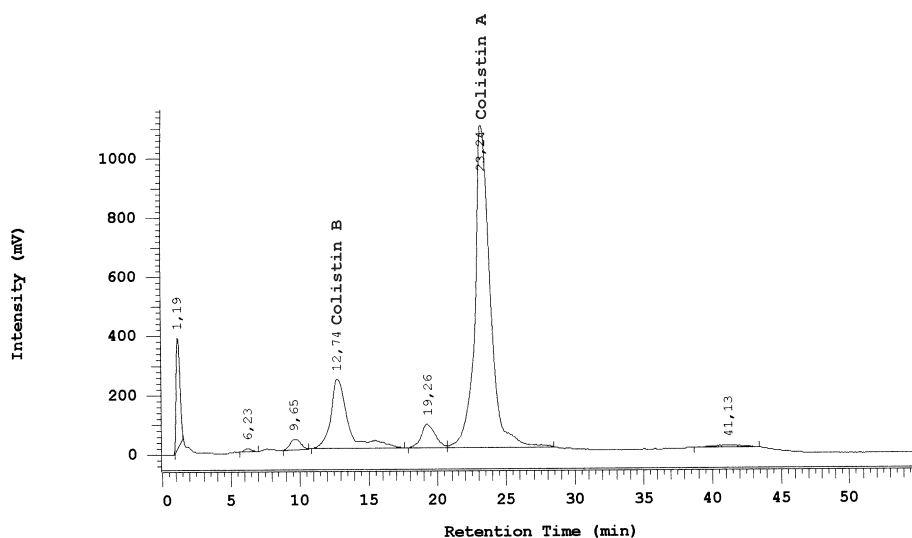


Abbildung 3.4: LC-Fluoreszenz-Chromatogramm eines Colistin-Standards (100 ng on column)

Trennsäule *Merck* „LichroCART Superspher 100“, Säulentemperatur 35 °C, Flussrate von 0,3 mL/min, Fließmittel 3 (Fließmittel A: ACN/Fließmittel B: TFA/H₂O (1,0/1000; *v/v*) (pH = 2,1)), Gradient 1 (Tabelle 5.7), $\lambda_{\text{excit}} = 330 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{emiss}} = 465 \text{ nm}$

Die Colistin-Komponenten unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung in einer Aminosäure und einem Fettsäurerest. Bei den Aminosäuren handelt es sich um die beiden natürlich vorkommenden Isomere Leucin und Isoleucin. Infolge dessen kam der chromatographischen Trennung der Komponenten, gerade im Hinblick auf eine Quantifizierung, eine hohe Bedeutung zu. Zur optimalen Trennung und damit zur Erhöhung der Selektivität und Auflösung wurde neueres Säulenmaterial unterschiedlicher Phasen eingesetzt. Die Trennsäulen wurden mit verschiedenen Gradienten und isokratischen Bedingungen und mittels Fluoreszenzdetektion getestet (Tabelle 5.8, Abschnitt 5.2.1.3).

Von den getesteten Phasenmaterialien kristallisierte sich die C12-Phase als die für die Fragestellung geeignete heraus; die chromatographische Trennung erfolgt im Idealfall mittels Gradientenelution bei einer Flussrate von 0,15 mL/min. Ein weiterer Grund, die Gradiententrennung anzuwenden, ergab sich aus der Problematik, die Colistin-Komponenten in einer eiweißreichen Matrix zu bestimmen. Neben der Festlegung der mobilen und stationären Phase war festzustellen, dass das Derivatisierungsreagenz keine lange Äquilibrierzeit benötigte, wenn für kurze Zeit Argon durch das frisch hergestellte Reagenz geleitet wurde. Der Einfluss der Konzentrationen der an der Derivatisierungsreaktion beteiligten Edukte und der Reaktionstemperatur wurde ermittelt. Ergebnis der Untersuchungen war, dass durch Erhöhung der 2-Mercaptoethanol-Konzentration um

75 % eine Empfindlichkeitserhöhung um 13 % erzielt werden konnte. Ein Ersatz von 2-Mercaptoethanol durch Ethanthiol führte zu einer Abnahme der Empfindlichkeit. Steigerungen der OPA-Konzentration und die schrittweise Erhöhung der Reaktionstemperatur oder Änderungen der Flussrate des Derivatisierungsreagenzes führten zu keiner weiteren Empfindlichkeitssteigerung. Mit der Erhöhung der Reaktions- bzw. Säulentemperatur war eine Verschlechterung der Auflösung verbunden, die wiederum eine Gradientenoptimierung zur Folge gehabt hätte.

Die optimalen Bedingungen zur Bestimmung von Colistin mittels LC-Fluoreszenzdetektion mit Nachsäulenderivatisierung sind in der Tabelle 5.6 zusammengefasst.

Verschiedene Colistinsulfat-Standards unterschiedlicher Anbieter wurden unter diesen Bedingungen chromatographisch getrennt (Abbildung 3.5). Die Verhältnisse der Hauptkomponenten Colistin A und Colistin B zueinander bewegten sich zwischen 0,8 bis 5,1 (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Colistinsulfat-Standards unterschiedlicher Lieferanten

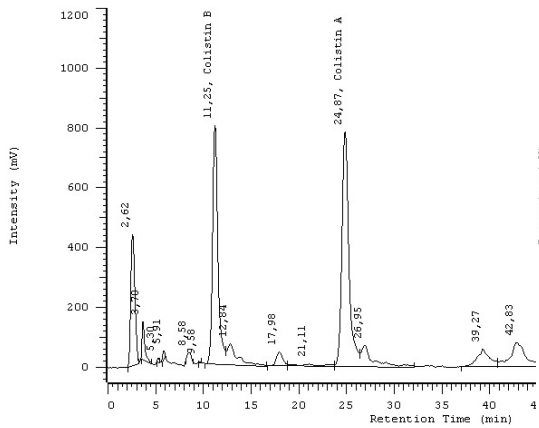
Colistinsulfat	Verhältnis [Area] Colistin A/Colistin B
CR-Standard	1,31 ¹
<i>Sigma</i> -Standard	4,7 ± 6 % ²
<i>Dr. Ehrendorfer</i>	5,1 ± 4 % ²
<i>Alpharma</i>	4,7 ± 6 % ²
Anonym 1	1,4 ± 2 % ²
Anonym 2	0,8 ± 2 % ²

Eine Kalibrationsgerade wurde mit dem CR-Standard in Konzentrationen vom 0,5-, 1-, 1,5-, 2- und 5-fachen des zulässigen Grenzwertes aufgenommen. Der Arbeitsbereich lag damit zwischen 1,25 ng bis 12,5 ng Colistin und wurde mit dreimaliger Serienmessung geprüft, ein linearer Zusammenhang unter Berücksichtigung des Wertes Null zwischen Analytkonzentration und Signalfläche wird durch das Bestimmtheitsmaß von > 0,99 bestätigt.

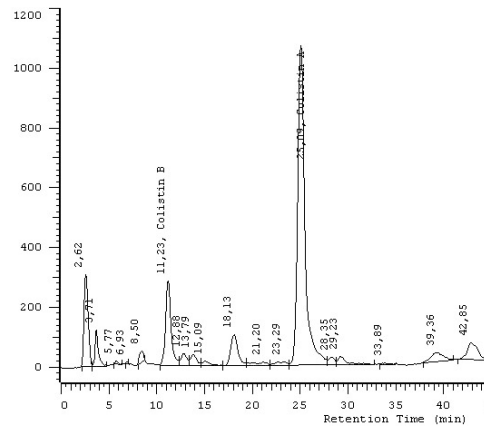
¹rechnerisch ermittelt nach European Pharmacopoeia; andere Verhältnisse wurden experimentell bestimmt

²*Sigma*: n=10; *Dr. Ehrendorfer*: n=3; *Alpharma*: n=8; Anonym 1&2: n=7

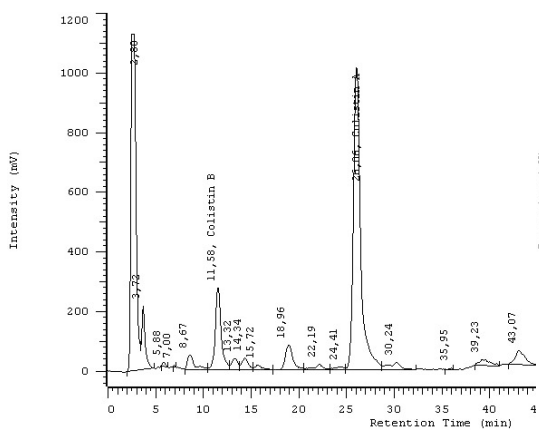
3 Ergebnisse



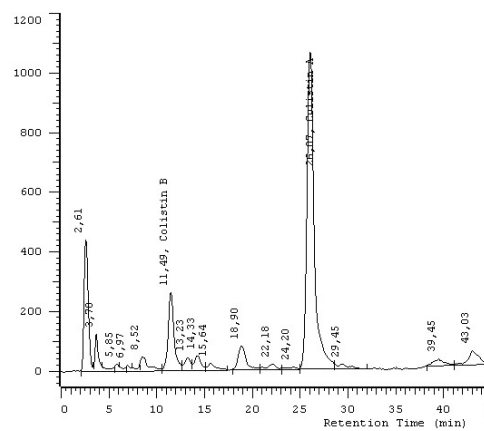
(a) CR-Standard



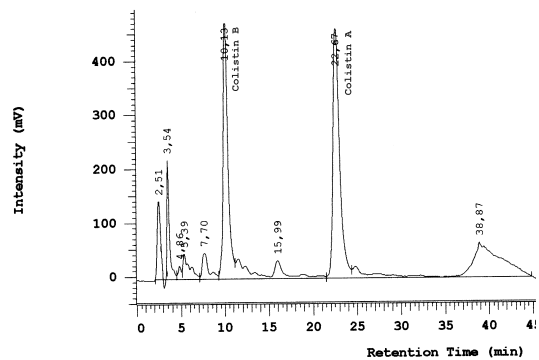
(b) Sigma



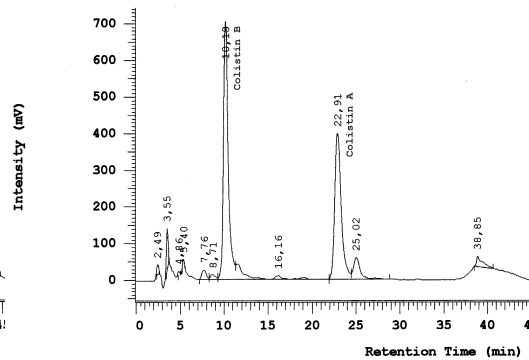
(c) Alpharma



(d) Dr. Ehrendorfer



(e) Anonym 1



(f) Anonym 2

Abbildung 3.5: LC-Fluoreszenz-Chromatogramme von Colistin-Standards (20 ng on column)

Trennsäule *phenomenex* „Jupiter Proteo C12“ (150 x 2,0 mm, 4 μ m), Säulentemperatur 35 °C, Flussrate von 0,15 mL/min, Fließmittel 8 (Fließmittel A: TFA/ACN (1,0/1000; v/v) (pH = 1,6)/Fließmittel B: TFA/H₂O (1,0/1000; v/v) (pH = 2,1)), Gradient 4 (Tabelle 5.7), $\lambda_{\text{excit}} = 330$ nm und $\lambda_{\text{emiss}} = 430$ nm

Tabelle 3.2: Kalibrierung von Colistin über den Arbeitsbereich von 1,25 – 12,5 ng nach Bestimmung mittels LC-Fluoreszenzdetektion

Analyt	a ³ [Area]	b ³ [Area/ μ g/L]	s _y ³ [Area]	r ²	s _{x0} ³ [μ g/L]	V _{x0} ³ [%]	cnf (a) ³ [Area]
Colistin A	-579192,38	116579,14	406466,08	0,9916	3,49	9,46	\pm 290920,73
Colistin B	-328472,08	117352,15	255139,50	0,9944	2,17	7,74	\pm 182551,24

Methode: C-12 Säule mit entsprechender Vorsäule als stationäre Phase

Fließmittel A: TFA/ACN (1,0/1000; v/v)

Fließmittel B: TFA/H₂O (1,0/1000; v/v)

Gradient 4 (Tabelle 5.7) und Derivatisierungsreagenz Nr. 4 (Tabelle 5.4)

Fluss von 0,5 mL/min (Tabelle 5.6)

Gesamtzahl der Kalibriermessungen: n = 15

Die Präzision unter Wiederholbedingungen charakterisiert die Eignung des Analyseverfahrens. Zur Ermittlung der Wiederholpräzision wurden nach der oben beschriebenen Methode zehn Einzelmessungen einer CR-Standardlösung in 0,01M Salzsäure (HCl) mit einer Konzentration von 2,5 ng Colistin pro 50 μ L durchgeführt. Der Variationskoeffizient ist die relative Standardabweichung einer Serie und entspricht dem Quotient aus der Standardabweichung und dem Mittelwert. Der Variationskoeffizient bei dieser LC-Fluoreszenzmethode lag für Colistin A und Colistin B auf nahezu gleichem Niveau von 6 bzw. 7 % (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Wiederholpräzision bei der Bestimmung von Colistin mit LC-Fluoreszenzdetektion

Analyt	Injektion [μ L]	abs. Konzentration [ng]	Mittelwert [Area]	Standardab- weichung [Area]	RSD ⁴ [%]
Colistin A	50	1,05	1779302	123325	6,9
Colistin B	50	0,84	1422084	84772	5,9

³Abk.: a, Achsenabschnitt; b, Steigung der Geraden; s_y, Reststandardabweichung; r², Bestimmtheitsmaß; s_{x0}, Verfahrensstandardabweichung; V_{x0}, Verfahrensvariationskoeffizient; cnf (a), Vertrauensbereich des Achsenabschnittes; Signifikanzniveau P = 95 % und Freiheitsgrad f = n-2

⁴RSD: relative Standardabweichung bzw. Variationskoeffizient

3 Ergebnisse

Obwohl nach der EU-Entscheidung [2002/657/EG](#) die Angabe von Nachweis- und Bestimmungsgrenze (NG, BG) nicht mehr erforderlich ist, wurden sie für die Methode der LC-Fluoreszenzdetektion noch ermittelt, da sie Aussagen über das Verfahren und somit wertvolle Hinweise für die Leistung der Methode lieferten, insbesondere für die Probenaufarbeitung.

Als Nachweisgrenze diente in der vorliegenden Arbeit ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 und als Bestimmungsgrenze ein Signal-Rausch-Verhältnis von 6:1 (NG: S/N = 3/1; BG: S/N = 6/1). Ergebnisse waren eine NG von 12 $\mu\text{g/L}$ und eine BG von 20 $\mu\text{g/L}$ für Colistin A. Für Colistin B ergaben sich eine NG von 7 $\mu\text{g/L}$ und eine BG von 12 $\mu\text{g/L}$ (Tabelle 3.4). Die Rückstandshöchstmenge für Colistin in Milch liegt bei 50 $\mu\text{g/kg}$ (\equiv 50 $\mu\text{g/L}$), was einem Wert von 39 $\mu\text{g/L}$ Summe Colistin A + Colistin B entspricht. Damit lag der Wert für die Colistin A-Rückstandshöchstmenge bei 22,1 $\mu\text{g/L}$ und der für Colistin B bei 16,9 $\mu\text{g/L}$. Der Vergleich dieser beiden Werte zeigte, dass das Verfahren zwar für eine Standardlösung geeignet ist, aber bereits an seine Leistungsgrenzen stößt.

Tabelle 3.4: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Colistin A und Colistin B im Vergleich zum MRL-Wert

	Colistin	
	A	B
NG [$\mu\text{g/L}$]	12	7
BG [$\mu\text{g/L}$]	20	12
MRL [$\mu\text{g/L}$]	22	17

Mit der erarbeiteten Methode können die Hauptkomponenten der beiden Polypeptid-Antibiotika Colistin und Polymyxin B chromatographisch getrennt werden. Es war zu beobachten, dass Colistin A bei höherer Konzentration von einer Komponente des Polymyxin B (B2 oder B3) überlagert wird. Im Konzentrationsbereich der Rückstandshöchstmenge ist eine zweifelsfreie Zuordnung bei Standardlösungen möglich.

3.2 Entwicklung einer Methode zur LC-Trennung und FL-Detektion

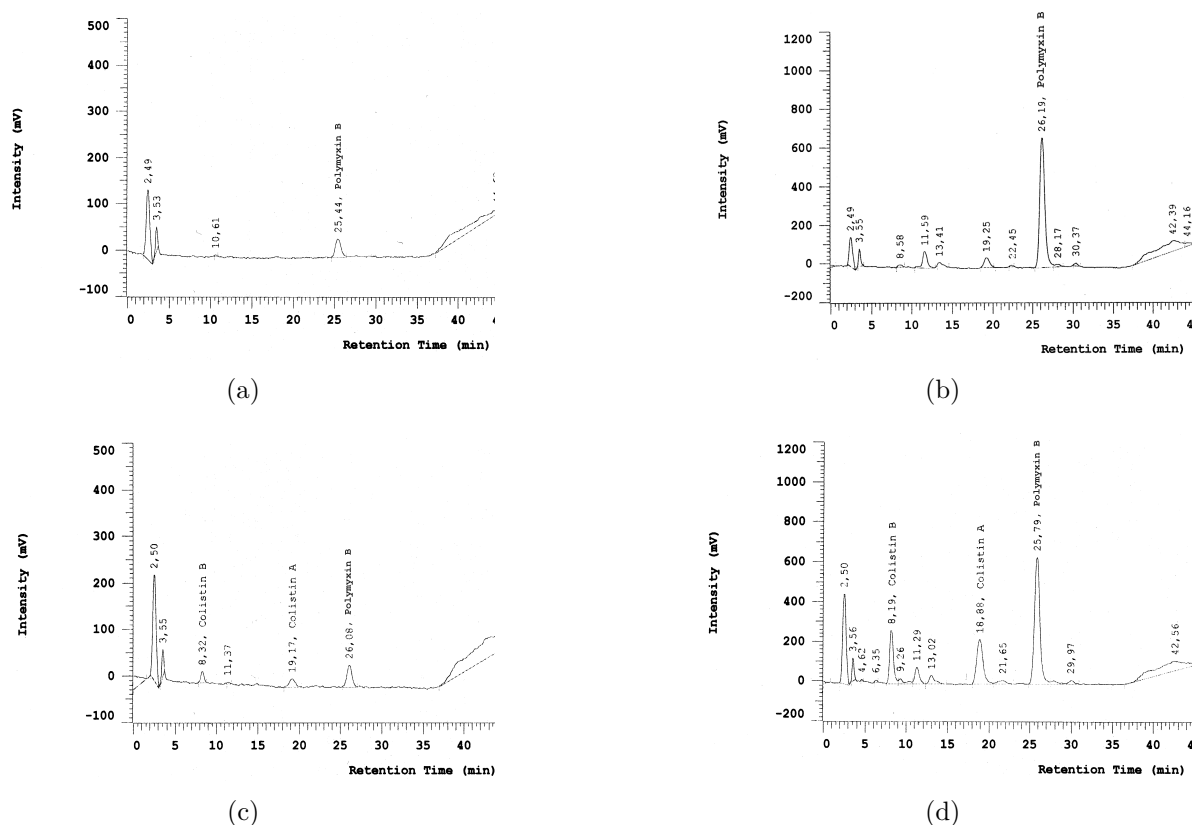


Abbildung 3.6: LC-Fluoreszenz-Chromatogramme von Colistin- und Polymyxin B-Standards unterschiedlicher Konzentration

Injektionsvolumen 20 μ L, Trennsäule „Jupiter Proteo C12“ (150 x 2,0 mm, 4 μ m), Säulentemperatur 35 °C, Flussrate von 0,15 mL/min, Fließmittel 8 (Fließmittel A: TFA/ACN (1,0/1000; v/v) (pH = 1,6)/Fließmittel B: TFA/H₂O (1,0/1000; v/v) (pH = 2,1)), Gradient 4 (Tabelle 5.7), $\lambda_{\text{excit}} = 330$ nm und $\lambda_{\text{emiss}} = 430$ nm

- a: Polymyxin B CR-Standard (c=0,05 mg/L)
- b: Polymyxin B CR-Standard (c=0,5 mg/L)
- c: Colistin und Polymyxin B CR-Mischstandard (c=0,05 mg/L)
- d: Colistin und Polymyxin B CR-Mischstandard (c= 0,5 mg/L)

3.2.1 Anwendbarkeit der Methode

Die entwickelte und hier dargelegte Methode ermöglicht die parallele Bestimmung von Colistin A und Colistin B sowie Polymyxin B und wurde im Rahmen des Stabilitätstests eingesetzt (Abschnitte 3.5.1 und 5.4.1). Die erzielten Bestimmungsgrenzen von Colistin A und Colistin B lagen im Konzentrationsbereich der MRL-Werte.

3.3 Entwicklung einer Methode zur LC-Trennung und massenspektrometrischer Detektion von Colistin

Im ersten Schritt erfolgte bei der Entwicklung der massenspektrometrischen Detektionsmethode die Bestimmung der m/z -Verhältnisse der Colistin-Hauptkomponenten. Anschließend wurden die selektierten Gasphasenionen durch eine Kollisionszelle - dem zweiten Quadrupol - geleitet. Hier wurden nach Kollision mit einem Gas (Argon) Massenfragmentationen erzeugt, die als substanzcharakteristische Fragmente zur Diagnose dienen sollten und im dritten Quadrupol analysiert wurden.

3.3.1 Massenspektrometrische Detektion (*Varian*)

Die Bestimmung der Molekülmassen-Ionen erfolgte über die Direktinjektion von Colistin-Lösungen mit der Spritzenpumpe in die Ionenquelle. Die Colistin-Standardlösungen ($c = 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$) wurden dabei aus einer Stammlösung (1 g/L in $0,01\text{M HCl}$) in für die Massenspektrometrie üblichen Lösungsmittel ACN/ H_2O ($2/8; v/v$) bzw. MeOH/ H_2O ($2/8; v/v$) hergestellt. Unter den in Tabelle 5.9 aufgeführten Bedingungen waren im Lösungsmittel ACN/ H_2O ($2/8; v/v$) kontinuierlich die $[M + 3H]^{3+}$ Molekülionen (m/z 391 bzw. m/z 386) die intensivsten Ionen und im Lösungsmittel MeOH/ H_2O ($2/8; v/v$) sowohl $[M + 3H]^{3+}$ als auch $[M + 2H]^{2+}$ Molekülionen die intensivsten.

Tabelle 3.5: m/z -Ionen von Colistin

Colistin-Komponente	$[M + H]^+$	$[M + 2H]^{2+}$	$[M + 3H]^{3+}$
Colistin A	1170	586	391
Colistin B	1156	579	386

Im nächsten Schritt sollten die Ergebnisse der Direktinjektion durch Injektionen über eine Probenschleife und mit einem Fließmittel (Einleitung über Spritzenpumpe) überprüft und durch Variation der Fließ- und Verdünnungs-Lösungsmittel bestätigt bzw. die Ionenausbeute und die Kontinuität der Ionenbildung verbessert werden (Tabelle 5.10, Abbildung 3.7). Die Ionisationsparameter für ESI-Quelle und Quadrupole wurden mittels automatischer Parametereinstellung (*AutoTune*) auf maximale Empfindlichkeit eingestellt. Eine manuelle Optimierung der Systemparameter (Spannungen der Quadrupole,

3.3 Entwicklung einer Methode zur LC-Trennung und MS-Detektion

der Needle und des Multipliers) und auch die Variation der *spray-needle* brachten keine Verbesserung hinsichtlich Ionenausbeute oder Kontinuität der Ionenbildung, so dass mit den automatischen Einstellungen des *AutoTune* weiter gearbeitet wurde.

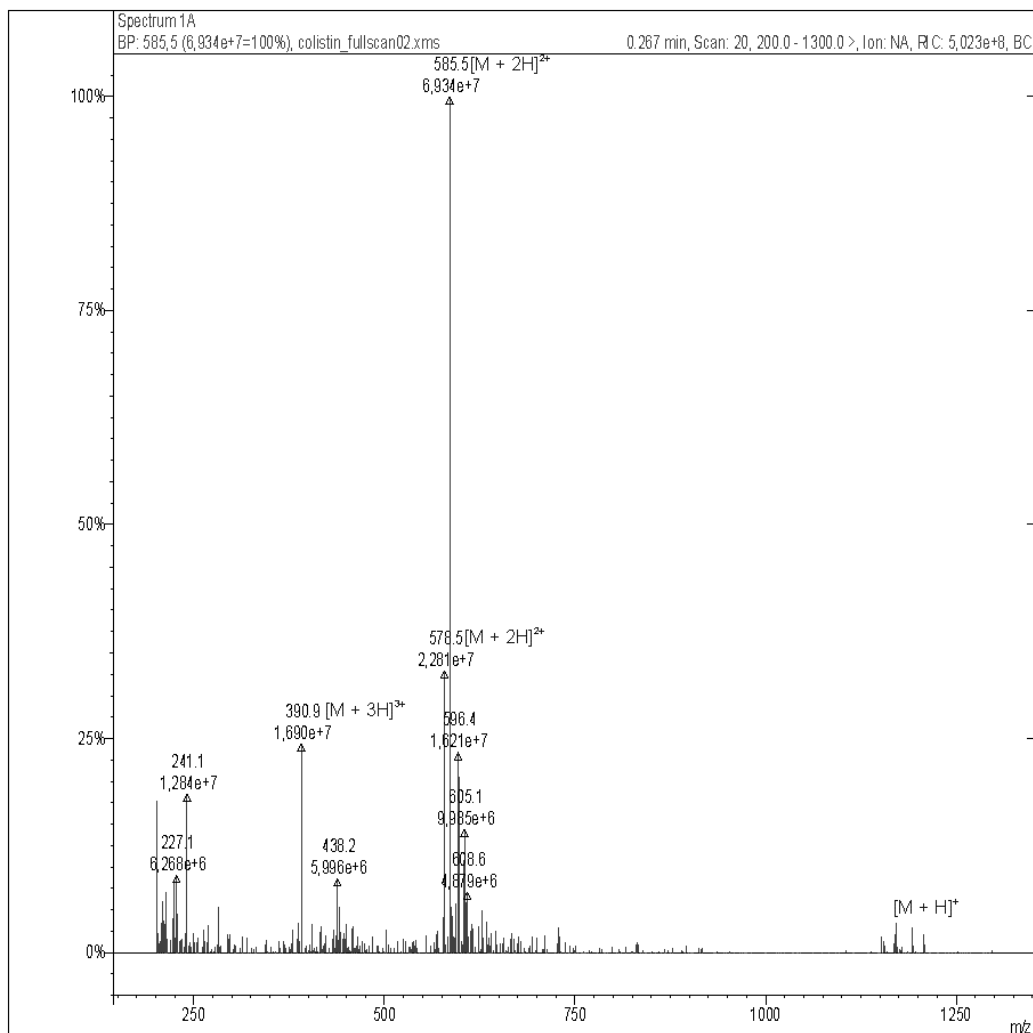


Abbildung 3.7: Massenspektrum eines Colistin-Standards in ACN/H₂O (2/8; v/v); manuelle Injektion

Varian-Massenspektrometer

Scan-Bereich: m/z 200,0 – m/z 1300,0;

Manuelle Injektion über Spritzenpumpe

Fließmittel: 0,5 mM NH₄Ac in 0,25 % HFO/ACN (8/2; v/v)

Flussrate: 50 μ L/min

Konzentration der Colistin-Standardlösung: $c = 10$ ng/ μ L

Die *drying-gas*-Temperatur wurde bei weiteren Experimenten mittels Direktinjektionen von 200 °C in 50 °C-Schritten bis 350 °C erhöht. Die größte Ionenausbeute war bei

einer *drying-gas*-Temperatur von 300 °C zu messen.

Tabelle 3.6: Ergebnisse der unterschiedlichen *drying-gas* Temperaturen

<i>drying-gas</i> -Temperatur [°C] ⁵	Peak-Intensität
200	<i>m/z</i> 586: 1,0e +7
250	<i>m/z</i> 586: 1,3e +7
300	<i>m/z</i> 586: 3,2e +7
350	<i>m/z</i> 586: 2,4e +7

Die unterschiedlichen Säuren und Lösungsmittel haben Einfluss auf die Ionisation und auch das Fragmentierungsverhalten. Während zunächst die Molekülionen *m/z* 391 und *m/z* 386 als intensivste Ionen bestätigt wurden, konnten Wiederholungen dieses Ergebnis aber nicht festigen. Unter gleichen Bedingungen waren nunmehr die Molekülionen mit *m/z* 579 und *m/z* 586 die intensivsten Ionen. Außerdem traten durch das bei der Elektrospray-Ionisation anliegende Potential bereits Fragmentierungen bei der Molekülmassen-Bestimmung auf, so dass neben den einfach und mehrfach geladenen Molekülionen bereits Fragmentionen im MS-Spektrum detektiert wurden. Diese Fragmentierung in der Quelle trat bei Colistin unregelmäßig und unter nicht standardisierbaren Bedingungen auf. Es wurden beispielsweise Ionen wie *m/z* 227; *m/z* 241; *m/z* 438 und auch *m/z* 101; *m/z* 202; *m/z* 221; *m/z* 441 beobachtet, deren Auftreten nicht reproduzierbar war. Letztlich resultierte aus den Lösungsmittel-Versuchen, dass für die Ionenbildung Ammoniumacetat-Zusätze konstante und intensive Molekülionen von *m/z* 586 bzw. *m/z* 579 lieferten.

Die Erhöhung der *drying-gas*-Temperatur auf 300 °C trug ebenfalls zur Kontinuität der Molekülionen bei. Die Massenspektren im Positiv-Ionen-Modus dienten anschließend dazu, geeignete Bedingungen für die empfindliche und selektive MS/MS-Detektion zu ermitteln. Bei Triple-Quadrupol-Massenspektrometern gewinnt man durch die Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Methode an Empfindlichkeit. Dabei wird im ersten Quadrupol ein festgelegtes Vorläufer-Ion herausgefiltert und in der Kollisionszelle fragmentiert. Im dritten Quadrupol werden dann nur einzelne diagnostische Fragmentationen durchgelassen. Für die MS/MS-Experimente wurde zur Ermittlung des Fragmentierungsverhaltens eine in unterschiedlichen Lösungsmitteln verdünnte Colistin-Standardlösung

⁵weitere Bedingungen: Colistin-Standard in ACN/H₂O (2/8; *v/v*) 100 ppm, Scan-Bereich 90,0 – 1200,0

direkt über die Spritzenpumpe injiziert (Tabelle 5.11). Mit Unterstützung der automatischen Funktion (*breakdown tool*) wurden aus einem vorgegebenen Vorläufer-Ion die optimierten Kollisionsenergien für die generierten Fragmentionen ermittelt und in einer Fragmentierungskurve (*breakdown*-Kurve) angezeigt (Abbildung 3.9). Die Fragmentierungskurven zeigten stets ein schlechtes Fragmentierungsverhalten von Colistin, was sich in der nicht konstanten Bildung von Fragmentionen schwacher Intensität äußerte. Die manuelle Einstellung der Kollisionsenergien führte zu identischen Ergebnissen. Auch die Erhöhung des Druckes in der Stoßzelle ergab kein konstantes Fragmentierungsverhalten oder keine intensiveren Fragmentionen. Vielmehr war zu beobachten, dass durch die Stöße mit dem Kollisionsgas Argon weiterhin die Vorläufer-Ionen m/z 586 bzw. m/z 579 die intensivsten Ionen bildeten. Im Grunde handelte es sich dabei um „pseudo-Fragmentionen“. Bei Kollisionsenergien von ≈ 10 eV bildeten die Vorläufer-Ionen (m/z 586 bzw. m/z 579) die intensivsten „pseudo-Fragmentionen“.

Polymyxin B zeigte ein analog schlechtes Fragmentierungsverhalten wie Colistin. Als „pseudo-Fragmention“ war das Molekülion m/z 603 zu messen (Abbildung 3.9).

Die EU-Anforderungen an das Konzept der Identifizierungspunkte sind erreicht, wenn zwei diagnostische Fragmentionen im MRM-Modus gemessen werden (Abschnitt 1.1.1). Dabei darf sich das relative Intensitätsverhältnis der beiden diagnostischen Fragmente nur in vorgegebenen Grenzen bewegen. Mit einem im SVUA-Krefeld vorhandenen Massenspektrometer eines anderen Herstellers sollte das massenspektrometrische Verhalten von Colistin erneut gemessen werden, mit dem Ziel, die Anforderungen der EU-Entscheidung erfüllen zu können.

3.3.2 Massenspektrometrische Detektion (*Micromass*)

Ausgangsbedingung für die erneuten MS-Experimente war zunächst eine Desolvationstemperatur von 250 °C. Bei diesen Versuchen zeigten sich - unabhängig vom Lösungsmittel - die Molekülionen mit m/z 579 und m/z 586 als die weitaus dominantesten Molekülionen (Abbildung 3.8).

Die unzureichende Fragmentierung bestätigte sich an diesem Massenspektrometer in gleichem Maße. Bei höherer Kollisionsenergie entstanden Fragmentionen von schwacher Intensität, mit denen die erforderliche Bestimmungsgrenze nicht erreicht werden konnte. Die Molekülionen m/z 586 bzw. m/z 579 bildeten stets die intensivsten Fragmentionen. Variationen des Druckes in der Kollisionszelle als auch der Kollisionsenergien führten zu keinen Änderungen im Fragmentierungsverhalten. Als idealer Druck in der Kollisionszelle und Kollisionsenergie erwiesen sich $1,3 \cdot 10^{-3}$ bar und 10 eV. Bei Kollisionsenergien

3 Ergebnisse

von bis zu 20 eV wurden die Molekülionen m/z 586 bzw. m/z 579 als die intensivsten Ionen gemessen. Üblicherweise treten bei Kollisionsenergien unter 10 eV keine verwertbaren diagnostischen Fragmentationen auf. Bei dem cyclischen Polypeptid-Antibiotikum Colistin wurde dies bis zu 20 eV beobachtet (Abbildung 3.10). Die für Colistin erzielten Ergebnisse bezüglich des Fragmentierungsverhaltens bestätigten sich ebenfalls für Polymyxin B (Abbildung 3.11).

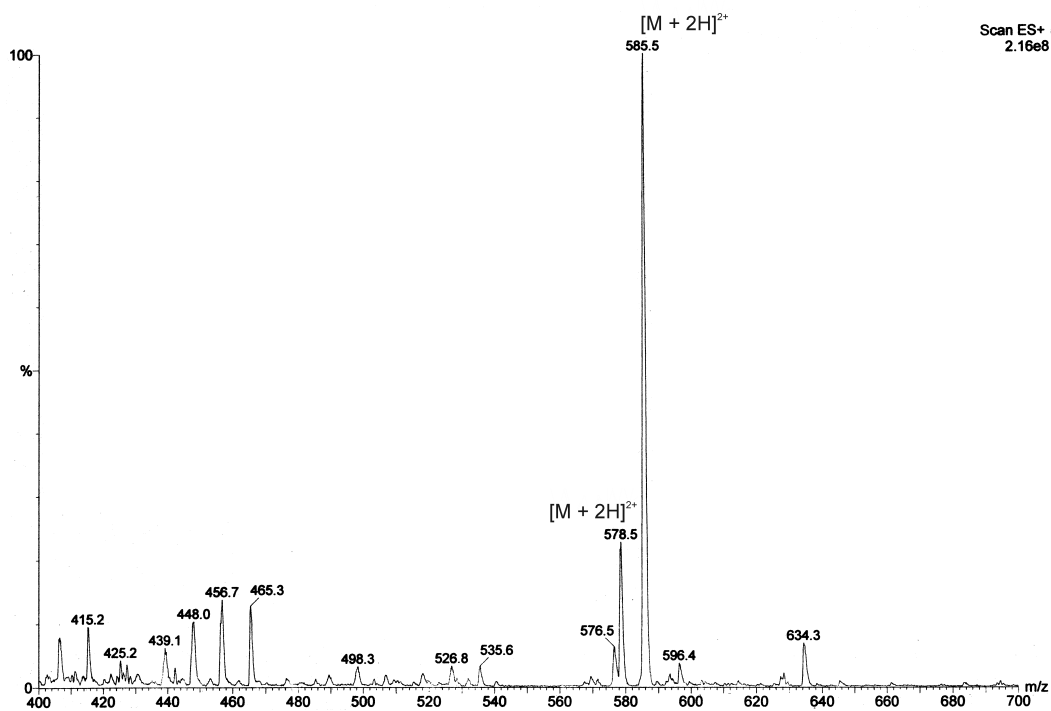


Abbildung 3.8: Massenspektrum eines Colistin-Standards verdünnt in 1 mM NH_4Ac / 0,5% HFO

Micromass-Spektrometer

Scan-Bereich: m/z 250,0 – m/z 1500,0

Direktinjektion über eine Spritzenpumpe

Flussrate: 50 $\mu\text{L}/\text{min}$

Konzentration der Colistin-Standardlösung: $c = 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$

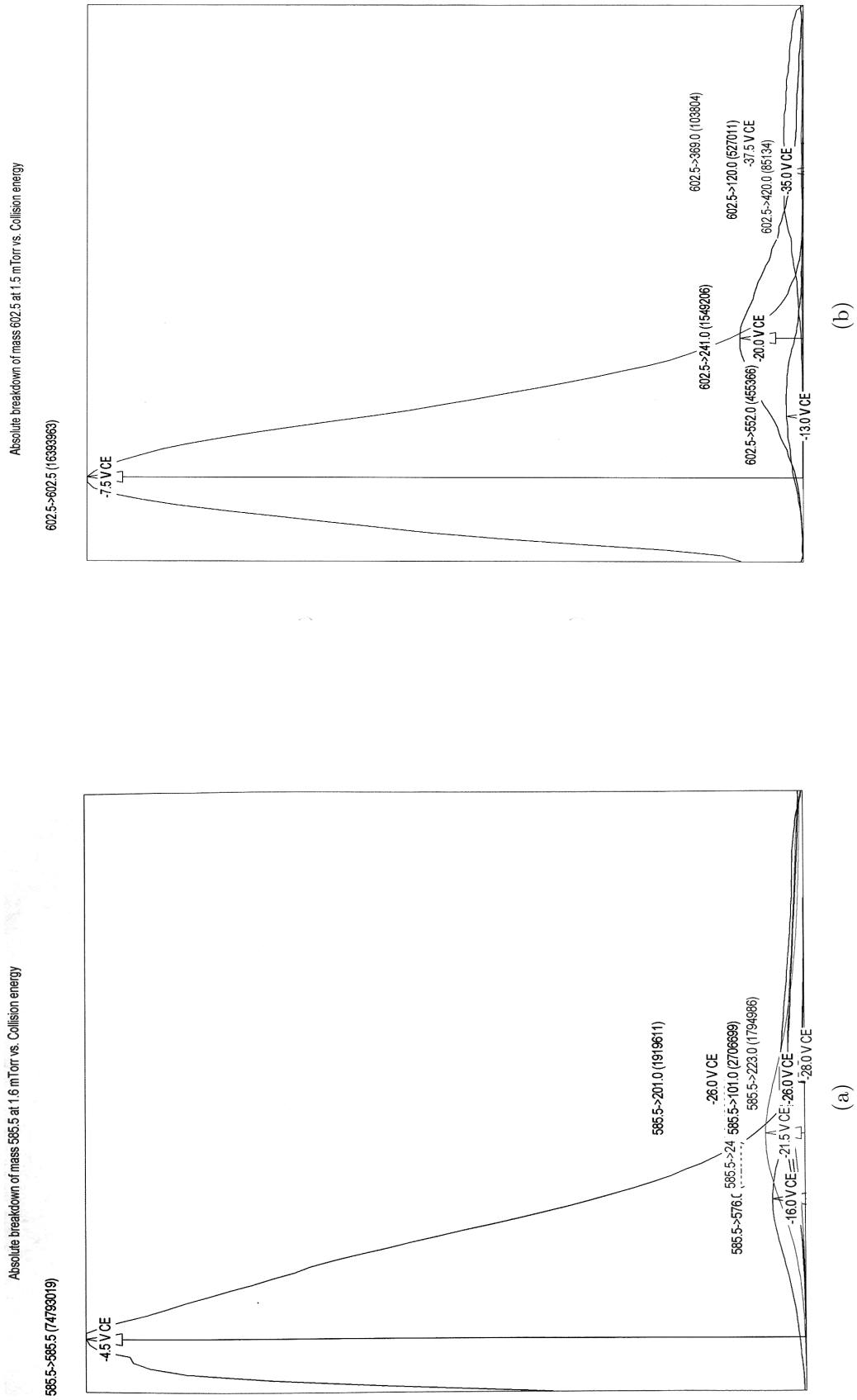


Abbildung 3.9: Fragmentierungskurven von Colistin (a) und Polymyxin B (b)
 Massenspektrometrische Bedingungen: Tabelle 5.11

3 Ergebnisse

- a: Kollisionsenergie 20 eV
- b: Kollisionsenergie 23 eV

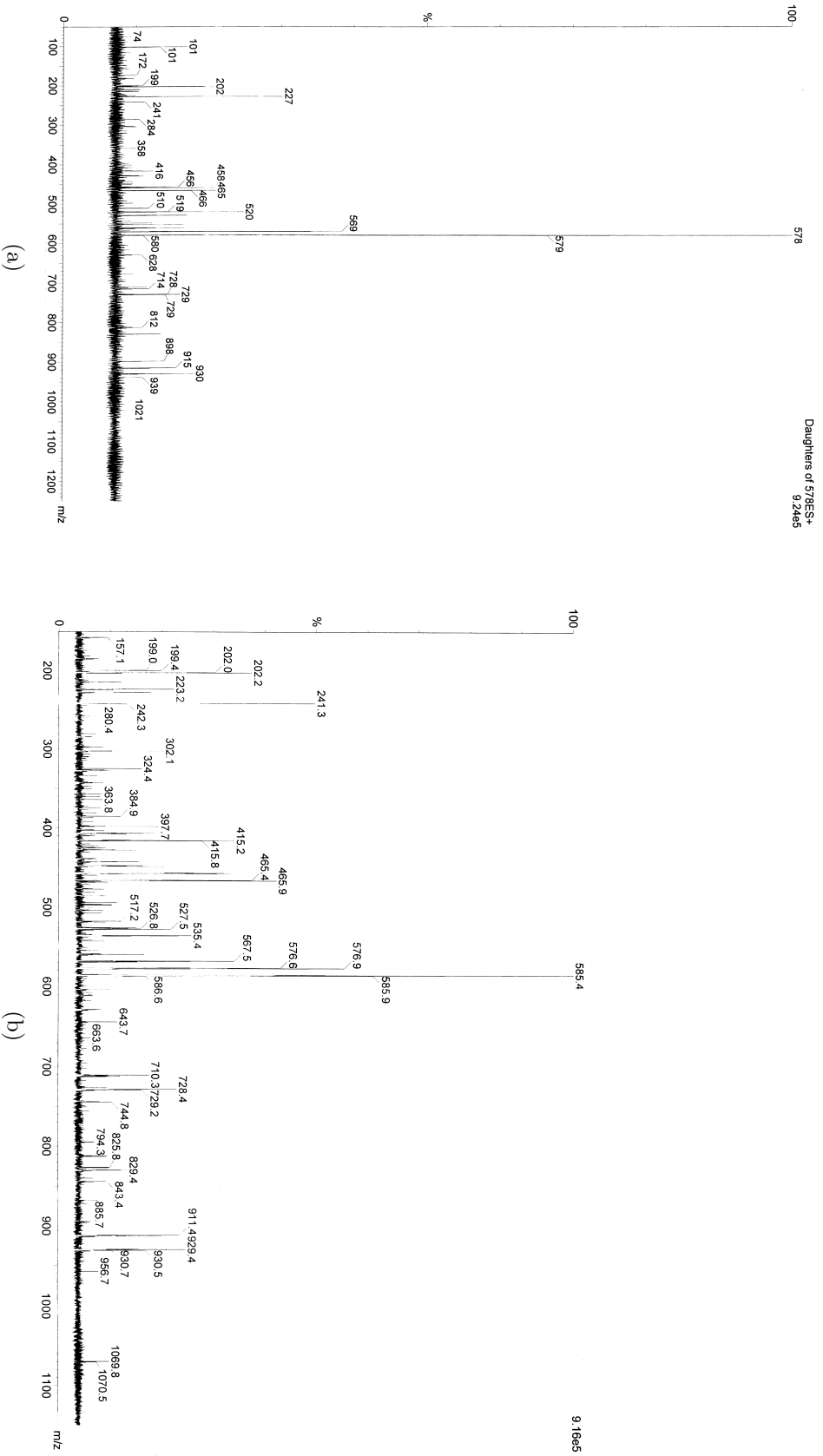
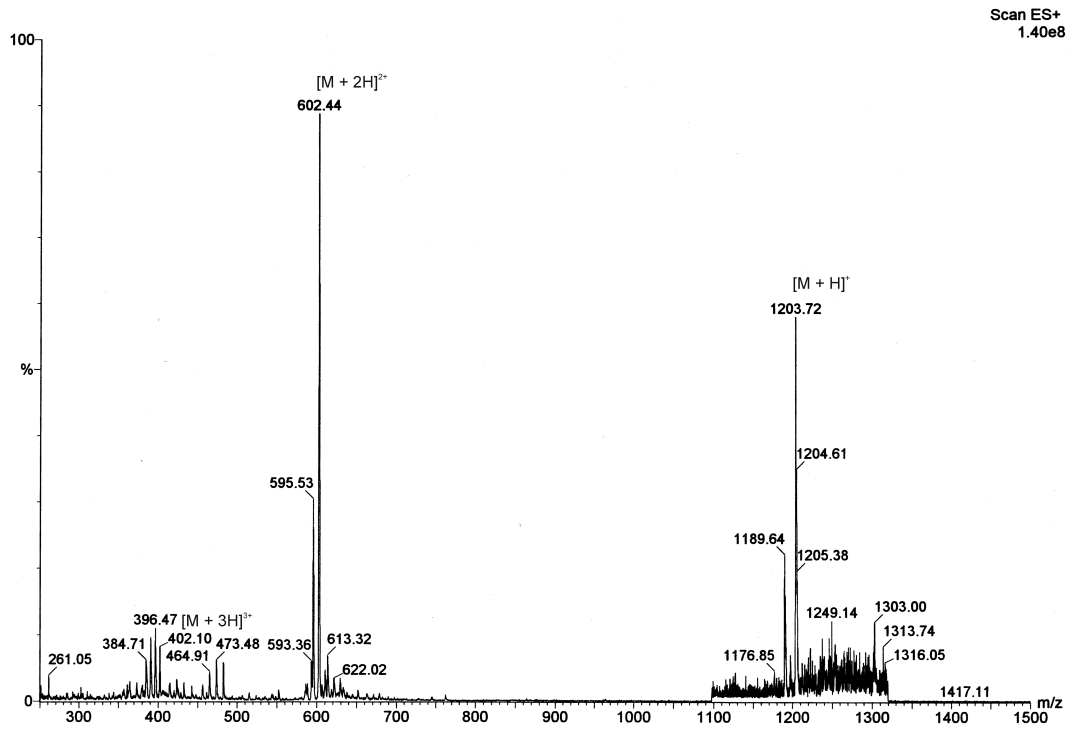
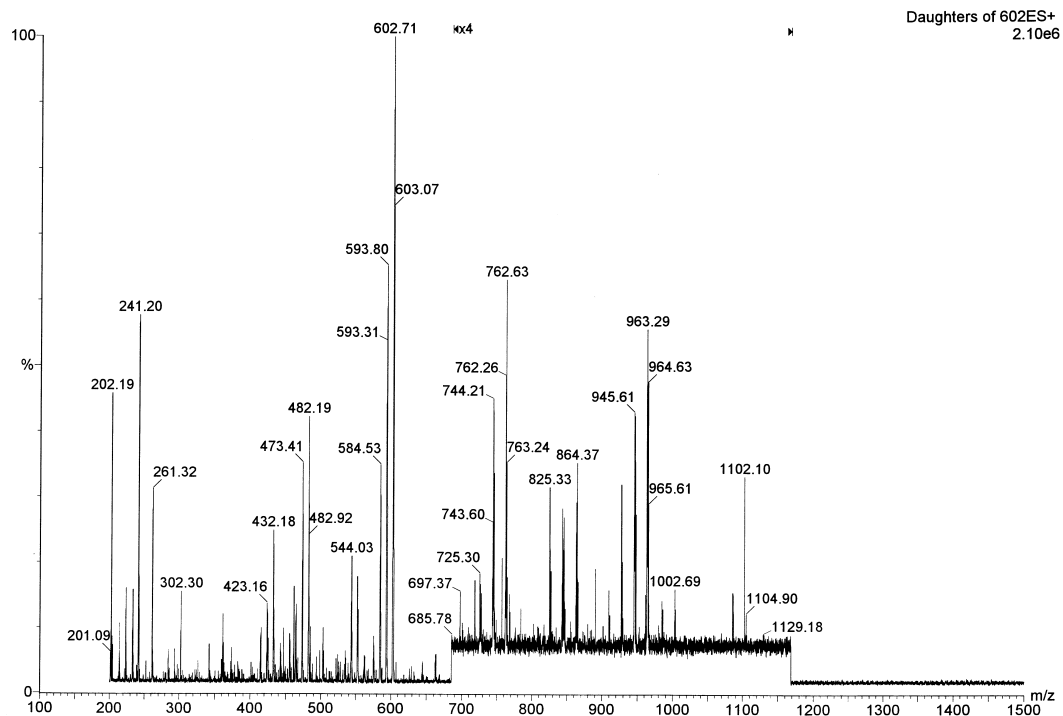


Abbildung 3.10: MS/MS-Spektren von Colistin-Standards verdünnt in 1 mM NH₄Ac / 0,5 % HFO

3.3 Entwicklung einer Methode zur LC-Trennung und MS-Detektion



(a)



(b)

Abbildung 3.11: Massenspektrum und MS/MS-Spektrum eines Polymyxin B-Standards verdünnt in 1 mM NH₄Ac / 0,5 % HFO

a: MS-Spektrum von Polymyxin B

b: Fragmentierungsspektrum von Polymyxin B, Kollisionsenergie 20 eV

Die massenspektrometrischen Experimente führten zu folgenden Ergebnissen:

- Ein Zusatz von Ammoniumsalz zum Eluenten erhöhte die Kontinuität und Stabilität der Ionenbildung und in geringem Maße auch die Intensität der Ionenausbeute. Trifluoressigsäure hatte einen negativen Einfluss auf die Ionisation.
- Fragmentierungen traten bereits in der Quelle auf (*In-source* Fragmentierung)
- Aussagekräftige MS/MS-Spektren waren nicht messbar; die Molekülionen m/z 586 bzw. m/z 579 bildeten gleichzeitig die intensivsten „pseudo-Fragmentionen“.

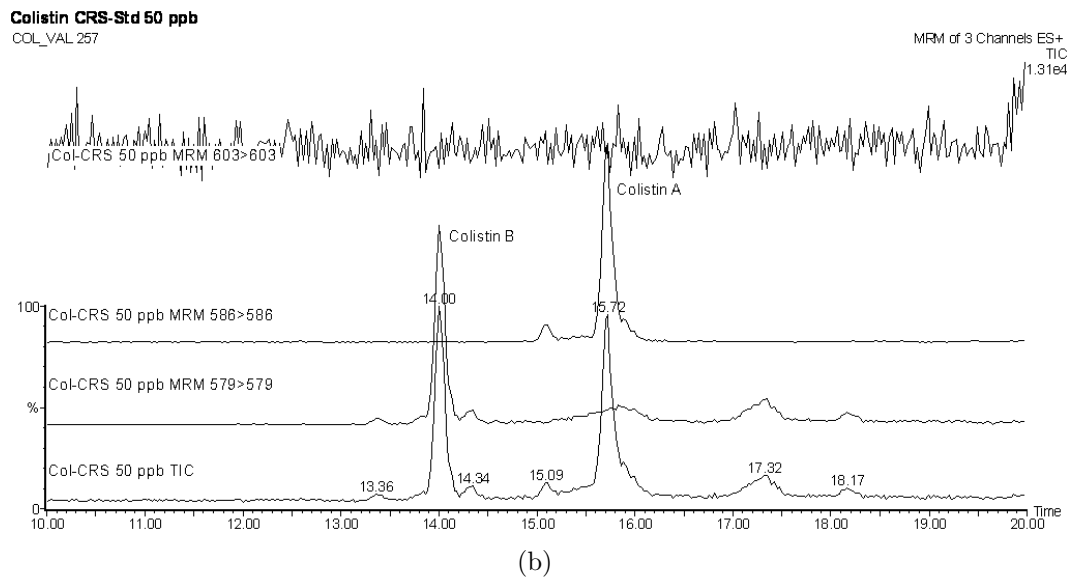
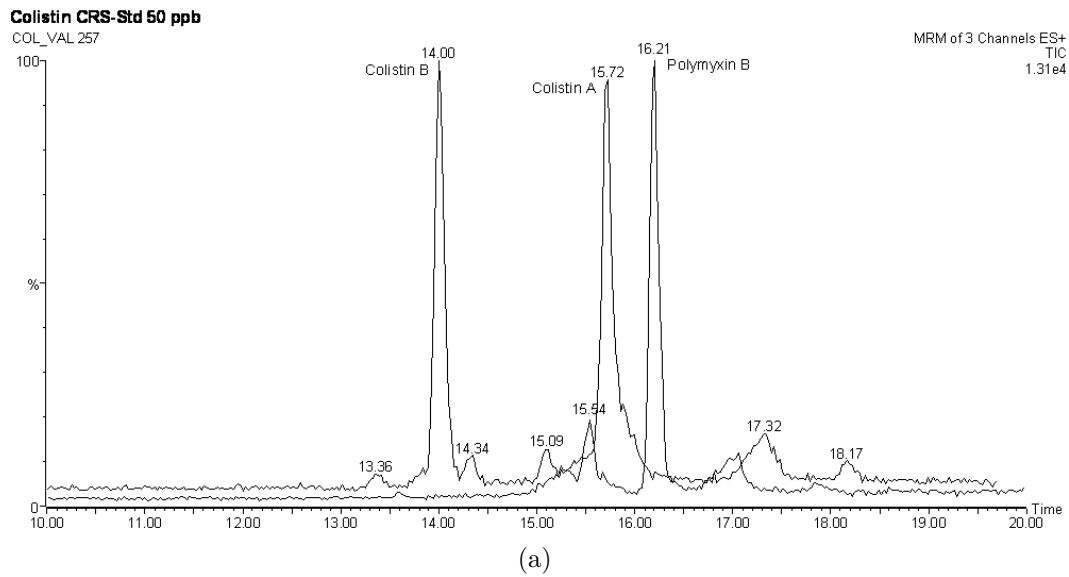
Zusätzlich musste in Betracht gezogen werden, dass neben den Lösungsmitteln und den variablen Geräteparametern auch die Geometrie des Massenspektrometers (Elektrospray-Ionisationsquelle und Kollisionszelle) Einfluss auf die Massenspektren und das Fragmentierverhalten von Colistin zu haben scheint.

Diese Beobachtung führte zu der Entscheidung, die Vorgaben des EU-Identifizierungspunktekonzepes anders anzuwenden, weil relative Intensitätsverhältnisse diagnostischer Ionen einer Komponente nicht ermittelt werden konnten. Deshalb wurde das Verhältnis der beiden „pseudo-Fragmentionen“ m/z 586 bzw. m/z 579 zu Grunde gelegt. Zur Bestätigung von Colistin erschien diese Vorgehensweise sinnvoll, da Colistin A und Colistin B als pharmakologisch wirksame Komponenten im HPLC-CR-Standard stets im gleichen Verhältnis zu einander auftreten.

3.3.3 Anwendbarkeit der Methode

Geplant war, die entwickelte und optimierte flüssigchromatographische Methode mit Fluoreszenzdetektion auf die LC mit massenspektrometrischem Detektor zu übertragen, zumal Trifluoressigsäure-Zusätze standardmäßig in der MS-Protein- und Peptidanalytik eingesetzt werden. Die ermittelten Ergebnisse ließen dies jedoch nicht Erfolg versprechend erscheinen. Letztlich konnten die von der *European Pharmacopoeia* angegebenen Komponenten (Abschnitt 1.2) mit den Eluenten 1 M $\text{NH}_4\text{FO}/\text{HFO}/\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (1/15/984/50; $v/v/v/v$) und 0,1 % Ameisensäure (HFO) in ACN an einer Jupiter-Proteo-Säule ausreichend chromatographisch getrennt werden. Die Schwierigkeit bestand in einer akzeptablen Trennung der Komponenten Colistin A (Polymyxin E 1) und Colistin A-Ile (Polymyxin E 1-Ile).

3.3 Entwicklung einer Methode zur LC-Trennung und MS-Detektion



3 Ergebnisse

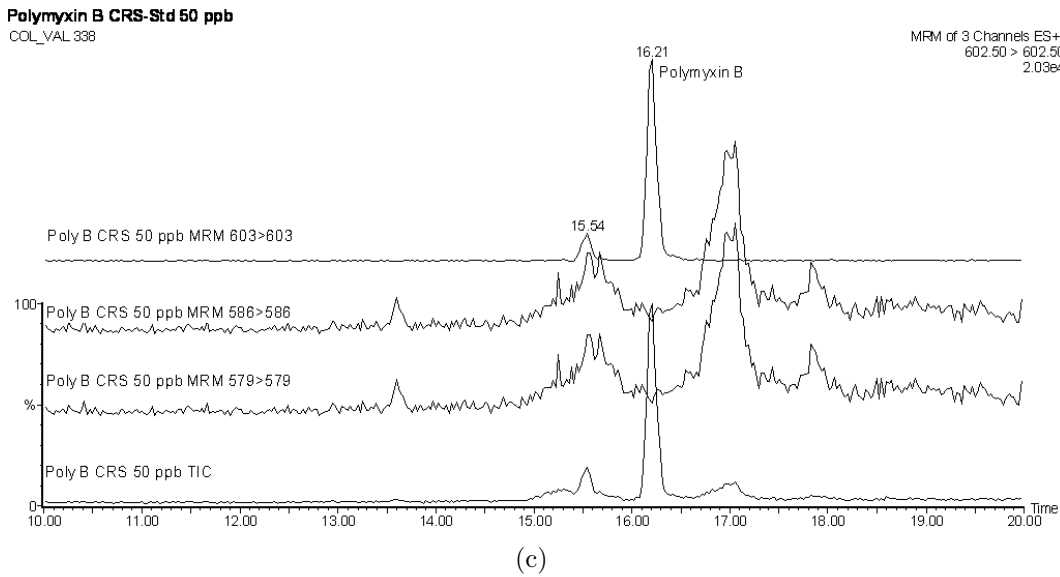


Abbildung 3.12: TIC- und MS/MS-Chromatogramme von Colistin und Polymyxin B

- a: TIC-Chromatogramme einer Colistin und Polymyxin B CR-Standardlösung (je 50 $\mu\text{g/L}$; 5 ng on column)
- b: MS/MS-Chromatogramm einer 50 $\mu\text{g/L}$ Colistin-CR-Standardlösung (5 ng on column)
- c: MS/MS-Chromatogramm einer 50 $\mu\text{g/L}$ Polymyxin B CR-Standardlösung (5 ng on column)
- Trennsäule: Jupiter-Proteo (100 x 2,0, 4 μm);
 - Fließmittel A: 1 M $\text{NH}_4\text{FO}/\text{HFO}/\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (1/15/984/50; $v/v/v/v$);
 - Fließmittel B: 0,1 % HFO in ACN;
 - Fluss: 0,25 mL/min;
 - Gradient: Abschnitt 5.2.3.4;
 - Massenspektrometer: Tabelle 5.14

Bei der Detektion im MRM-Modus beruht die Methode auf der Registrierung von vordefinierten stoßaktivierten Zerfällen. Im vorliegenden Fall wurden „pseudo“-Zerfälle von m/z 586 > 586, m/z 579 > 579 und m/z 603 > 603 aufgezeichnet (Abbildung 3.12).

Zur Kalibrierung der Methode kamen CR-Standards in 0,01 M HCl in Konzentrationen vom 0,5-, 1-, 1,5- und 2-fachen des zulässigen Grenzwertes in dreimaliger Serienmessung zur Anwendung. Der Arbeitsbereich lag hierbei zwischen 1,25 ng bis 5 ng.

6

Tabelle 3.7: Kalibrierung von Colistin von fünf Konzentrationsstufen (einschließlich Null) über den Arbeitsbereich von 1,25 – 5 ng nach Bestimmung LC-ESI-MS/MS

Analyt	a ⁷ [Area]	b ⁷ [Area/ μ g/L]	s _y ⁷ [Area]	r ²	s _{x0} ⁷ [μ g/L]	V _{x0} ⁷ [%]	cnf (a) ⁷ [Area]
Colistin A	-374,50	97,42	344,91	0,9575	3,54	16,01	± 333,24
Colistin B	-311,77	107,20	310,36	0,9514	2,90	17,17	± 299,67

Die Ermittlung der Daten für die Wiederholpräzision erfolgte anhand von sechs Einzelmessungen eines CR-Polymyxin B Standards in 0,01 M HCl (mit $c = 25 \mu\text{g/L}$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 dargestellt. Im CR-Standard wurde kein präziser Gehalt an Polymyxin B1, der Hauptkomponente, erwähnt, folglich ist hier als absolute Konzentration die Gesamtkonzentration vorausgesetzt. Dieses war in diesem Fall unerheblich, da Polymyxin B nicht quantifiziert wurde. Die Bestimmung der Richtigkeit im Rahmen der Entscheidung [2002/657/EG](#) mit dem CR-Colistin-Standard befindet sich an anderer Stelle (Abschnitt 3.5).

8

Tabelle 3.8: Wiederholpräzision bei der Bestimmung von Polymyxin B mit LC-ESI-MS/MS

Analyt	Injektion [μ L]	abs. Konzen- tration [ng]	Mittelwert [Area]	Standardab- weichung [Area]	RSD ⁹ [%]
Polymyxin B1	25	1,25	2810,00	162,90	5,8

⁶Methode: Abschnitt 5.2.3.4Gesamtzahl der Kalibriermessungen: $n = 12$ ⁷Abk.: a, Achsenabschnitt; b, Steigung der Geraden; s_y, Reststandardabweichung; r², Bestimmtheitsmaß; s_{x0}, Verfahrensstandardabweichung; V_{x0}, Verfahrensvariationskoeffizient; cnf (a), Vertrauensbereich des Achsenabschnittes; Signifikanzniveau $P = 95 \%$ und Freiheitsgrad $f = n-2$ ⁸Methode: Abschnitt 5.2.3.4⁹RSD: relative Standardabweichung bzw. Variationskoeffizient

3.4 Probenaufarbeitung

Die Untersuchung zur Entwicklung der Probenaufarbeitung erfolgte zunächst mit der LC-Fluoreszenzdetektion, da die massenspektrometrischen Bedingungen zu dem Zeitpunkt noch nicht vollständig entwickelt und optimiert waren.

In dieser Arbeit wurde der Einsatz von Separationstechniken wie Gelfiltration, Ultrafiltration und Festphasenextraktion (Ionenaustausch und *reversed phase*) untersucht, mit dem Ziel, einen möglichst Matrix freien Extrakt und eine hohe Wiederfindungsrate zu erhalten. Die Forderung nach einer hohen Wiederfindungsrate ergab sich aus den ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Standardlösungen bei der LC-Fluoreszenzdetektion, die im Bereich des MRL-Wertes lagen (Abschnitt 3.2).

3.4.1 Aufarbeitung von Milch - Extraktion mit TCA

Die Aufarbeitung wurde zunächst nach einer in der Literatur beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt (DECOLIN U. A. (1997)) (Abschnitt 5.3.1). Während DECOLIN U. A. (1997) Colistin mittels Vorsäulenderivatisierung analysierten, kam hier die Nachsäulenderivatisierung zur Anwendung. Im Chromatogramm der Leerwertprobe wurden zur gleichen Zeit zu der Colistin A und Colistin B retenierten (Abbildung 3.13) Matrixbestandteile gemessen, was Aufstockungsversuche in höheren Konzentrationen belegten. Aufgrund der Überlagerung der Analyten Colistin A und Colistin B von Matrixbegleit-substanzen und der mangelnden Empfindlichkeit, war eine Auswertung im erforderlichen Konzentrationsbereich nicht möglich. Bei der verwendeten Rohmilch handelte es sich um eine garantiert rückstandsfreie Bio-Milch bekannter Herkunft, so dass von einem Colistin-Rückstand nicht auszugehen war. Weitere Reinigungsschritte und Aufkonzentrierungsschritte waren erforderlich. Besonders zu beachten waren hier die Milchinhaltstoffe wie beispielsweise den als Emulgator wirkenden Phospholipiden oder anderen Proteinen, die ähnliche chemische Eigenschaften wie Colistin besitzen.

3.4.1.1 Gelfiltrationschromatographie

In einem nächsten Ansatz wurden 10 mL Milch (Leerwertprobe) mit 2 mL 10%iger TCA deproteiniert. Nach Zentrifugieren und Auffüllen auf ein definiertes Volumen wurden 10 mL mittels Festphasenextraktion gereinigt (Abschnitt 5.3.2) und abweichend zur vorherigen SPE-Reinigung, die Kartuschen in einem Arbeitsschritt mit MeOH/0,01 M HCl (1/1; v/v) konditioniert und äquilibriert. Dies waren erste Ergebnisse aus den Festphasenextraktions-Versuchen (Abschnitt 5.3.3).

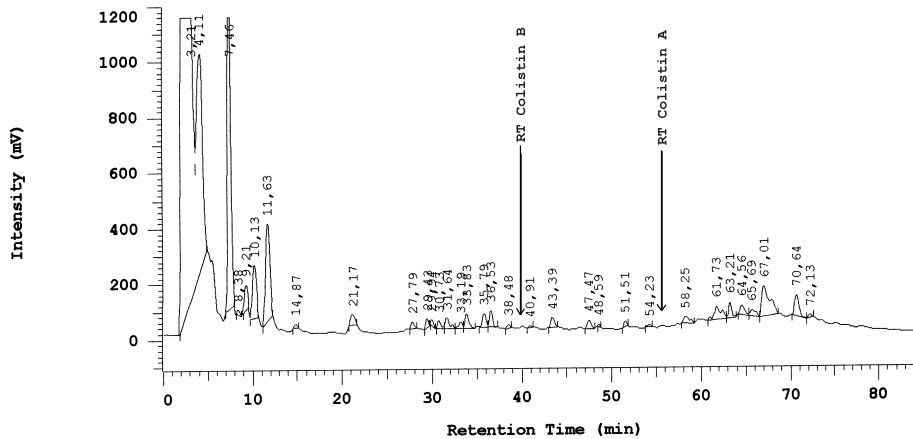


Abbildung 3.13: Chromatogramm einer Rohmilch-Leerwertprobe

Die chromatographischen Bedingungen sind in Abschnitt 5.3.1 beschrieben

Mit der Erhöhung des aufgegebenen Probevolumens nahm konsequenterweise der Anteil der koeluierten Matrixbestandteile zu, so dass eine zweifelsfreie Qualifizierung von Colistin nicht möglich war. In einem weiteren Schritt erfolgte eine Reinigung des aufkonzentrierten Eluats der SPE-Aufarbeitung mittels Gelfiltrationschromatographie über eine *Superdex® Peptide*-Säule (Abschnitt 5.3.2.1). Bei der verwendeten stationären Phase - *Superdex® Peptide* - handelt es sich um ein Dextranmaterial, das zusätzlich kovalent mit Agarose verbunden ist und somit ein definiertes dreidimensionales Netzwerk mit Poren bildet und zur Trennung von Peptiden und Proteinen zwischen M_r 100 und 7000 bestimmt ist. Die Phase ist chemisch sehr stabil und kann in einem pH-Bereich zwischen 1 und 14 eingesetzt werden. In Vorversuchen sollte getestet werden, ob zum einen die erforderliche Empfindlichkeit erreicht werden kann und zum anderen, ob eine Entfernung von Matrixbegleitsubstanzen möglich ist.

Die Trennung beruht nicht auf Wechselwirkungen zwischen Molekülen und stationärer Phase, sondern auf den Größen-Ausschluss. Dennoch sind Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und den Molekülen nicht auszuschließen. Bei kleineren Molekülen insbesondere Peptiden treten häufiger Wechselwirkungen auf als bei größeren Proteinen (Datenblatt zur Säule von *Amersham Biosciences*; *Amersham Biosciences Europe GmbH (2002)*). Die Zusammensetzung des Eluenten kann diese Einflüsse verringern. Ionische Wechselwirkungen können bei der *Superdex® Peptide* Phase durch einen niedrigen pH-Wert oder durch Zugabe von Salz wie NaCl unterdrückt werden, hydrophobe Wechselwirkungen hingegen durch den Anteil an organischem Lösungsmittel wie ACN. Eluenten wie 0,1 % TFA in ACN unterdrücken beide Wechselwirkungen effektiv. In den

3 Ergebnisse

durchgeführten Versuchen konnte durch Zusatz von 0,25 M NaCl zum Eluenten eine Wiederfindung für einen 1 mg/L Colistin-Standard von 100 % erreicht werden. Ebenso waren deutliche Reinigungseffekte durch die Gelfiltration zu beobachten (Abbildung 3.14). Eine ausreichende Empfindlichkeit für den erforderlichen Konzentrationsbereich zwischen 25 µg/L - 100 µg/L war allerdings aufgrund der mehrfachen Verdünnungen innerhalb des Analysengangs, trotz eines eingeführten Aufkonzentrierungsschrittes, nicht zu erzielen.

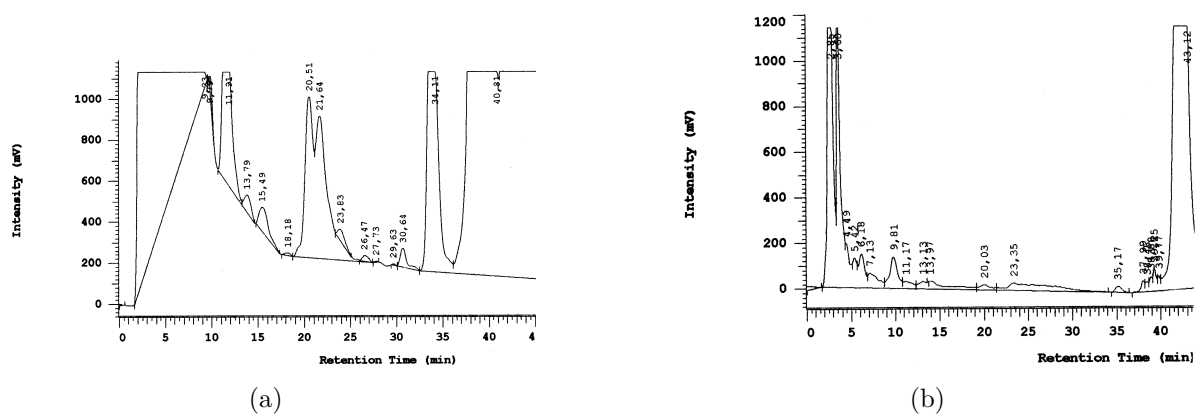


Abbildung 3.14: Chromatogramme zweier Leerwertproben

Injektionsvolumen: 20 µL, chromatographische Bedingungen: Abschnitt 5.3.2

- a: Aufarbeitung ohne GFC-Reinigung
- b: Aufarbeitung mit GFC-Reinigung

3.4.2 Festphasenextraktion

Zur Reinigung und Aufkonzentration wird häufig die Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) eingesetzt. Die Wahl des zu verwendenden Sorbensmaterials richtet sich nach den Eigenschaften des Zielanalyten. In der Literatur wird zur Reinigung und Aufkonzentration von Colistin die Verwendung von C18- oder Kationenaustauscher-Phasen beschrieben (DECOLIN U. A. (1997); SUHREN U. KNAPPSTEIN (2005)). In Versuchen mit verschiedenen SPE-Kartuschen und Lösungsmitteln sollte die für diese Aufgabenstellung geeignetste SPE-Kartusche sowie die optimalsten Lösungsmittel gefunden werden (Tabellen 3.9 und 5.17).

Der Test erfolgte mit C18-SPE-Kartuschen von zwei Anbietern (*IST Separtis* und *Chromabond*). Bei der bisher durchgeführten Festphasenextraktion (Konditionieren mit

MeOH, Äquilibrieren mit einem MeOH/HCl-Gemisch und Elution mit einem MeOH/HCl-Gemisch, (Abschnitt 5.3.1) wurden bei beiden Anbietern Wiederfindungsraten von ca. 40 % für Colistin A und ca. 50 % für Colistin B ermittelt. Die niedrigen Wiederfindungsraten führten dazu, dass zusätzliche Experimente hinsichtlich der Festphasenextraktion, durchgeführt mit den *Chromabond* C18ec-Kartuschen, erforderlich waren.

Das Konditionieren und Äquilibrieren in einem Schritt mit MeOH/0,01 M HCl im Volumenverhältnis von 1/1 ergab die bestmögliche Wiederfindung. Ein Waschschritt mit ACN/0,1 % TFA (2/8; *v/v*) war möglich, da Colistin mit dieser Lösungsmittelzusammensetzung nicht eluierte. Zusätzlich waren mehrere Elutionsschritte erforderlich, wobei in den ersten beiden Eluatzen > 90 % Colistin eluierten. Voraussetzung für die ausreichende Wiederfindung war eine entsprechende Sorbens-Kapazität der SPE-Kartuschen. Während sich 100 mg Sorbens-Bettmasse bereits für den Standard als unzureichend erwiesen, war mit 500 mg Sorbens-Bettmasse die erforderliche Wiederfindung zu erzielen.

Weiterhin ergab die vorherige Äquilibrierung der C18ec-Kartusche (*Chromabond*) mit Ammoniak eine hervorragende Wiederfindung. Dieser Reinigungsschritt wurde bei einer nächsten Probenaufarbeitung eingesetzt.

Im Versuch mit *Bond Elut* SCX-Kartuschen wurden zunächst die Bedingungen, wie von [SUHREN U. KNAPPSTEIN \(2005\)](#) beschrieben, übernommen. Anschließend wurden Triethylamin und Boratpuffer durch TFA bzw. Kaliumacetat ersetzt, da sich letztere für die LC-MS/MS Bestimmung besser eignen. TEA/Boratpuffer sind die stärkeren Gegenionen als TFA/Kaliumacetat, denn chromatographisch konnte Colistin bei letzterer Aufarbeitung nicht nachgewiesen werden, so dass dieser Aufreinigungsschritt nicht weiter in Betracht gezogen wurde.

Tabelle 3.9: Ergebnisse der Versuche mit unterschiedlichen SPE-Kartuschen und verschiedenen Lösungsmitteln

Kartusche	Konditionieren/Äquilibrieren	Waschen	Eluieren	WDF [%]	
				Colistin	Colistin
<i>Chromabond</i> C18ec	1. 2 mL MeOH		2 x 1mL und	A	B
6mL/500mg	2. 2 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*		1 x 2 mL MeOH/0,01M HCl (55/45)*	40	57
<i>Chromabond</i> C18ec	1. 2 mL MeOH		2 x 1 mL und	n.n.	n.n.
6mL/500mg	2. 2 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*		1 x 2 mL ACN/0,1% TFA (2/8)*	n.n.	n.n.
<i>Chromabond</i> C18ec	1. 2 mL MeOH		2 x 1 mL und	44	51
6mL/500mg	2. 2 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*		1 x 2 mL ACN/0,1% TFA (55/45)*		
<i>Chromabond</i> C18ec	2 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*		1 x 2 mL MeOH/0,01M HCl 55/45)*	67	75
6mL/500mg					
<i>Chromabond</i> C18ec	2 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*		4 x 1 mL MeOH/0,01M HCl (55/45)*	80	90
6mL/500mg					
<i>Chromabond</i> C18ec	3 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*	2 mL ACN/0,1% TFA (2/8)*	3 x 2 mL MeOH/0,01M HCl (55/45)*	104	93
6mL/500mg					
<i>Chromabond</i> C18ec	3 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*	2 mL ACN/H ₂ O (2/8)*	3 x 2 mL MeOH/0,01M HCl (55/45)*	9	6
6mL/500mg					
<i>Chromabond</i> C18ec	1 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*		3 x 1mL MeOH/0,01M HCl (55/45)*	6	5
1mL/100mg					
<i>Chromabond</i> C18ec	1. 6 mL MeOH	1. 3mL 5%ige NH ₃ -Lsg	3 x 3mL MeOH/0,01M HCl (55/45)*	99	113
6mL/500mg	2. 6 mL 5%ige NH ₃ -Lsg	2. 2mL 1 N H ₂ SO ₄ -Lsg			
<i>Chromabond</i> C18ec	1. 6 mL MeOH	3 mL H ₂ O	3 x 3mL MeOH/0,01M HCl (55/45)*	33	97
6mL/500mg	2. 6 mL NaOH-Lsg (pH = 9,85)				
<i>IST Separtis</i> C18	1. 2 mL MeOH		2 x 1 mL und	38	64
10mL/ 500mg	2. 2 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*		1 x 2 mL MeOH/0,01M HCl (55/45)*		
<i>IST Separtis</i> C18	1. 2 mL MeOH		2 x 1 mL und	n.n.	n.n.
10mL/ 500mg	2. 2 mL MeOH / 0,01M HCl (1/1)*		1 x 2 mL ACN/0,1% TFA (2/8)*		

Tabelle 3.9: Ergebnisse der Versuche mit unterschiedlichen SPE-Kartuschen und verschiedenen Lösungsmitteln

Kartusche	Konditionieren/Äquilibrieren	Waschen	Eluieren	WDF [%] Colistin	
				A	B
<i>IST Separatis</i> C18	1. 2 mL MeOH		2 x 1 mL und	44	52
10mL/ 500mg	2. 2 mL MeOH / 0,01M HCl (1/1)*		1 x 2 mL ACN/0,1% TFA (55/45)*		
<i>Bond Elut</i> SCX	1. 6 mL MeOH	1. 3 mL H ₂ O	1 x 3 mL 1 M K ₃ BO ₃ /ACN/TEA	59	52
500 mg/3 mL	2. 6 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*	2. 3 mL ACN/H ₂ O (2/3)*	(40/10/0,5)*		
		3. 3 mL 1M KAc/ACN (3/1)*			
<i>Bond Elut</i> SCX	1. 6 mL MeOH	1. 3 mL H ₂ O	2 x 2 mL 1 M K ₃ BO ₃ /ACN/TEA	82	90
500 mg/3 mL	2. 6 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*	2. 3 mL ACN/H ₂ O (2/3) *	(40/10/0,5)*		
		3. 3 mL 1M KAc/ACN (3/1)*			
<i>Bond Elut</i> SCX	1. 6 mL MeOH	1. 3 mL H ₂ O	2 x 2 mL 1 M KAc/ACN/TFA	n.n.	n.n.
500 mg/3 mL	2. 6 mL MeOH/0,01M HCl (1/1)*	2. 3 mL ACN/H ₂ O (2/3)*	(40/10/0,05)*		
		3. 3 mL 1M KAc/ACN (3/1)*	mit KOH auf pH = 11,0 eingestellt		

* Bei den angegebenen Lösungsmittelverhältnissen handelt es sich um Volumenverhältnisse

3.4.3 Aufarbeitung von Milch - Extraktion mit TCA/ACN

Zwei Rohmilchproben (Leerwertprobe und dotierte Leerwertprobe) wurden jeweils mit einer 10 %igen TCA/ACN-Lösung entfettet und deproteiniert. Die Reinigung erfolgte an einer mit Ammoniak äquilibrierten C18ec-Kartusche (*Chromabond*) (Abschnitt 5.3.4). Der Vergleich der beiden Chromatogramme (Abbildung 3.15) zeigte, dass in der Leerwertprobe ein Peak bei 26,5 Minuten retinierte, der durch die Software Colistin A zugeordnet wurde. Nach 13,9 Minuten retinierte Colistin B. Eine sichere Aussage über das Nichtvorhandensein von Colistin war anhand des Chromatogramms nicht möglich. Im Vergleich zu den ersten Aufarbeitungen war dennoch ein deutlicher, wenn aber noch nicht ausreichender Reinigungseffekt festzustellen. In Wiederholungsversuchen traten bei der SPE Probleme auf. Ein Großteil der Kartuschen verstopfte regelmäßig nach der Probenaufgabe, so dass eine Serienaufarbeitung nicht möglich und damit für Routineuntersuchungen ungeeignet war. Eine Reduzierung des Probenvolumen entfiel, weil die für die Fluoreszenzdetektion notwendige Aufkonzentration nicht erzielt worden wäre.

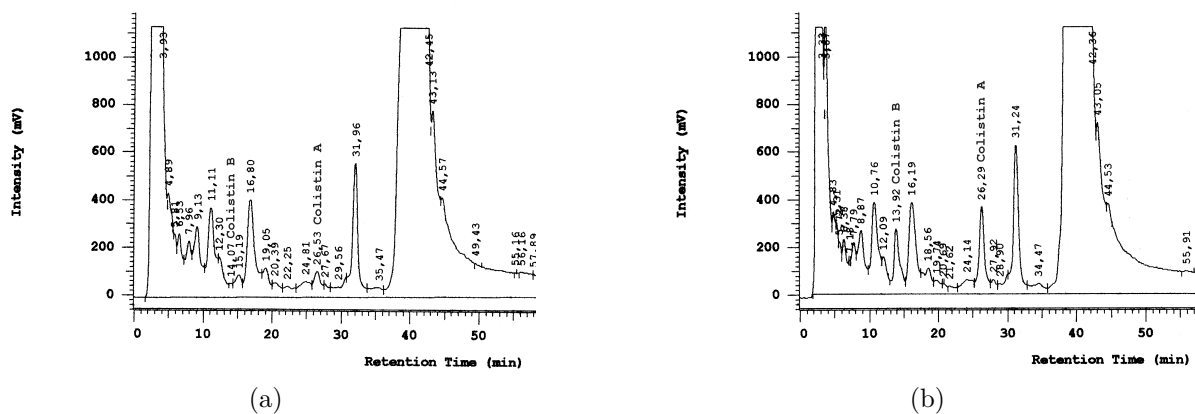


Abbildung 3.15: Chromatogramme einer Leerwertprobe (a) und einer 1000 µg/L dotierten Probe (b)

Injektionsvolumen 20 µL, Chromatographische Bedingungen: Abschnitt 5.3.4

3.4.4 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration ist eine Membranfiltration bei der eine semipermeable Membran eine gröÙenselektive Barriere für Moleküle bildet. Die Ultrafiltration ist ein schonendes Verfahren zur Reinigung und Aufkonzentrierung von niedermolekularen gelösten Stoffen und Makromolekülen. Sie trennt im Bereich von 1 kDa bis 500 kDa. Für Colistin bot sich die Ultrafiltration mit 5 kDa oder 10 kDa NMWL *cut-off* Membranen an. Dies

ist die minimale Molekülmasse eines Moleküls, die durch die Membran zurückgehalten wird. Dieser Aufarbeitungsschritt sollte die Extraktion mit TCA bzw. TCA/ACN ersetzen und durch die gleichzeitige Konzentrierung wäre ein geringeres Volumen für die Festphasenextraktion erforderlich.

In einem neuen Experiment wurden jeweils 2 mL Milch (eine Leerwertprobe, eine mit 100 $\mu\text{g/L}$ dotierte Leerwertprobe) direkt in mit Wasser vorbehandelte 5 kDa und 10 kDa Millipore-Filter gegeben und zentrifugiert. Das Permeat wurde wie in Abschnitt 5.3.5 beschrieben, behandelt und chromatographiert. Ein positiver verwertbarer Reinigungseffekt war nicht erzielt worden. Erkennbar war die höhere Durchlässigkeit des 10 kDa Filters für Colistin.

3.4.5 Anwendbarkeit auf Milchproben

Die bisher durchgeführten Aufarbeitungsschritte waren nicht zufrieden stellend. Aufgegriffen wurde nun die Festphasenextraktion bei der die Konditionierung und Äquilibrierung in einem Schritt mit MeOH/0,01 M HCl (1/1; v/v), ein Waschschrift mit ACN/0,1 % TFA (2/8; v/v) und die anschließende Elution mit MeOH/0,01 M HCl (55/45; v/v) erfolgte. Die vorherige Extraktion zur Abtrennung von Milchproteinen erfolgte in zwei Schritten mit Oxalsäure und HCl/TCA. Die zwischengeschalteten Zentrifugierschritte trennten nicht nur denaturierte Milchproteine, sondern auch das Milchlipo ab (Abschnitt 5.3.6).

Die mit der LC-Fluoreszenzdetektion gemessenen Chromatogramme ermöglichten keine Auswertung. Weiterhin überlagerten Matrixbestandteile die Zielanalyten Colistin A und Colistin B, so dass im nächsten Schritt die LC-MS/MS-Messung durchgeführt wurde.

Um eine ausreichende Empfindlichkeit zu sichern, wurde bei der SPE der komplette Überstand auf die Kartuschen aufgegeben und das Eluat letztlich auf 7 mL aufgefüllt, so dass insgesamt aufkonzentriert wurde. Die Massenspektren zeigten, dass Colistin A mit m/z 586 und Colistin B mit m/z 579 nun qualitativ und quantitativ bestimmt werden konnten und dass störende Matrixbestandteile weitestgehend ausgeblendet waren (Abbildung 3.16).

3 Ergebnisse

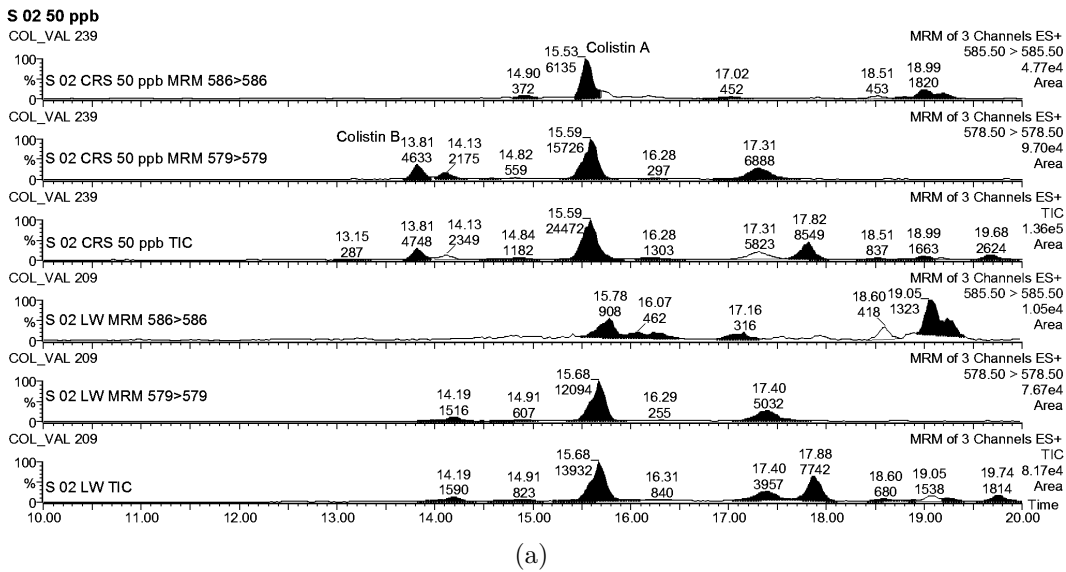


Abbildung 3.16: TIC- und MS/MS-Chromatogramme (MRM 579 > 579 und MRM 586 > 586) einer Leerwertprobe und einer 50 $\mu\text{g/L}$ dotierten Probe
Injektionsvolumen: 50 μL , chromatographische und massenspektrometrische Bedingungen: Abschnitt 5.2.3.4

3.5 Validierung

Mit der Validierung eines Untersuchungsverfahrens wird im Falle der Tierarzneimittel-Rückstandsanalytik nachgewiesen, dass das Verfahren die Leistungskriterien der Entscheidung 2002/657/EG erfüllt.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach dem alternativen Verfahren validiert. Dabei handelt es sich um eine *Inhouse*-Validierung, bei der die Reproduzierbarkeit (Methodenvergleichsstudie mit mehreren Laboratorien) nicht bestimmt wird (Tabelle 3.10). Sie ist beispielsweise durch die Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen zu ermitteln. Zusätzlich waren Stabilität der Analyten und Spezifität des Untersuchungsverfahrens getrennt zu bestimmen.

Tabelle 3.10: Analysemethode zur Bestimmung von Colistin in Milch

Extraktion, Entfettung	Die Milch wird homogenisiert (geschüttelt).
	Es werden genau 10 mL Milch ¹⁰ in ein Zentrifugenglas gegeben. Dann werden 2 mL 0,6 mol/L Oxalsäure hinzu gegeben, 15 Minuten geschüttelt und zentrifugiert (2500 U/min, 20 °C, 20 Minuten). Der Überstand wird mit 15 mL einer 0,5 mol/L HCl/0,3 mol/L (= 5%ig) TCA (1:1)-Lösung versetzt, 15 Minuten geschüttelt und bei 2500 U/min und 20 °C 30 Minuten zentrifugiert.
Aufreinigung an C18ec - Kartuschen	<p>Die wässrige Phase wird anschließend an einer C18ec-Kartusche wie folgt gereinigt:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Konditionieren und Äquilibrieren: 3 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1; <i>v/v</i>) 2. ganzen Probenextrakt aufgeben 3. Waschen: 1 x 2 mL ACN/0,1 % TFA in H₂O (2/8; <i>v/v</i>) 4. Eluieren: 3 x 2 mL MeOH/0,01 M HCl (55/45; <i>v/v</i>) <p>Das Eluat wird in ein graduiertes Reagenzglas aufgefangen und mit Wasser anschließend auf 7 mL aufgefüllt. Die Lösung ist 3 Wochen im Kühlschrank haltbar.</p>
Chromatographische Auftrennung und massenspektrometrische Detektion	<ul style="list-style-type: none"> • Stationäre Phase: Jupiter Proteo C12, 100 x 2,0 mm, 4 μm, 90 Å mit entsprechender Vorsäule • Mobile Phase: Fließmittel A: 1 M NH₄FO / HFO / H₂O / ACN (1/15/984/50; <i>v/v/v/v</i>) (pH= 2,3) Fließmittel B: 0,1 % HFO in ACN (pH= 1,6) • Gradient: Tabelle 5.15

¹⁰Dichte von Rohmilch: $\rho=1,026-1,033$ (TOEPEL (2004))

Tabelle 3.10: Analysemethode zur Bestimmung von Colistin in Milch

Chromatographische Auftrennung und massenspektrometrische Detektion	<ul style="list-style-type: none"> Massenspektrometer: Kapillarspannung: 2,0 kV Cone-Spannung: 30 V Kollisionsenergie: 10 eV Desolvatationstemperatur: 350 °C Massenübergänge: m/z 578,5 > 578,5; m/z 585,5 > 585,5; m/z 602,5 > 602,5
Auswertung	Externe Standardmethode (Abschnitt 5.4.5)

3.5.1 Stabilitätstest

Analyseergebnisse können durch Matrixbestandteile, aber auch durch nicht ausreichend stabile Analyten, erheblich beeinflusst werden. Es galt, die durch diese Einflüsse möglicherweise auftretenden Abweichungen, sofern noch nicht bekannt, festzustellen, indem die Stabilität des Kalibrierstandards in Lösung unter verschiedenen Lagerungsbedingungen und in der Matrix überprüft wurde. In der Literatur wurden bisher entsprechende Ergebnisse nicht beschrieben, so dass diese Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit durchzuführen waren. Die Entscheidung [2002/657/EG](#) schreibt für die Kalibrierstandards in Lösung Lagerungsbedingungen vor: Im Dunkeln bei -20 °C, 4 °C und 20 °C sowie im Hellen bei 20 °C. Die mit dem Analyten dotierte Matrix konnte bei -20 °C drei Wochen gelagert werden.

Die Aus- und Bewertung der Stabilitätsuntersuchungen erfolgte über die Signalintegration und den Flächenvergleich der verschiedenen Lagerungsbedingungen mit einem jeweils frisch hergestellten Standard. Vorteil dieser Art der Auswertung war, dass Fehler, die bei quantitativer Auswertung über eine Kalibrierkurve entstehen konnten, entfielen und Unterschiede zwischen den verschiedenen Lagerungsbedingungen zum jeweiligen Zeitpunkt gut erkannt werden konnten (Tabellen [5.21](#) und [5.22](#), Abbildungen [3.17](#) und [3.18](#)).

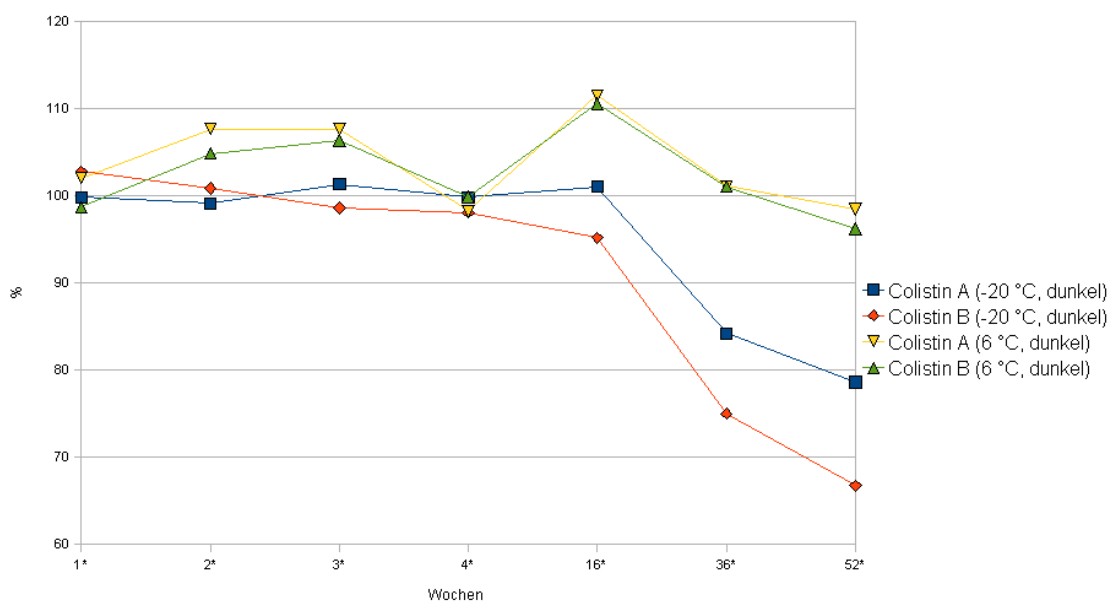


Abbildung 3.17: Grafische Darstellung der Stabilitätsuntersuchungen (a & b)

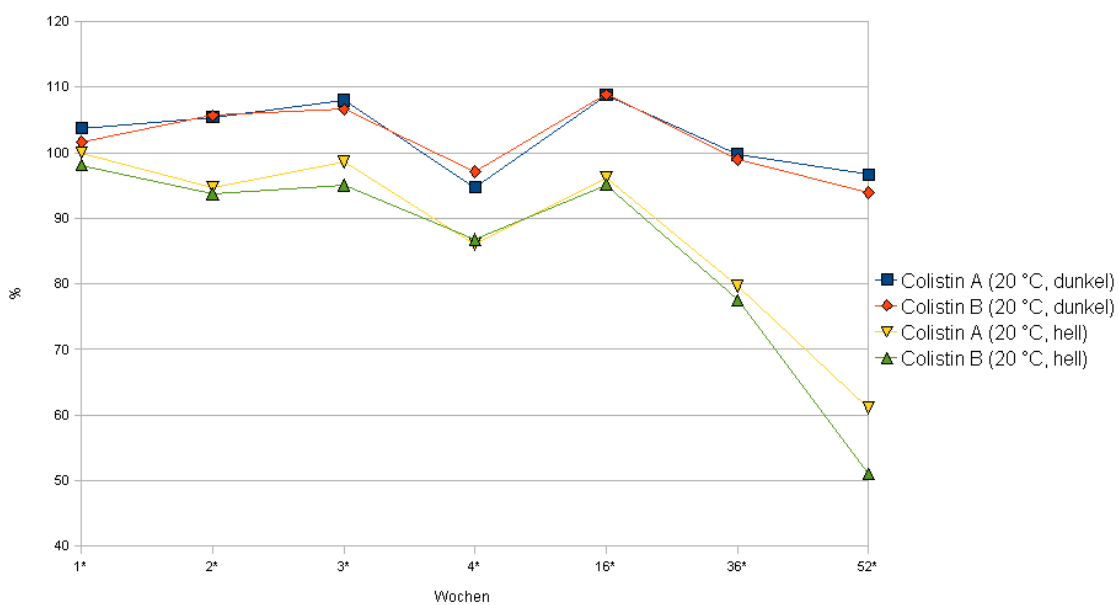


Abbildung 3.18: Grafische Darstellung der Stabilitätsuntersuchungen (c & d)

3 Ergebnisse

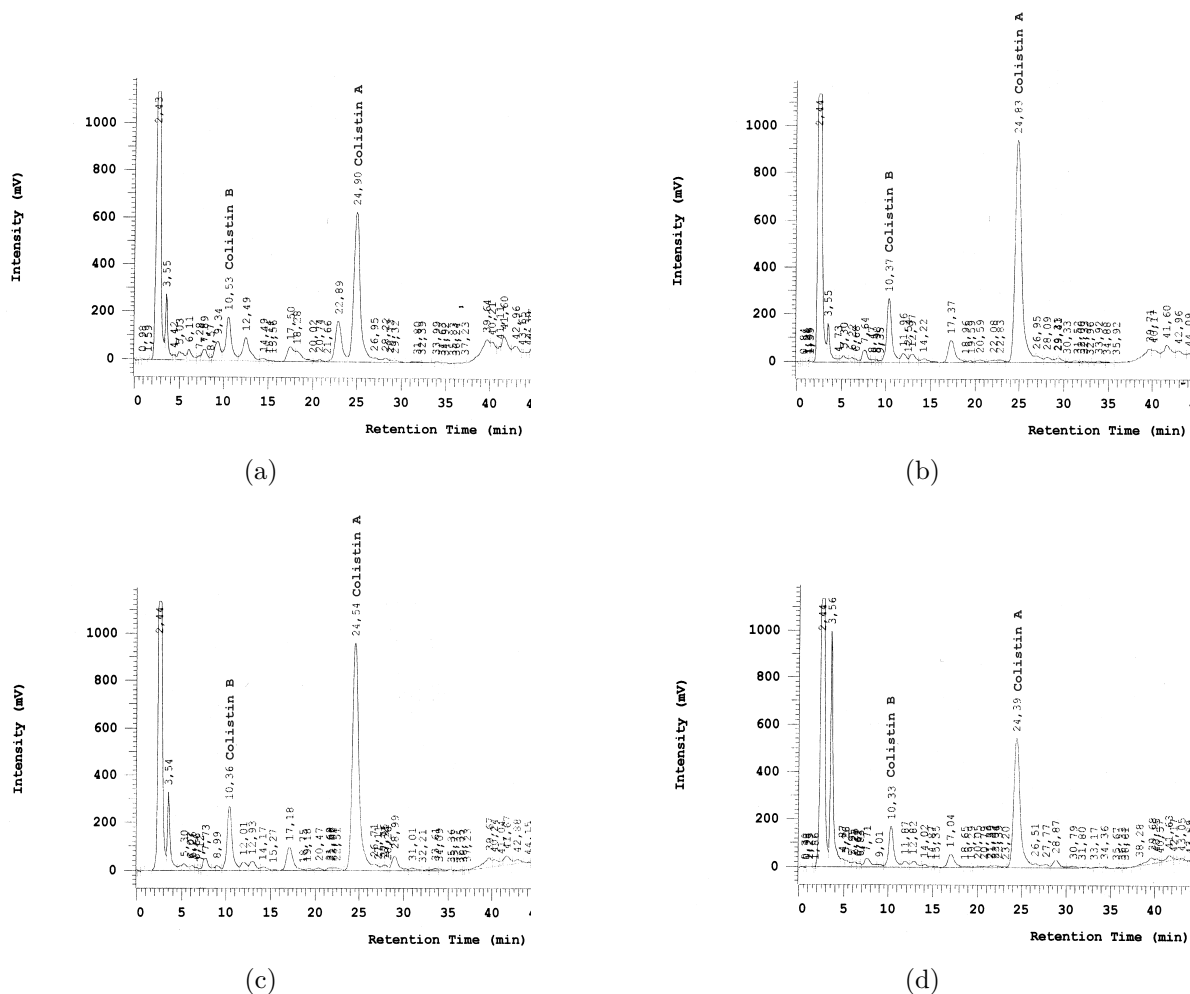


Abbildung 3.19: Chromatogramme von Colistin nach 52-wöchiger Lagerung (Stabilitätstest)

Lagerbedingungen: a) dunkel -20 °C; b) dunkel 6 °C; c) dunkel 20 °C; d) hell 20 °C

Chromatographische Bedingungen für LC-FLD-Bestimmung: Tabelle 5.6

Beim Colistinsulfat - gelöst in 0,01 M HCl - war bei 20 °C im Hellen bereits in der zweiten Woche ein Zerfall zu beobachten. Die Intensität der beiden Hauptkomponenten verringerte sich nach zwölf Monaten auf 61 % Colistin A bzw. 51 % Colistin B (Abbildung 3.19: d). Eine Farbänderung der Lösung war nicht zu beobachten. Bei der Lagerung bei 20 °C im Dunkeln konnten 97 % Colistin A und 94 % Colistin B gemessen werden. Allerdings war bei diesen Bedingungen die minimale Erhöhung eines Signals bei 28,9 Minuten zu sehen (Abbildung 3.19: c). Keine nennenswerte Abnahme konnte bei 6 °C im Dunkeln nach zwölf Monaten gemessen werden (Abbildung 3.19: b). Im Dunkeln bei -20 °C reduzierten sich die Analyten Colistin A auf 67 % und Colistin B auf 79 %. Hinzu

kam, dass bei diesen Bedingungen in der LC-Fluoreszenzdetektion die Zunahme von drei Minorkomponenten zu erkennen war (Abbildung 3.19: a).

Die massenspektrometrische Detektion sollte Aufschluss über die gebildeten Komponenten unter Lagerungsbedingungen A und C geben. Die bei 22,8 Minuten retenierende Komponente im Chromatogramm A (Abbildung 3.19: a) wurde bei der LC-MS-Messung nicht getrennt (Abbildung 3.20). Weiterhin wurden m/z -Verhältnisse von m/z 586 und m/z 595 (Tabelle 3.11) gemessen.

Tabelle 3.11: Komponenten des Colistinstandards nach 12-monatiger Lagerung im Dunkeln bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Retentionszeit	m/z	Komponente
13,8	579	Polymyxin E 2
14,0	586	nicht eindeutig identifizierbar
14,5	595	nicht eindeutig identifizierbar
14,9	586	Polymyxin E 1-Ile
15,5	586	Polymyxin E 1

Bei der Retentionszeit von 14,0 Minuten wurde der m/z Wert von 586 detektiert. Möglicherweise könnte es sich um methyliertes Polymyxin E 2 oder Polymyxin E 3 handeln. Dabei müsste die Methylierung dann an den Fettsäure-Positionen 2, 3, 4 oder 5 stattgefunden haben, da die Verbindung früher reternierte als Polymyxin E 1 oder Polymyxin E 1-Ile. Letztere tragen an der Fettsäure-Position 6 eine Methylgruppe. Welche Komponente als Methygruppen-Donor fungiert haben könnte, konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Die Verbindung mit m/z 595 bei 14,5 Minuten könnte auf eine Hydroxylierung der Fettsäurekette zurückzuführen sein. In der Literatur wird beim Colistin eine Komponente mit einer 3-Hydroxy-6-Methyloctansäure-Struktur beschrieben (GOVAERTS U. A. (2002)). Möglicherweise handelte es sich hier um die Hydroxylierung von Colistin A, was die Abnahme dieser Verbindung und die Erhöhung der Komponente mit m/z 595 erklären könnte. Für die beschriebenen Verbindungen fehlt die Bestätigung der Theorie mit Hilfe eines Referenzstandards.

Die mit der LC-Fluoreszenzmessung detektierte Verbindung bei 28,9 Minuten unter

den Lagerungsbedingungen C, konnte in der massenspektrometrischen Detektion nicht registriert werden, so dass auf diese Beobachtung nicht weiter eingegangen wurde.

Temperaturen von +6 °C oder +20 °C hatten keinen nennenswerten Einfluss auf die Stabilität von Colistinsulfat. Colistinsulfat, gelöst in 0,01 M salzsaure Lösung, war 52 Wochen bei 6 °C im Kühlschrank stabil. Wichtige Voraussetzung schien dabei die Dunkelheit zu sein. Tageslicht führte zur Abnahme der Konzentration aller Komponenten. Bei niedrigen Temperaturen von -20 °C war eine Erhöhung des Anteils einiger Minorkomponenten und der Zerfall der Hauptkomponenten zu beobachten.

Für die Stabilität von Colistin in Milch wurde eine garantiert rückstandsfreie Bio-Milch mit dem CR-Colistin-Standard dotiert (Konzentration von Colistin in der Milch: 1 µg/mL). Ein Aliquot der Probe wurde bei -20 °C gelagert. Die frisch dotierte Probe wurde aufgearbeitet (Abschnitt 5.3.6) und mittels LC-ESI-MS/MS vermessen. Das bei -20 °C gelagerte Aliquot wurde nach 24 Tagen analysiert. Eine Veränderung des Colistingehaltes konnte in dieser Zeit nicht beobachtet werden. Colistin war somit in der Matrix Milch bei -20 °C mindestens drei Wochen stabil.

3.5.2 Spezifität

Die Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, den Zielanalyten ohne Verfälschung durch strukturell ähnliche Stoffe (endogene Stoffe, Matrixbestandteile usw.) zu erfassen und ihn eindeutig zu identifizieren. Zur Ermittlung der Spezifität mussten Leerwertproben analysiert werden, um das Vorhandensein möglicher Störungen nachzuweisen und die Auswirkung dieser Störungen abzuschätzen. Dazu wurden 20 Leerwertproben entsprechend der Vorschrift (Abschnitt 5.4.2) aufgearbeitet und vermessen.

Zusätzlich wurden sechs Leerwertproben mit dem strukturell eng verwandten CR-Polymyxin B-Standard auf dem Konzentrationsniveau von 50 µg/L dotiert.

Das mit Colistin eng verwandte Polymyxin B beeinträchtigte oder beeinflusste die Identifizierung und auch die Quantifizierung von Colistin nicht. Die chromatographische Trennung der beiden Polypeptid-Antibiotika war möglich und mit massenspektrometrischer Detektion waren beide Substanzen eindeutig identifizierbar (Abbildung 3.21 c).

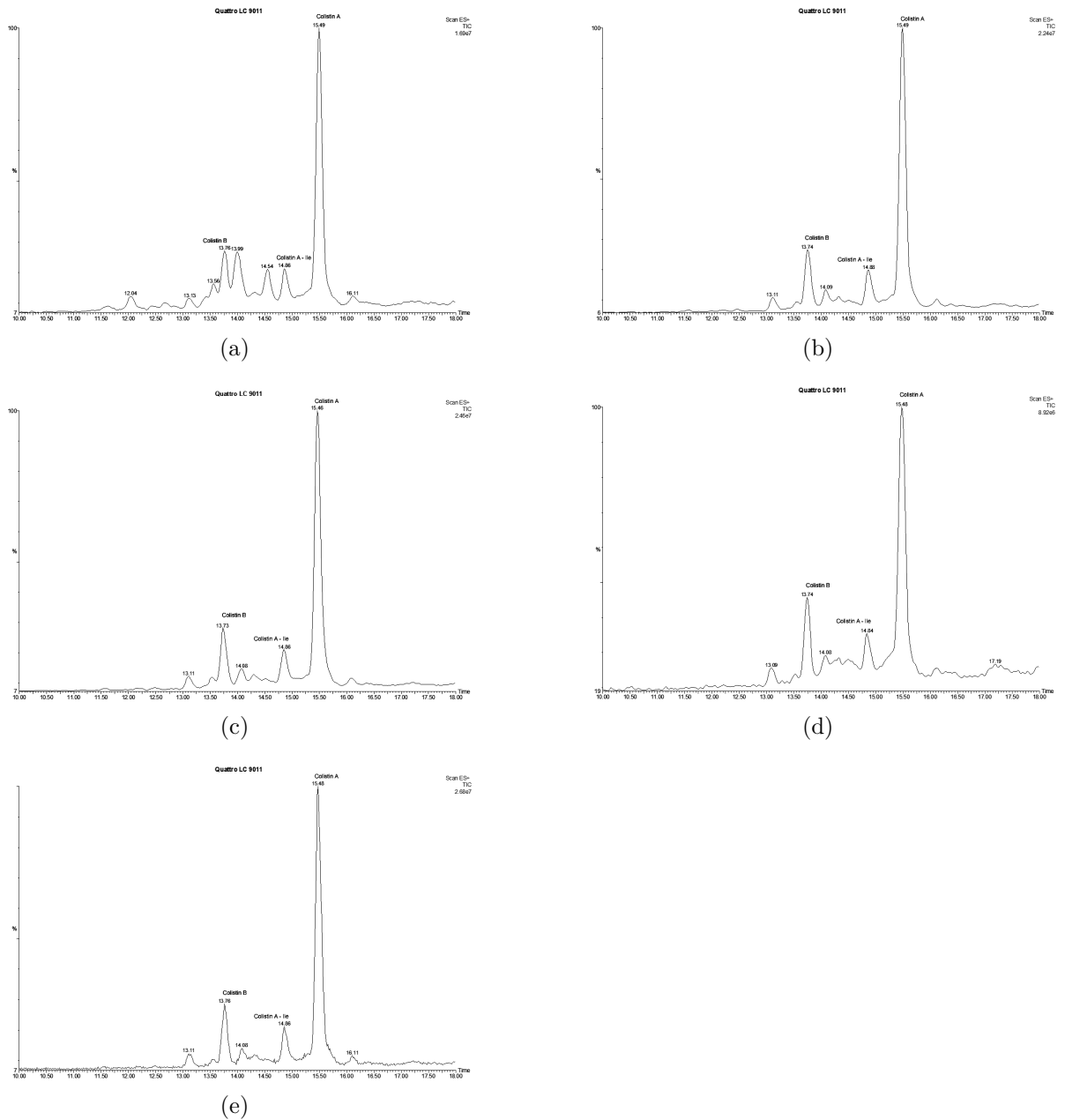
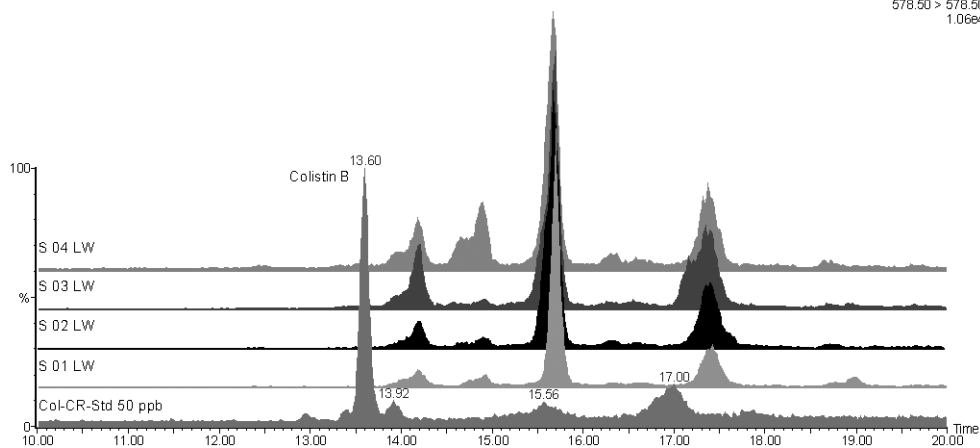


Abbildung 3.20: Chromatogramme der vier Colistinstandards nach 52-wöchiger Lagerung (Stabilitätstest) und eines frisch hergestellten Colistinstandards Lagerbedingungen: a) dunkel -20 °C; b) dunkel 6 °C; c) dunkel 20 °C; d) hell 20 °C; e) frisch Chromatographische Bedingungen für die LC-MS/MS-Bestimmung: Tabellen 5.12 und 5.15

3 Ergebnisse

Colistin CRS-Std 50 ppb
COL_VAL.332

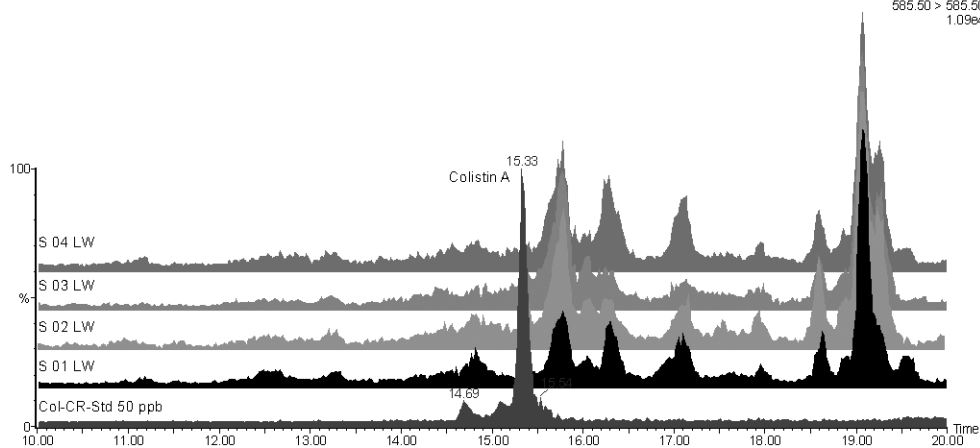
MRM of 3 Channels ES+
578.50 > 578.50
1.06e4



(a)

Colistin CRS-Std 50 ppb
COL_VAL.332

MRM of 3 Channels ES+
585.50 > 585.50
1.09e4



(b)

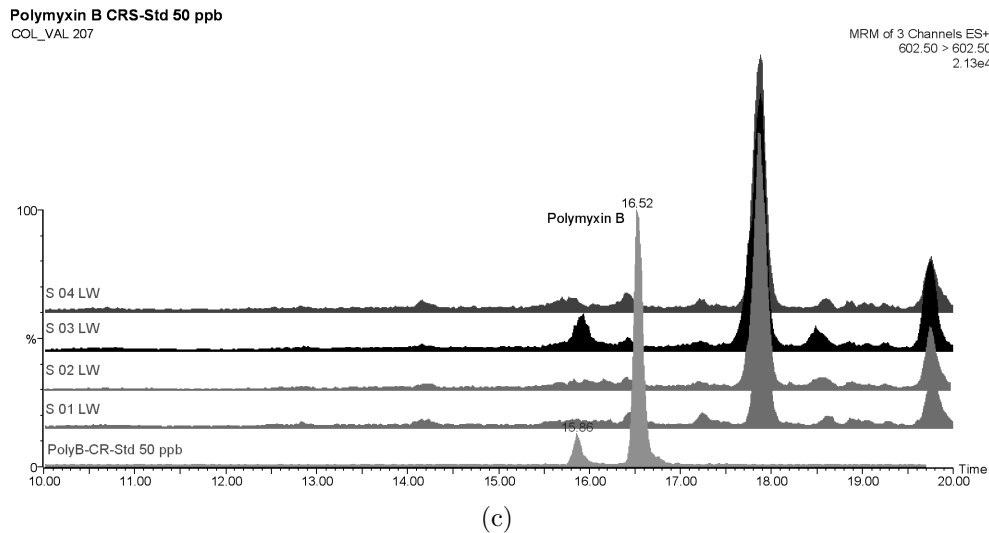


Abbildung 3.21: Chromatogramme von Leerwertproben und dem Colistin- bzw. Polymyxin B-CR-Standard

- a: MS/MS-Chromatogramme von vier unterschiedlichen Leerwertproben und einem Colistin-CR-Standard, m/z 579
- b: MS/MS-Chromatogramme von vier unterschiedlichen Leerwertproben und einem Colistin-CR-Standard, m/z 586
- c: MS/MS-Chromatogramme von vier unterschiedlichen Leerwertproben und einem Polymyxin B-CR-Standard, m/z 603

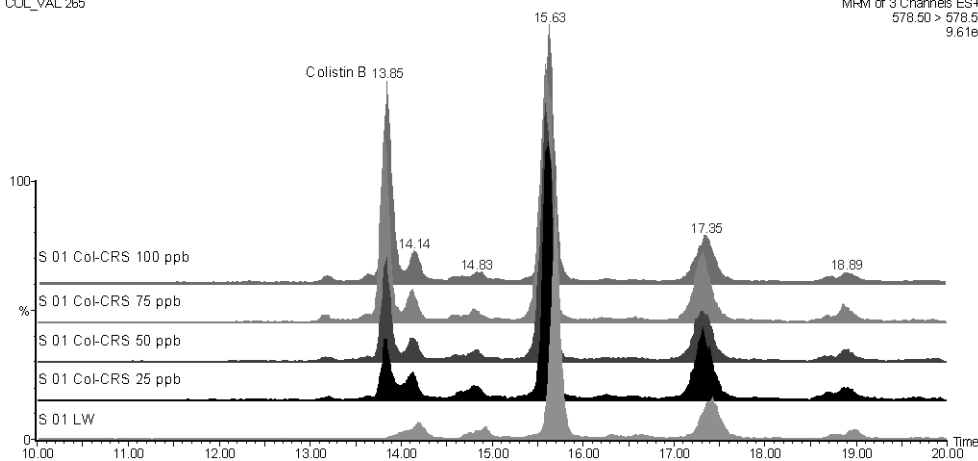
Chromatographische Bedingungen: Tabellen 5.12 und 5.15

Bei den analysierten Leerwertproben konnte eine Verbindung bei 15,7 Minuten mit m/z 586 gemessen werden, die unter den in Abschnitt 5.2.3 beschriebenen Bedingungen die Identifizierung und die Quantifizierung von Colistin A beeinflussen könnte (Abbildung 3.21 b). Zur Klärung wurden Leerwertproben mit dem CR-Colistin-Standard auf dem 0,5-, 1-, 1,5- und 2-fachen Niveau des zulässigen Grenzwertes dotiert (Abbildung 3.22). Diese konnten belegen, dass es sich bei der gemessenen Verbindung nicht um Colistin A handelte. Eine chromatographische Trennung mit entsprechender Auflösung war trotz mehrerer Gradientenveränderungen nicht möglich. Die Quantifizierung wurde schließlich unter den gegebenen Bedingungen manuell durchgeführt, ohne dass die registrierten Milchbestandteile einen nennenswerten Einfluss auf die Bestimmung hatten, was die Verhältnisse von Colistin A zu Colistin B belegten.

3 Ergebnisse

S 01 100 ppb
COL_VAL:265

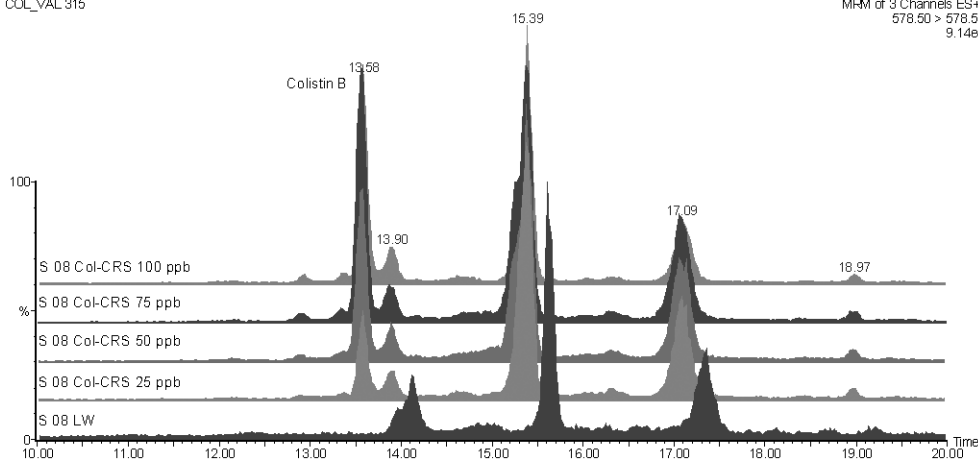
MRM of 3 Channels ES+
578.50 > 578.50
9.61e4



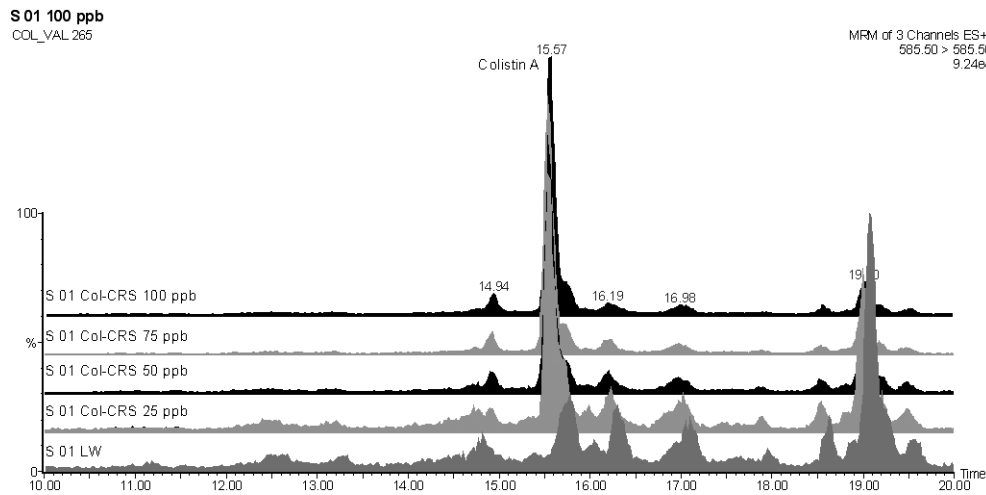
(a)

S 08 100 ppb
COL_VAL:315

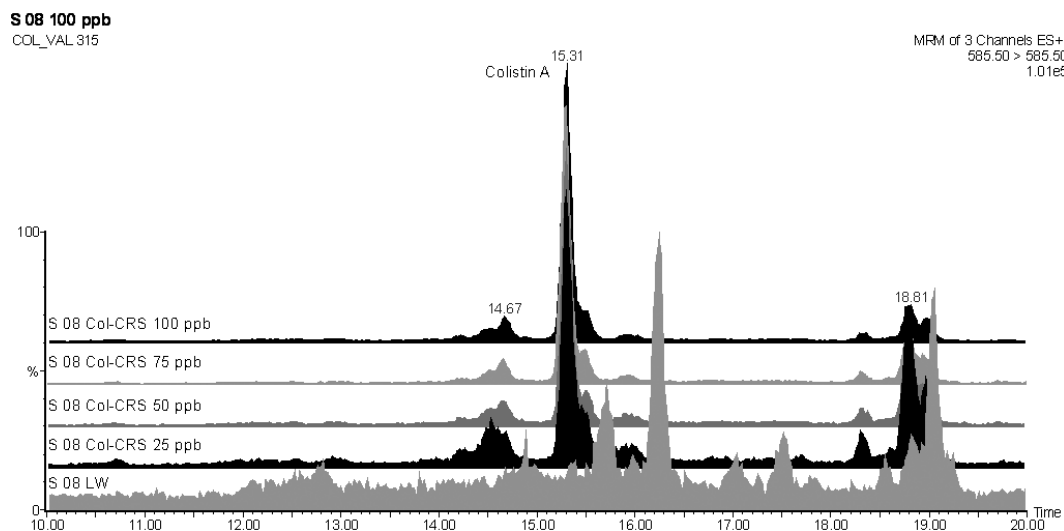
MRM of 3 Channels ES+
578.50 > 578.50
9.14e4



(b)



(c)



(d)

Abbildung 3.22: MS/MS-Chromatogramme von mit dem CR-Standard auf das 0-, 0,5-, 1-, 1,5- und 2-fache Niveau des zulässigen Grenzwertes dotierten Leerwertproben (a,b: m/z 579 und c,d: m/z 586)

Chromatographische Bedingungen: Tabellen 5.12 und 5.15

3.5.3 Richtigkeit

Die Richtigkeit ist ein Maß für systematische Abweichungen eines Messwertes von einem als richtig angesehenen Wert. Zur Bestimmung der Richtigkeit soll, sofern es zur Verfügung steht, zertifiziertes Referenzmaterial verwendet werden. Ist dies nicht der Fall, kann anstelle der Richtigkeit die Wiederfindung bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wiederfindung ermittelt (Abschnitt 3.5.5.2), da zertifiziertes Referenzmaterial nicht erhältlich war.

3.5.4 Versuchsplan

Bei dem angewandten alternativen Validierungsverfahren musste ein Versuchsplan erstellt werden, der die verschiedenen Untersuchungsfaktoren gleichzeitig berücksichtigte und den Konzentrationsbereich zweckentsprechend festlegte. Die verschiedenen Faktoren dienten der Robustheits-Bestimmung. Robustheit ist das Vermögen einer Methode, gleichbleibende Resultate unter variierenden Bedingungen zu erzielen. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Validierung Faktoren gewählt und variiert, die üblicherweise auch in einem Routinelabor auftreten. Ziel des Validierungsverfahrens war die Ermittlung der Auswirkungen der einzelnen Faktoren:

- Bearbeiter;
- Extraktionszeiten;
- Zentrifugierdauer;
- Unterbrechung vor SPE;
- unterschiedliche Chargen an Kartuschen.

Unterschiedliche Gründe können dazu führen, eine Aufarbeitung zu unterbrechen oder Extraktions- oder Zentrifugierzeiten nicht wie vorgeschrieben einzuhalten.

Ebenfalls ist es üblich, dass nicht nur ein Mitarbeiter im Routine-Labor die Analyse der Proben durchführt. Zwangsläufig ist im Laufe der Zeit auch der Einsatz unterschiedlicher Chargen an SPE-Kartuschen. Diese geringfügigen Änderungen sollten bei der Durchführung berücksichtigt werden. Größere Änderungen bezüglich Temperatur, verwendete Lösungsmittel, pH-Werte oder Säulenmaterial wurden bei der Methodenentwicklung geprüft. Die optimalen Bedingungen wurden in der Analysenvorschrift niedergelegt und

boten deshalb keinen Spielraum. Während der Methodenentwicklung ergab die Verwendung unterschiedlicher Chargen der stationären Phase (Säule) keinen nennenswerten negativen Einfluss, so dass dieser als geringfügiger Faktor keine Berücksichtigung fand.

Insgesamt sollten sieben Faktoren mit jeweils zwei Variationen (Level, Merkmalsausprägung) getestet werden, so dass $2^7=128$ Kombinationen zu untersuchen gewesen wären. Durch die faktorielle Kombination wurde der Umfang der zu untersuchenden Proben auf 32 reduziert (Tabelle 3.12). Die 32 aufzuarbeitenden Proben setzten sich aus acht Probenserien mit jeweils vier Konzentrationen (0,5-, 1-, 1,5- und 2-faches des zulässigen Grenzwertes) zusammen. Insgesamt wurden dabei sieben Faktoren variiert.

Die Ergebnisse dieser Messungen dienten der Berechnung folgender Leistungsmerkmale:

- Entscheidungsgrenze $CC\alpha$;
- Nachweisvermögen $CC\beta$;
- Wiederfindung;
- Wiederholpräzision bzw. Wiederholstandardabweichung pro Konzentrationsstufe;
- laborinterne Reproduzierbarkeitsstandardabweichung pro Konzentrationsstufe;
- Robustheit kleinerer Änderungen;
- Auswirkungen der einzelnen Faktoren auf die Messergebnisse;
- acht probenbezogene Kalibrierkurven und eine Gesamtkalibrierkurve;
- Vorhersageintervall der Gesamtkalibrierkurve;
- matrixinduzierte Abweichungen;
- lafinduzierte Abweichungen;
- Gütekurve.

Tabelle 3.12: Faktor-Level-Kombinationen

Lauf	Mitarbeiter	E1 ¹¹ [min]	Z1 ¹² [min]	E2 ¹¹ [min]	Z2 ¹² [min]	Unterbrechung vor SPE	Charge
S01	Lab	15	20	10	20	Nein	2
S02	Lab	15	30	10	30	Ja	1
S03	Lab	20	20	15	20	Ja	1
S04	Lab	20	30	15	30	Nein	2
S05	Aut	15	20	15	30	Nein	2
S06	Aut	15	30	15	20	Ja	1
S07	Aut	20	20	10	30	Ja	1
S08	Aut	20	30	10	20	Nein	2

3.5.5 Ergebnisse

Die errechneten Konzentrationen an Colistin (Abschnitt 5.4.5) wurden in die Software *InterVal* transferiert und dort mittels der gewichteten Konzentration ausgewertet. Für die weitere statistische Auswertung wurde zunächst auf Ausreißer getestet. Der Ausreißertest nach GRUBBS ermittelte aus allen Daten diejenigen Werte mit der größten Differenz zum Mittelwert. Ergänzend dazu wies der Ausreißertest nach COCHRAN Ausreißer innerhalb einer Serie aus (Prüfung der Varianzen auf Homogenität). Bei den gemessenen Daten wurden keine Ausreißer ermittelt, so dass in die weitere Auswertung alle gemessenen Daten einfließen, um die nach der Entscheidung [2002/657/EG](#) geforderten Leistungsmerkmale zu ermitteln.

Zu den allgemeinen Leistungskriterien zählten vorgegebene Toleranzen für Retentionszeiten bei der Flüssigchromatographie und für Ionenintensitäten bei der Massenspektrometrie. Die Retentionszeit des Analyten in der Analysenprobe muss mit einer Toleranz von $\pm 2,5\%$ derjenigen des Kalibrierstandards entsprechen. Zusätzlich müssen die Ionenintensitäten der einzelnen Fragmentionen im Vergleich zu denjenigen im Kali-

¹¹E1 = Extraktionszeit 1, E2 = Extraktionszeit 2

¹²Z1 = Zentrifugierdauer 1, Z2 = Zentrifugierdauer 2

brierstandard innerhalb der vorgegebenen Intensitäten von $\pm 20\%$ (bei Intensitäten des Basispeaks von $> 50\%$) liegen.

Die Retentionszeiten der Analyten bewegten sich bei den CR-Standards in Lösung zwischen 13,5 - 14,0 Minuten für Colistin B und zwischen 15,3 - 15,7 Minuten für Colistin A. Die Retentionszeiten für die beiden Analyten in den Analysenproben befanden sich alle im geforderten Bereich von $\pm 2,5\%$ (Tabelle 5.30).

Wie bereits im Abschnitt 3.3 erläutert, dienten aufgrund der massenspektrometrischen Möglichkeiten die Vorläufer-Ionen (m/z 579 und m/z 586) gleichzeitig als diagnostische Molekülionen. Aus diesem Grund konnte im vorliegenden Fall nur das Verhältnis der Molekülionen Colistin A und Colistin B als modifiziertes Leistungskriterium zu Grunde gelegt werden (Tabelle 5.29). Das berechnete Verhältnis von Colistin A zu Colistin B im CR-Standard lag bei 1,31. Die gemessenen Verhältnisse bewegten sich zwischen 1,09 und 1,41 und lagen damit im vorgegebenen Toleranzbereich von $\pm 20\%$ (1,05 - 1,57).

3.5.5.1 Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen

Die Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ für Colistin in Milch liegt bei $43,4 \mu\text{g}/\text{kg}$. Dies ist der Wert, bei dem die gesetzlich festgelegte Höchstmenge mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 95% überschritten ist. Definitionsgemäß liegt der Wert für das Nachweisvermögen $CC\beta$ mit $51,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ höher als die Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ (Tabelle 3.13). Tabelle 3.14 enthält die Ergebnisse der Messungen einschließlich der Achsenabschnitte und der Steigungen.

Tabelle 3.13: Informationen zur Validierung

$CC\alpha$:	$43,4 \mu\text{g}/\text{kg}$
$CC\beta$:	$51,3 \mu\text{g}/\text{kg}$
MRL-Wert:	$39 \mu\text{g}/\text{kg}$

Tabelle 3.14: Ergebnisse der Bestimmung von Colistin in Milch

Lauf	CL ¹³ 1	CL 2	CL 3	CL 4	Achsenabschnitt	Steigung
Gesamtkalibrier- kurve	19,5	39,0	58,4	77,9	-0,22	1
S01	18,3	39,5	59,9	79,7	-1,06	1,07
S02	19,1	39,8	58,9	75,9	0,50	0,98
S03	19,3	40,1	62,6	81,2	-1,49	1,07
S04	19,2	40,5	61,5	74,1	1,26	0,98
S05	22,7	40,5	58,3	72,5	6,23	0,87
S06	17,6	35,1	54,5	82,9	-4,79	1,08
S07	18,1	35,3	54,9	72,3	-0,34	0,93
S08	18,9	42,1	62,6	80,4	-0,27	1,05

3.5.5.2 Wiederfindung

In der Analytik sollen die Fehler, die durch das Miterfassen von in der Probenmatrix enthaltenden Substanzen oder die durch die Beeinflussungen der Signalintensitäten durch die Matrixbestandteile entstehen, so gering wie möglich sein. Die Überprüfung des Verfahrens auf Matrixeinflüsse erfolgte über die Bestimmung der Wiederfindung. In diesem Fall ersetzte diese auch die Bestimmung der Richtigkeit und damit die Ermittlung systematischer Fehler. Die Wiederfindungsrate wurde über eine Matrixkalibriergerade ermittelt und liegt zwischen 99,3% und 100,2% (Tabelle 3.15).

Unabhängig davon zeigte ein Vergleich der Matrixkalibriergeraden mit einer Kalibriergeraden in Lösungsmittel signifikante Signalerhöhungen, die auf Matrixeffekte zurückzuführen waren. Mit steigender Colistin-Konzentration in Milch nahm die Signalerhöhung insgesamt ab. Auf dem Konzentrationsniveau von 19,5 $\mu\text{g/L}$ lag die Erhöhung um den Faktor 4,5 und bei 77,9 $\mu\text{g/L}$ um den Faktor 2.

¹³CL = Konzentrationslevel [$\mu\text{g/kg}$]

Tabelle 3.15: Wiederholpräzision, “In-house”-Reproduzierbarkeit und Wiederfindung

Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	S_r ¹⁴ [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	RSD [%]	S_{wR} ¹⁵ [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	RSD [%]	WDF [%]
19,5	1,5	7,9	2,1	10,9	99,3
29,2	1,8	6,0	2,1	7,3	99,7
39,0	1,9	4,9	2,3	5,9	99,9
48,7	2,1	4,2	2,6	5,3	100,0
58,4	2,2	3,7	2,9	5,0	100,1
68,2	2,3	3,3	3,4	4,9	100,1
77,9	2,4	3,1	3,8	4,9	100,2

3.5.5.3 Wiederholstandardabweichung und laborinterne Reproduzierbarkeitsstandardabweichung

Unter Präzision versteht man den Grad an Übereinstimmung zwischen unabhängigen Testergebnissen, die unter festgesetzten (vorgegebenen) Bedingungen erzielt werden. Dabei wird das Präzisionsmaß normalerweise als Unpräzision ausgedrückt und als Standardabweichung des Ergebnisses berechnet. Eine geringere Präzision ist durch eine größere Standardabweichung gekennzeichnet. Die Wiederholpräzision ist die Präzision unter Wiederholbedingungen. Dabei sind Wiederholbedingungen die Anforderungen, unter denen voneinander unabhängige Messergebnisse mit derselben Methode, identischem Probenmaterial, demselben Gerät und demselben Analytiker erzielt werden. Die laborinterne Reproduzierbarkeit (laborinterne Vergleichspräzision) ist die Präzision unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen. Die Messergebnisse werden in ein und demselben Labor mit der selben Methode unter vorgegebenen variierenden Bedingungen (Probenmatrix, Untersucher, Umgebung) erzielt.

InterVal berechnet in Abhängigkeit von der Konzentration die Wiederholstandardabweichung und die laborinterne Reproduzierbarkeitsstandardabweichung sowie die jeweiligen relative Standardabweichungen (Variationskoeffizienten) (Tabelle 3.15). Mit zuneh-

¹⁴ S_r =Wiederhol-Standardabweichung

¹⁵ S_{wR} =laborinterne Reproduzierbarkeitsstandardabweichung

3 Ergebnisse

mender Colistin-Konzentration stiegen die Wiederhol- bzw. die laborinterne Reproduzierbarkeitsstandardabweichungen systematisch an, die jeweiligen Variationskoeffizienten nahmen entsprechend ab. Die laborinterne Reproduzierbarkeitsstandardabweichung war höher als die Wiederholstandardabweichung, da sie zusätzlich die Streuung der Kalibriergeraden und die Schwankungen von Lauf zu Lauf beinhalteten. Die zugrunde liegenden Berechnungen basierten auf algorithmischen Anpassungen, die in der Literatur (JÜLICHER U. A. (1998, 1999)) beschrieben sind.

3.5.5.4 Messunsicherheiten innerhalb des validierten Kalibrierbereiches

Die relativen Wiederhol- und die relative laborinternen Reproduzierbarkeitsstandardabweichungen nahmen mit zunehmender Colistin-Konzentration ab (Abbildung 3.23). Analog zur Standardabweichung (Wiederhol- und laborinterner Reproduzierbarkeit) lag die relative Messunsicherheit der Kalibrierung über derjenigen der Wiederholbarkeit. Die Unsicherheit der systematischen Fehler wird in *InterVal* bereits in der Messunsicherheit der Kalibrierung berücksichtigt.

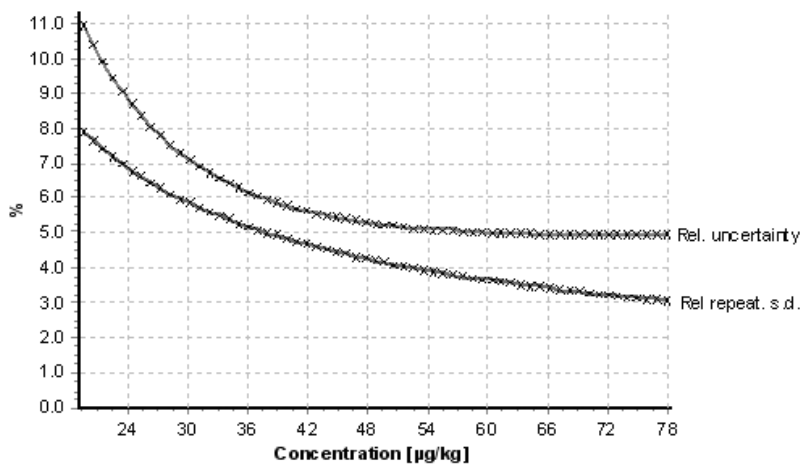


Abbildung 3.23: Messungenauigkeiten innerhalb des validierten Kalibrationsbereiches

3.5.5.5 Probenbezogene Kalibrierkurven, Gesamtkalibrierkurve und Vorhersageintervall der Gesamtkalibrierkurve

Abbildung 3.24 zeigt die acht probenbezogenen Kalibrierkurven, die Gesamtkalibrierkurve und das Vorhersageintervall der Gesamtkalibrierkurve. Das Vorhersageintervall gab den Bereich an, in dem der tatsächliche Wert mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 95 % liegt. Diese Abbildung zeigt auch, dass keine Ausreißer vorhanden waren.

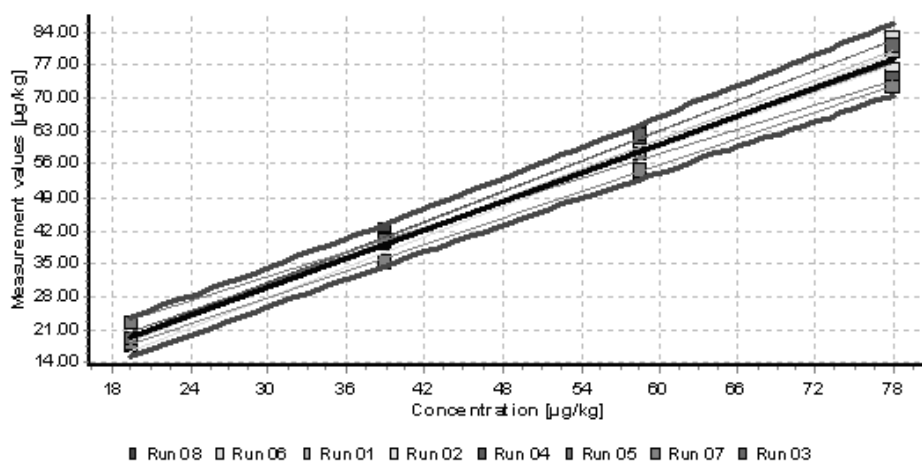


Abbildung 3.24: Gesamtkalibrierkurve, acht probenbezogene Kalibrierkurven und Vorhersageintervall der Gesamtkalibrierkurve

3.5.5.6 Robustheit und Auswirkung der einzelnen Faktoren auf die Messergebnisse

Die Robustheit einer Methode beschreibt deren Fähigkeit gleich bleibende Messergebnisse unter variierenden Bedingungen - wie verschiedene Matrices oder Spezies - zu erzielen. Variiert wurden in der vorliegenden Arbeit Faktoren, die üblicherweise auch in einem Routinelabor auftreten (siehe auch Abschnitt 3.5.4). Die zufälligen und systematischen Effekte der jeweiligen Faktoren auf die Messergebnisse sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst. Die Wiederfindung beim zweiten Zentrifugierschritt wich 12,76 % von der mittleren Standardabweichung (*proportional deviation*) und 4,06 % vom Mittelwert (*constant deviation*) ab. Damit hatte dieser Aufarbeitungsschritt den größten Einfluss auf die Messergebnisse. Werte unter 5 % sind üblicherweise nicht relevant und bis zu 15 % akzeptabel.

Tabelle 3.16: Effekte der einzelnen Faktoren

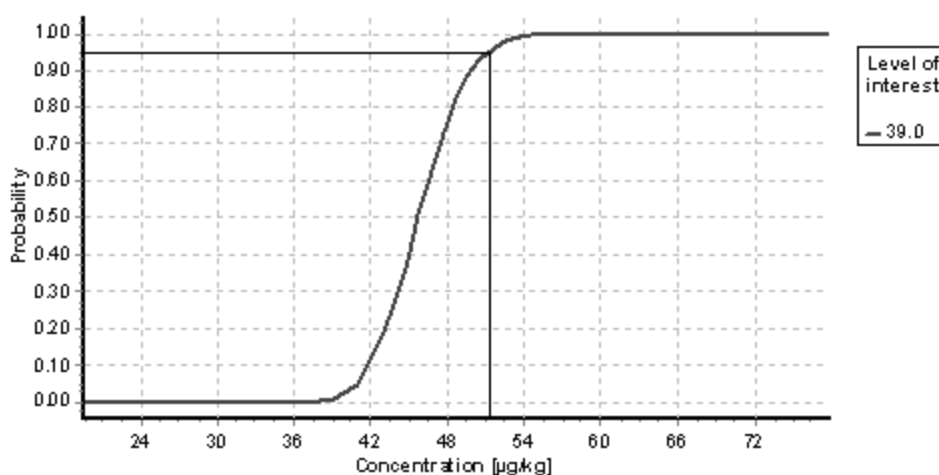
Faktor	Level +	Level -	Proportional deviation	Constant deviation
Bearbeiter	Lab	Aut	3,53	2,60
Extraktionsdauer 1	15 Minuten	20 Minuten	-1,72	-0,94
Zentrifugierdauer 1	20 Minuten	30 Minuten	-4,31	-1,02

Tabelle 3.16: Effekte der einzelnen Faktoren

Faktor	Level +	Level -	Proportional deviation	Constant deviation
Extraktionsdauer 2	10 Minuten	15 Minuten	1,21	-0,93
Zentrifugierdauer 2	20 Minuten	30 Minuten	12,76	4,06
Unterbrechung vor SPE	Unterbrechung: ohne	Unterbrechung: mit	-2,45	2,94
Charge der Kartuschen	Charge 1	Charge 2	1,18	-4,00

3.5.5.7 Gütekurve

Die Gütekurve beschreibt den Zusammenhang zwischen der Analytkonzentration und der Wahrscheinlichkeit, die Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ zu überschreiten (Abbildung 3.25). Für die erarbeitete Untersuchungsmethode besteht bei einer Konzentration von $51,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Nachweisvermögen) eine Restwahrscheinlichkeit von 5 %, dass eine falsche Entscheidung getroffen würde. Die Gütekurve zeigt einen optimalen Verlauf, da der Konzentrationsbereich zwischen Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen relativ eng beieinander liegt.

**Abbildung 3.25:** Gütekurve

4 Diskussion

4.1 Colistin-Standard

In der Analytik bilden Standards die Basis zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Substanzen. Eine wichtige Voraussetzung für Vergleiche in der Analytik sind daher einheitliche Standards. Colistin ist ein zyklisches Polypeptid-Antibiotikum, wird von *Paenibacillus polymyxa* var. *colistinus* (synonym: *Bacillus polymyxa*) produziert und setzt sich aus einer komplexen Mischung ähnlich strukturierter Komponenten zusammen.

Die Herausforderung bei der quantitativen Bestimmung des Gehaltes an Colistin bestand in der Trennung dieser komplexen Mehrkomponentenmischung. Zur Quantifizierung von Colistin wird entgegen der Vorgaben der VO (EWG) 2377/90 die Summe der beiden Hauptkomponenten Colistin A und Colistin B zu Grunde gelegt (EMEA (2002)). Voraussetzung für die quantitative Bestimmung mittels Chromatographie ist das Vorliegen eines entsprechenden Standards mit definierter Zusammensetzung. Der bis zum jetzigen Zeitpunkt einzige vorliegende kommerziell erhältliche HPLC-Referenzstandard stammt von der Europäischen Arzneibuch-Kommission in Straßburg. In diesem zertifizierten Referenzstandard sind fünf Komponenten mit ihrem Anteil angegeben, wobei die Summe dieser Komponenten 86,9% beträgt. Die beiden Hauptkomponenten Colistin A (44,2%) und Colistin B (33,7%) sind in der Summe anteilig mit 77,9% (PHARMACOPOEIA (2004)) vorhanden.

Zusätzlich war zu berücksichtigen, dass es sich bei diesem zertifizierten Standard nicht um die reine Colistinbase handelte, sondern um das Sulfatsalz. Ein genau definierter Sulfat-Anteil war nicht angegeben. Die Monographie enthält die Information, dass der Sulfat-Anteil pro Mol im Mittel 1,95 Mol Sulfat-Ionen beträgt. Unter Beachtung dieser Maßgaben galt es, die Quantifizierung von Colistin durchzuführen.

Zur Bearbeitung dieses Problems wurden die Bedingungen, unter denen das Verfahren zur Höchstmengenfestsetzung im Rahmen der Europäischen Gemeinschaft zugelassen wurde, betrachtet. Einerseits wurde hierbei der Gehalt an Sulfat nicht mit einbezogen, andererseits basierte die Quantifizierung bei der LC-Bestimmung auf einem mikrobiolo-

gischen Standard.

Ausgehend von diesen Tatsachen und unter Berücksichtigung der zuvor genannten Vorgaben, beruht die Berechnung des Gesamt-Colistingehaltes in dieser Arbeit auf folgende Annahmen:

- der Sulfatgehalt fließt in die Berechnung nicht mit ein, da in den Monographien für den mikrobiologischen und für den HPLC-Standards ein nahezu gleicher mittlerer Gehalt an Sulfat angegeben wird;
- der Gehalt an Colistin wird über die Summe von Colistin A und Colistin B kalkuliert unter der Berücksichtigung, dass deren Anteil 77,9% beträgt. Die weiteren Komponenten des Colistins fließen in die Berechnung nicht mit ein. Daraus lässt sich aus der Rückstandshöchstmenge von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Colistin in Milch der Wert von 39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Colistin (Summe aus Col A und Col B) in Milch ableiten.

In der Literatur erwähnen [WAN U. A. \(2006\)](#), [GMUR U. A. \(2003\)](#) und [DECOLIN U. A. \(1997\)](#) die Problematik bei der Berechnung der Colistin-Konzentration. Der Sulfatgehalt wird in keiner der genannten Veröffentlichungen berücksichtigt. Alle aufgeführten Autoren, die mittels Flüssigchromatographie arbeiten (Tabelle 1.6), wählen den Weg, den Gehalt an Gesamt-Colistin über die Summe von Colistin A und Colistin B zu berechnen. Dabei wird die Summe von Colistin A und Colistin B dem Gesamt-Colistingehalt gleich gesetzt, was auf der Basis des mikrobiologischen Standards nachvollziehbar erscheint, da keine weiteren Angaben vorliegen. Eine Ausnahme machten [GMUR U. A. \(2003\)](#). Hier war die Referenzsubstanz ein kommerziell erhältlicher Polymyxin E 1-Standard (Colistin A), dessen Quelle nicht auffindig gemacht werden konnte.

In der Humanmedizin können sowohl Colistinsulfat- als auch Colistinmethansulfonat-Präparate zur Behandlung cystischer Fibrose eingesetzt werden. Zur Vergleichbarkeit der eingesetzten Dosis wird diese in Internationalen Einheiten (IU) angegeben. Verschiedene Autoren stellen in der neueren Literatur fest, dass diese Angaben nicht bei allen Präparaten zutreffend sind und fordern deshalb eine einheitliche Regelung zur Vergleichbarkeit der Wirkung ([FALAGAS U. KASIAKOU \(2006B\)](#); [LI U. A. \(2006\)](#)). Die Forderung nach definierten Colistin-Standards betrifft nicht nur den Human- sondern auch den Veterinärbereich.

Im Hinblick auf eine Optimierung bei der Quantifizierung wären nicht nur reine Einzelkomponenten-Standards erforderlich, sondern auch eine Konkretisierung des Marker-Rückstands in der EU-Verordnung (VO ([EWG](#)) 2377/90). Solange diese Angaben nicht präziser erfolgen, ist eine Quantifizierung in der beschriebenen Weise durchführbar.

4.2 Analytische Methode zur LC-Trennung mittels Fluoreszenzdetektion von Colistin

In der Literatur erläutern [DECOLIN U. A. \(1997\)](#), [MOROVJÁN U. A. \(1998\)](#), [CANCHO GRANDE U. A. \(2001\)](#), [GMUR U. A. \(2003\)](#), [SUHREN U. KNAPPSTEIN \(2005\)](#), [Sin u. a. \(2005\)](#) und [WAN U. A. \(2006\)](#) LC-Verfahren mit Fluoreszenz- (Nach- oder Vorsäulenderivatisierung) oder MS-Detektoren zur Bestimmung von Colistin in tierischer Matrix oder in Futtermitteln. Es gelang im Rahmen dieser Arbeit - unter Modifizierung des Fließmittels - ein LC-Verfahren mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion zu etablieren, das für die Bestimmung der Stabilitätsversuche eingesetzt wurde. Die Probenmatrix Milch konnte allerdings mit der eingeführten Methode (Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion) chromatographisch nicht optimal vom Analyten Colistin abgetrennt werden, so dass dadurch die erforderliche Empfindlichkeit und Spezifität nicht erreicht wurde.

4.2.1 Einfluss der Trennsäule und der Fließmittel

Eine Trennung der Colistin-Komponenten war - unabhängig von der anschließenden Detektionsart - Grundlage für die Quantifizierung von Colistin über Colistin A und Colistin B, zumal einige Minorkomponenten die gleiche molare Masse besitzen (Abschnitt 1.2). Von den getesteten Phasenmaterialien erwiesen sich die verwendeten Säulen „Zorbax SB C8“, „LiChroCART Superspher 100 RP18“, „Inertsil ODS 3 C18“, „Pron-tosil 300 C30“ und „Jupiter Proteo C12“ prinzipiell als geeignet. Die Selektivität der Trennung der Colistin-Komponenten ist bei den Säulen verschiedener Hersteller und unterschiedlicher Materialien wie C8, C12, C18, C30 mit oder ohne *endcapping*, unterschiedlicher Porengröße oder Oberfläche meist sehr ähnlich. Die Chromatographie findet wegen der Stabilität von Colistin bei einem pH-Wert ≈ 2 statt, so dass Voraussetzung für alle Säulen die Stabilität im sauren pH-Bereich war. Informationen hierüber wurden für die „LiChroCART Superspher 100“ C18-Säule nicht angegeben, weshalb diese nicht weiter verwendet wurde. Die „Jupiter Proteo C12“-Phase ist speziell für die Bestimmung von Peptiden entwickelt und hat das Vermögen, Mischungen mit einer Differenz von nur einer oder zwei Aminosäuren trennen zu können. Die mit der „Jupiter Proteo C12“-Säule erzielten Ergebnisse konnten ohne großen Aufwand optimiert werden, so dass diese Säule letztlich standardmäßig verwendet wurde.

Geeignete Fließmittel für die Peptid- und Proteinanalytik in Verbindung mit der Elek-

troscopy-Ionisierung sind Acetonitril und Trifluoressigsäure, Ammoniumformiat oder Ammoniumacetat. Die beiden zuletzt genannten Ionenpaarreagenzien sind für die Fluoreszenzdetektion in Kombination mit dem Derivatisierungsreagenz OPA nicht geeignet, deshalb wurde letztlich Trifluoressigsäure als Ionenpaarreagenz verwendet. Zu dem Zeitpunkt lagen Ergebnisse bezüglich der MS-Experimente noch nicht vor, so konnte das Ziel - eine Aufarbeitung und chromatographische Trennung - weiter verfolgt werden. Unter isokratischen Bedingungen war eine ausreichende Trennung der wesentlichen Komponenten nicht erreichbar. Die Gradientenelution brachte somit nicht nur Vorteile für eine bessere Selektivität, sondern auch für eine Trennung von matrixreichen Extrakten. Die optimale Elution erfolgte letztendlich mittels eines ACN/H₂O-Gradienten unter Verwendung von TFA als Additiv zu beiden Phasen sowie dem Derivatisierungsreagenz OPA/2-Mercaptoethanol. Es gelang eine Optimierung der Konzentration des an der Derivatisierungsreaktion beteiligten 2-Mercaptoethanols. Experimente hinsichtlich der Variation des Thiols wurden nur ansatzweise durchgeführt, dabei 2-Mercaptoethanol durch Ethanthiol ersetzt. In der Literatur wird überwiegend die Stabilität der Isoindolderivate, die sich mit zunehmender Verzweigung der Thiole erhöht, beschrieben ([SIMONS U. JOHNSON \(1977, 1978\)](#); [LINDROTH U. MOPPER \(1979\)](#); [STOBAUGH U. A. \(1983\)](#)). Aufgrund der geringen Aussichten, den notwendigen Konzentrationsbereich zu erreichen, und die schon allein wegen der Erreichung der Identifizierungspunkte erforderliche massenspektrometrische Detektion, ist dieser Ansatz nicht weiter optimiert und verfolgt worden. Insgesamt konnte die Sensitivität im Vergleich zu dem herkömmlich verwendeten basischen Ionenpaarreagenz Triethanolamin in Verbindung mit Phosphatpuffern und den verwendeten Derivatisierungsreagenzien OPA und 2-Mercaptoethanol gesteigert werden.

4.2.2 Anwendbarkeit der Methode

Die eingeführte Methode mittels Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion trennt die für die Quantifizierung wesentlichen Hauptkomponenten von den Nebenkomponten. Die erreichte Nachweisgrenze war allerdings nicht ausreichend, um in der proteinreichen Matrix Milch Colistin A und Colistin B detektieren zu können. Im Hinblick auf die Erreichung der erforderlichen Identifizierungspunkte war der Einsatz des Massenspektrometers unumgänglich. Die beschriebene Fluoreszenz-Methode ermöglichte allerdings die erfolgreichen Untersuchungen für den Stabilitätstest (Abschnitte [3.5.1](#) und [5.4.1](#)).

4.3 Analytische Methode zur LC-Trennung und massenspektrometrischer Detektion von Colistin

4.3.1 ESI-MS/MS

Bei der Kopplung von Flüssigchromatograph und Massenspektrometer mit einem Elektrospray-Interface wird die Ionisation und Fragmentierung eines Analyten in der Quelle u. a. durch das dort anliegende Ionisations-Potential, die Zusammensetzung des Fließmittels sowie die Struktur und die funktionellen Gruppen des Analyten beeinflusst.

Der Zusatz organischer Lösungsmittel zum Eluenten verbessert die Ionisation, indem es die Oberflächenspannung senkt. Somit entstehen kleinere Tröpfchen, die auf Grund des geänderten Oberflächen-Volumen-Verhältnisses zu einer erhöhten Verdunstung des Lösemittels führen. Mit Acetonitril als organischer Komponente wurde im Vergleich zu Methanol die beste Spraystabilität erreicht.

Zur Steigerung der Ionisationseffizienz hat die Verwendung von Ammoniumsalzen beigetragen, die im Vergleich zur Trifluoressigsäure einen höheren Siedepunkt aufweisen. Die Ionisierung erfolgt durch die angelegte Spannung von 2kV und die Anlagerung von Protonen aus dem protonenhaltigen Lösungsmittel, die bevorzugt an den basischen L-2,4-Diaminobuttersäuren von Colistin stattfindet.

Die Signalintensität wird zusätzlich auch vom strukturellen Aufbau des Analyten beeinflusst. Dabei wird die Bildung der Gasphasenionen durch den hydrophoben Charakter von Peptiden beträchtlich geprägt. Im Vergleich zu hydrophilen sind hydrophobe Peptide oberflächenaktiv. Die Ursache unterschiedlicher Oberflächenaktivitäten liegt in der molekularen Struktur der Stoffe begründet. Amphiphile Substanzen bestehen sowohl aus hydrophilen als auch aus hydrophoben Gruppen und reichern sich aufgrund dieser Eigenschaft an der flüssig/gasförmigen Phasengrenzfläche an. Der Ladungsüberschuss auf der Tröpfchenoberfläche ist nach Übergang des oberflächenaktiveren Moleküls in die Gasphase nun geringer. Es kommt zu keiner weiteren Desorption oder Coulomb Fission, so dass im Tropfen zurückgebliebene Moleküle nicht in die Gasphase übergehen können und im Massenspektrum nicht erscheinen (CECH U. ENKE (2000)). Kleinere Peptide zeigen bei Substitution mit einer hydrophoberen Gruppe eine Verstärkung des Signals. Umgekehrt wurde bei Substitution mit einer hydrophilen Gruppe eine Abschwächung beobachtet (KEBARLE (2000)). Die amphiphilen Eigenschaften von Colistin tragen somit zur Stabilität und Intensität des Signals bei und zeigen demzufolge in der Matrix Milch eine erhöhte Signalintensität als im Lösungsmittel.

Die Elektrospray-Ionisation ist ein weiches Ionisationsverfahren, bei dem die Fragmentierung in der Quelle überwiegend vermieden wird (KEBARLE U. TANG (1993)). Beim Colistin waren allerdings mit beiden verwendeten Massenspektrometern Fragmentationen in der Quelle zu messen (Abschnitte 3.3.1 und 3.3.2). Offensichtlich hat neben dem Lösemittel auch die Geometrie des Massenspektrometers Einfluss auf die Ionisation und Fragmentierung von Colistin. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Erfahrungen (WAN U. A. (2006)). Die Geometrie kann die Elektrospray-Ionisationsquelle sowie die Kollisionszelle betreffen und ist üblicherweise nicht variabel (Tabelle 4.1). Ausnahmen bietet hier der Hersteller *Varian*, bei dem in geringem Maße die *spray-needle* in ihrer Höhe (*y-adjustment*) und ihrem Abstand zur Einlasskapillare (*x-adjustment*) verstellt werden kann. Im Rahmen des möglichen Variationsbereiches war jedoch keine Verbesserung zu messen. Dieser Fragestellung konnte innerhalb dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen werden, da ein *API*-Gerät - mit dem besseres Fragmentierungsverhalten gemessen wurde - nicht zur Verfügung stand (SIN U. A. (2005), WAN U. A. (2006) und MA U. A. (2008)).

Tabelle 4.1: Geometrie von Kollisionszelle und Elektrospray-Ionisation-Interface

	<i>Varian</i> 1200 L	<i>Micromass</i> LC 9011	<i>API</i> 3000/4000
Kollisionszelle	180° Winkelanordnung zwischen Eintritt und Austritt	lineare Anordnung	lineare Anordnung
ESI-Interface	<i>off-axis from capillary axis:</i> Die Probe wird zwischen dem Nadelaustritt und dem MS-Eingang um ca. 70° abgelenkt.	Z-Spray Geometrie: Die Probe wird zwischen dem Nadelaustritt und dem MS-Eingang zweifach orthogonal abgelenkt	<i>off-axis:</i> Der Nadelaustritt befindet sich geringfügig außerhalb der MS-Eingangssache

Im Grunde findet in der Quelle (*Varian* und *Micromass*) schon eine „pseudo“-MS/MS-Messung statt. Die detektierten Ionen bestehen neben den einfach und mehrfach geladenen Molekülionen auch aus einfach geladenen Aminosäuren wie (m/z 101, m/z 202, m/z 227, m/z 241). Letztere resultieren aus der bevorzugten Fragmentierung der Peptide entlang der Hauptkette, wobei die Fragmentionen m/z 101 $[L - Dab - \gamma - NH_2]^+$ und

m/z 202 [$L-Dab-\gamma-NH_2-Thr$]⁺ sowie m/z 227 [$6-MHA-L-Dab-\gamma-NH_2+H$]⁺ und m/z 241 [$6-MOA-L-Dab-\gamma-NH_2+H$]⁺ darstellen.

Die intensivsten Molekülionen waren die zweifach geladenen Molekülionen (m/z 586, m/z 579 und m/z 603). Sie dienten deshalb als Vorläuferion für die anschließende MS/MS-Messung. Diese zweifach geladenen Molekülionen von Colistin A, Colistin B und Polymyxin B bilden auch die intensivsten Hauptfragmente. Höhere Kollisions-Energien führten zur intensiven Fragmentierung, bei der die gebildeten Fragmentionen von geringer Intensität waren und nicht in dem benötigten Empfindlichkeitsbereich lagen. Als diagnostische Fragmentionen fungierten aus diesem Grunde die Molekülionen selbst. Prinzipiell handelt es sich auch hier wiederum um eine „pseudo“-MS/MS-Messung.

4.3.2 Identifizierungspunkte

Beim Identifizierungspunktekonzept wurden mangels weiterer diagnostischer Fragmentionen die „pseudo-Fragmentionen“ (m/z 586, m/z 579) als diagnostische Ionen angerechnet. Da jedes Ion nur einmal gezählt werden kann, ergeben sich pro Vorläuferion keine Identifizierungspunkte und für die im dritten Quadrupol gemessenen „pseudo-Fragmentionen“ (m/z 586, m/z 579) jeweils 1,5 Punkte. Daraus resultieren drei Identifizierungspunkte, womit die nach der Entscheidung [2002/657/EG](#) erforderliche Anzahl von drei Identifizierungspunkten für Stoffe der Gruppe B ([96/23/EG](#)) erreicht wird.

4.4 Probenaufarbeitung

Mit der Probenaufarbeitung ist die weitestgehende Abtrennung der Probenmatrix vom Zielanalyten verbunden. Aufgrund des amphiphilen Charakters von Colistin stellte dies in einer proteinreichen Matrix wie der Milch eine große Herausforderung dar.

Zur Deproteinierung wurde die Milch zunächst, wie bei [DECOLIN U. A. \(1997\)](#) beschrieben, mit Trichloressigsäure behandelt. Mit dem Zentrifugierschritt wurde u. a. auch das Milchfett abgetrennt. Bei der anschließenden Reinigung über eine C18-Kartusche wurden lipophile Begleitstoffe der Milch zurückgehalten und das Colistin ohne vorherigen Waschschrift eluiert. Durch die Behandlung mit Trichloressigsäure denaturieren die säureempfindlichen Proteine, nicht aber solche, die aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften säurestabil sind. Die beschriebene Probenaufarbeitung konnte nicht ohne Weiteres übertragen werden, da zur gleichen Zeit wie Colistin Begleitstoffe retinierten und die erforderliche Empfindlichkeit mit der Nachsäulenderivatisierung nicht

erreicht wurde.

4.4.1 Extraktionsverfahren

Während die Entfernung von Milchfett einfach durch Zentrifugieren und die der Caseine durch Säurezugabe (Denaturierung) erfolgt, liegt die Hauptschwierigkeit in der Isolierung des Colistins von den als Emulgator wirkenden Phospholipiden oder anderen Proteinen, die ähnliche chemische Eigenschaften wie Colistin besitzen. Hierzu wurden weitere Separationstechniken wie Festphasenextraktion, Gelfiltrationschromatographie oder Ultrafiltration getestet. Der erste Extraktionsschritt zur Entfettung und weitestgehenden Deproteinierung erfolgte mit Oxalsäure, ein zweiter folgte nach Zentrifugieren mit TCA/HCl.

4.4.2 Gelfiltrationschromatographie

Als zusätzlichen Reinigungsschritt zur Festphasenextraktion wurde die Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Grundsätzlich sind Wechselwirkungen zwischen Molekülen und stationärer Phase möglich, wobei kleinere Moleküle - wie Peptide - anfälliger für diese Wechselwirkungen sind als größere Proteine (Datenblatt zur Säule von *Amersham Biosciences*; [Amersham Biosciences Europe GmbH \(2002\)](#)). Bei der verwendeten stationären Phase *Superdex® Peptide* konnten die ionischen Wechselwirkungen durch einen niedrigen pH-Wert ($\text{pH} = 1,9$) und durch Zugabe von $0,25 \text{ M NaCl}$, die hydrophobe Wechselwirkungen hingegen durch den Anteil an Acetonitril unterdrückt werden. In den durchgeführten Versuchen wurde eine Wiederfindung für einen 1 mg/L Colistin-Standard von 100% erreicht. Die Experimente mit Milch zeigten deutliche Reinigungseffekte.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass aufgrund der apparativen Möglichkeit ein höheres Injektionsvolumen nicht möglich war. Mit einem größeren Injektionsvolumen wäre eine erfolgreiche Anwendung der Gelfiltrationschromatographie vorstellbar. Prinzipiell müsste dann noch die Wiederfindung im entsprechend niedrigen Konzentrationsbereich ermittelt werden. Grundsätzlich stellt die Gelfiltrationschromatographie eine effektive aber zeitaufwändige Methode zur Aufreinigung bei der Bestimmung von Colistin in Milch dar.

4.4.3 Festphasenextraktion

Das Prinzip der Festphasenextraktion beruht auf der Wechselwirkung des Analyten mit dem Sorbens, der stationären Phase. Als Sorbentien kamen RP-Phasen und Kationenaustauscher zum Einsatz. Die aufgegebene Extrakt-Lösung wird durch die zuvor konditionierten und äquilibrierten SPE-Kartuschen hindurchgesaugt. Die Analyten gehen dabei mehr oder weniger starke Wechselwirkungen mit dem Sorbens ein und werden entsprechend stark zurückgehalten. Trennprinzipien sind die aus der Chromatographie bekannten Mechanismen der Verteilung, der Adsorption und des Ionenaustausches. Der Anreicherung auf der Kartusche können dann noch Waschschrte folgen, bevor der Analyt mit einem geeigneten Lösemittel eluiert wird.

Bei dem Verfahren nach [DECOLIN U. A. \(1997\)](#) mit der *Chromabond* C18ec-Kartusche betrug die Wiederfindung 40 % für Colistin A und 57 % für Colistin B. Vermutlich wird bei der Probenaufgabe nicht das gesamte Colistin zurückgehalten, denn weitere Elutionsschritte führten nicht zur höherer Wiederfindung. Weitere Experimente zielten darauf ab, die Konditionierung, die Äquilibration, mögliche Waschschrte und den Eluenten zu optimieren. Die von zwei verschiedenen Anbietern getesteten C18-Kartuschen wiesen keine Unterschiede hinsichtlich der Wiederfindung auf.

Das Sorbens muss vor der Probenaufgabe konditioniert und äquilibriert werden, damit es mit dem Analyten eine reproduzierbare Wechselwirkung eingehen kann. Die Konditionierung und Äquilibration ist eine Benetzung der stationären Phase und schafft eine geeignete Umgebung zur Adsorption des Analyten. Die Solvatisierung in nur einem Schritt mit MeOH/0,01 M HCl (1/1; *v/v*) hatte im Fall von Colistin einen positiven Effekt auf die Wiederfindung. Ein vorheriger Konditionierungsschritt mit reinem Methanol führt zur erheblichen Analytverlusten. Das präparierte Sorbens darf nicht trockengezogen werden, da sonst die Benetzung zunichte gemacht wird. Zur Beladung wurde der ganze Probenextrakt aufgegeben. Das anschließende Waschen des Sorbens dient üblicherweise zur Entfernung von schwächer gebundenen Matrixbestandteilen. Als Waschlösung erwies sich eine Lösung von ACN/0,1 % TFA (2/8; *v/v*) als geeignet.

Bei allen geprüften Eluenten erwies sich für C18-Phasen die schon in der Literatur ([DECOLIN U. A. \(1997\)](#)) erwähnte MeOH/0,01 M-HCl-Lösung (55/45; *v/v*) als das optimale Elutionsmittel. Zur Erreichung einer Aufkonzentration wurde das Eluat auf ein geringeres Volumen als das Probevolumen aufgefüllt.

Eine gute Wiederfindung ergab ebenfalls die Festphasenextraktion von Colistin-Standardlösungen über die C18ec-Kartusche (*Chromabond*) bei vorheriger Konditionierung im Ammoniak-Alkalischen. Bei vorheriger Entfettung und Deproteinierung von Milch-

proben mit 10%iger TCA/ACN-Lösung (Abschnitt 5.3.4), war im Vergleich zur SPE-Aufreinigung mit MeOH/HCl-Konditionierung ein deutlich verbesserter aber dennoch nicht ausreichender Reinigungseffekt erkennbar. Zudem zeigte das Verstopfen der Kartuschen bei Wiederholungsversuchen, dass eine Serienaufarbeitung nicht möglich war. Vor dem Hintergrund einer Weiterentwicklung oder Optimierung der Aufreinigung könnte der Oxalsäure-Extraktionsschritt vorangestellt werden.

Die in der Literatur (SUHREN U. KNAPPSTEIN (2005)) erfolgreich angewandte Kationenaustauscher-Kartusche in Verbindung mit der Vorsäulenderivatisierung-Fluoreszenzdetektion fand in dieser Arbeit keine Verwendung. Obwohl mit dem Eluenten Kalium-Boratpuffer/ACN/TEA akzeptable Wiederfindungen von 82% (Colistin A) und 90% (Colistin B) erreicht wurden, war diese Aufreinigung wegen der anschließenden LC-ESI-MS/MS-Analyse nicht praktikabel. Der Grund hierfür liegt im Vorhandensein der schwerflüchtigen Boratsalze. Diese können sich ebenso wie Matrixbestandteile im Bereich des Probeneinlasses, insbesondere bei der Transferkapillare festsetzen und so einen signifikanten Empfindlichkeitsverlust bewirken. Ebenfalls könnten die Salze durch Ionenpaarbildung die Colistinionen neutralisieren, so dass diese nicht mehr massenspektrometrisch erfasst werden können. Die Erfahrungen bezüglich der komplexen Ionisation und des nicht absehbaren Verhaltens oder der geringen Stabilität von Colistin im alkalischen Puffer waren Anlass, diese Versuche nicht weiter zu verfolgen. Im Hinblick auf eine mögliche Fortentwicklung der Methode könnte angestrebt werden, den alkalischen Extrakt nach pH-Wert Erniedrigung mittels LC-ESI-MS/MS zu untersuchen. Möglicherweise könnte neben den nicht veränderbaren Geräteparametern die Zusammensetzung des Lösemittel einen positiven Einfluss auf die Ionisation und damit Empfindlichkeit und Robustheit der Methode haben, wobei sich der weitere getestete Eluent (Kaliumacetat/ACN/TFA im Alkalischen) nicht als adäquates, gleich stark wirkendes Ionenpaarreagenz erwies.

4.4.4 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration ist eine Membranfiltration bei der eine semipermeable Membran eine größenselektive Barriere für Moleküle darstellt. Die Ultrafiltration ist ein schonendes Verfahren zur Reinigung und Aufkonzentrierung von niedermolekularen gelösten Stoffen und Makromolekülen. Sie trennt Moleküle im Bereich von 1 kDa bis 500 kDa. Colistin bewegt sich mit 1170 g/mol bzw. 1155 g/mol im Grenzbereich von 1 kDa. Der Einsatz von 5 kDa- und 10 kDa-Ultrafilter erzielte keine ausreichende Reinigung. Neben Colistin passierten ebenso Milchbestandteile in nicht unerheblichem Maße die Membran, so dass

eine weitere Verfolgung dieses simplen Reinigungs- und Konzentrierungsschrittes nicht sinnvoll war.

4.4.5 Anwendbarkeit der Probenaufarbeitung auf Milch

Sämtliche erprobten Extraktions- und Aufreinigungsschritte waren nicht ausreichend, um in dem Extrakt mittels Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion Colistin in Milch zu analysieren. Problematisch waren stets die vorhandenen Milchbestandteile, die mit dem Colistin ähnelnden physikalisch-chemischen Eigenschaften und die zu geringe Konzentration des Analyten im Eluat oder Extrakt.

Abschließend wurde der Extraktionsschritt mit der größtmöglichen Deproteinierung und der Reinigungsschritt mit der besten Wiederfindung und dem für die Massenspektrometrie geeigneten Lösungsmittel kombiniert. So wurde nach Zugabe von Oxalsäure und TCA/HCl und Abzentrifugieren des Niederschlags der Extrakt mittels Festphasenextraktion weiter aufgereinigt und aufkonzentriert. Das Eluat der Proben konnte mühelos in das LC-MS System injiziert werden, obwohl - wie LC-Fluoreszenzmessungen zeigten - noch Anteile der Matrix vorhanden waren. Mit der chromatographischen Trennung konnten in Kombination mit der massenspektrometrischen Detektion störende Matrixsubstanzen, die zur gleichen Zeit wie Colistin-Komponenten retenierten, weitestgehend ausgeblendet werden. Nachteile ergeben sich, da trotz Proteinfällung und Entfettung die Proben noch Matrixbestandteile enthalten, so dass in der Regel das LC-MS-System häufiger gereinigt werden muss. Der bei unreinen Proben auftretende Empfindlichkeitsverlust aufgrund von Matrixeffekten war hier nicht zu beobachten, sondern viel mehr eine Steigerung der Signalintensität (Abschnitt 4.3.1).

Die ursprüngliche Aufgabenstellung der Arbeit war die Erarbeitung einer Analysemethode, bei der eine chromatographische Trennung mit zwei möglichen Detektionen – der Nachsäulenderivatisierung-Fluoreszenzdetektion und der massenspektrometrischen Detektion – den Nachweis und die Bestimmung von Colistin in Milch erbringen sollte. Die Fluoreszenzdetektion hätte den ersten Nachweis liefern sollen, der dann wiederum durch die MS/MS abgesichert worden wäre. Dieses Ziel war mit den Ergebnissen der Nachsäulenderivatisierung-Fluoreszenzdetektion nicht zu erreichen. Möglich war ausschließlich die Bestimmung mit der massenspektrometrischen Detektion, so dass diese Methode validiert wurde.

4.5 Validierung

4.5.1 Stabilitätstest

Wie auf allen Gebieten der Rückstandsanalytik stellen Standardlösungen eine wichtige Fehlerquelle bei quantitativen Bestimmungen dar. Da alle Standardlösungen nur begrenzt haltbar sind, ist eine Forderung der EU-Entscheidung, Stabilitätstests unter den dort definierten Bedingungen durchzuführen. Diese erfolgen, indem die Stabilität des Kalibrierstandards in Lösung unter verschiedenen Lagerungsbedingungen und in der Matrix überprüft wird. Lagerungsbedingungen für die Kalibrierstandards in Lösung sind: Im Dunkeln bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sowie im Hellen bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mit dem Analyten dotierte Matrix wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für den Stabilitätstest wurde eine höhere Konzentrationsstufe von 1 mg/L (MRL-Wert in Milch: $50\text{ }\mu\text{g/kg}$) gewählt, um auch das Verhalten der Minorkomponenten erfassen und überprüfen zu können. Die Messungen für den Stabilitätstest eines Colistin-Standards in Lösung erfolgte über zwölf Monate, diejenigen in der Matrix Milch konnten über einen Zeitraum von drei Wochen durchgeführt werden.

Der Abbau von Colistin in einer $0,01\text{ M HCl}$ -Lösung ist primär lichtabhängig. Bereits in der zweiten Woche konnte unter den Bedingungen - Hell/ $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ - ein Abbau gemessen werden, der sich kontinuierlich fortschrieb.

Die für den Abbau verantwortliche Strahlung liegt im UV-Wellenlängenbereich von $300\text{-}400\text{ nm}$, wobei die Untersuchung des Abbaumechanismus nicht Teil dieser Arbeit war.

Eine temperaturabhängige Zersetzung konnte in der 20. Woche zuerst bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ beobachtet werden, während bei 6 bzw. $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum Ende des Stabilitätstest kaum eine Abnahme zu vermessen war (Tabelle 5.22, Abbildungen 3.17 und 3.18). Einfrier-Auftau-Effekte waren sicher auszuschließen, da für die Messungen jeweils ein Vial den entsprechenden Lagerungsbedingungen entnommen und anschließend verworfen wurde. Parallel zur Abnahme der Hauptkomponenten nahmen zwei Minorkomponenten zu. Aufschluss ergab die massenspektrometrische Detektion. Bei der Komponente mit $m/z\ 586$ könnte es sich möglicherweise um methyliertes Polymyxin E2 oder Polymyxin E3 handeln.

Die andere Minorkomponente mit $m/z\ 595$ könnte auf eine Hydroxylierung der Fettsäurekette zurückzuführen sein. In der Literatur wird beim Colistin eine Komponente mit einer 3-Hydroxy-6-Methyloctansäure-Struktur beschrieben (GOVAERTS U. A. (2002)). Gegebenenfalls handelt es sich hier um die Hydroxylierung von Colistin A, was die Abnahme dieser Verbindung und die Erhöhung der Komponente mit $m/z\ 595$ erklären

könnte.

In der Matrix Milch konnte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln nach mindestens drei Wochen kein Abbau von Colistin gemessen werden.

4.5.2 Spezifität

Ein von der EU-Kommission gefordertes Leistungsmerkmal ist die Spezifität. Analysemethoden sind spezifisch, wenn eine Unterscheidung zwischen dem Zielanalyten und eng verwandten Stoffen (Metabolite, Abbauprodukte, Matrixbestandteile etc.) möglich ist. Dazu ist es erforderlich eine geeignete Anzahl von repräsentativen Leerwertproben ($n \geq 20$) auf Matrixeffekte hin zu untersuchen. Zusätzlich wird festgestellt, ob diese ggf. zu einer fehlerhaften Identifizierung führt oder die Quantifizierung beeinflusst.

Die analysierten Leerwertproben zeigten kurz nach dem Peak von Colistin A einen nicht gut aufgelösten Peak mit dem gleichen m/z -Verhältnis von 586. Zur weiteren Absicherung dieser Beobachtung wurden Leerwertproben mit dem CR-Colistin-Standard auf dem 0,5-, 1-, 1,5- und 2-fachen Niveau des zulässigen Grenzwertes dotiert. Mit den Dotierungsversuchen konnte belegt werden, dass es sich bei der gemessenen Verbindung nicht um Colistin A, sondern um eine milcheigene Verbindung mit denselben m/z -Werten handelte. Eine chromatographische Trennung mit entsprechender Auflösung war trotz mehrerer Gradientenveränderungen nicht möglich. Um den Einfluss auf die Quantifizierung möglichst gering zu halten, wurde diese manuell durchgeführt.

Bei einer zukünftigen möglichen Weiterentwicklung der Analysemethode wäre eine Erhöhung der Spezifität z. B. durch Optimierung der chromatographischen Gradiententrennung unter Verwendung einer längeren Säule, die zum Zeitpunkt der Validierung nicht zur Verfügung stand, denkbar.

Ebenso war der Einfluss von Substanzen, die die Identifizierung und/oder Quantifizierung von Colistin beeinflussen können, zu bestimmen. Als mögliche bekannte Substanz kam hier Polymyxin B in Frage. Die Untersuchung von sechs mit Polymyxin B dotierten Leerwertproben zeigte, dass aufgrund der unterschiedlichen m/z -Werte und Retentionszeiten eine eindeutige Identifizierung möglich war. Ein negativer Einfluss von Polymyxin B war somit auszuschließen.

4.5.3 Richtigkeit / Wiederfindung

Bei Analysemethoden ist die Wiederfindung und damit die Richtigkeit der Ergebnisse besonders wichtig. Fehler, die durch das Miterfassen anderer - in der Probenmatrix

enthaltener - Substanzen auftreten, sollten so gering wie möglich gehalten werden. Die Wiederfindungsrate ist somit ein Maß für die Ausbeute nach Durchführung sämtlicher Probenaufarbeitungsschritte und des Messverfahrens.

Bei wiederholten Analysen eines zertifizierten Referenzmaterials gelten folgende Richtbereiche für die Abweichung des experimentell bestimmten, wiederfindungskorrigierten mittleren Massenanteils vom zertifizierten Wert:

Tabelle 4.2: Mindestwerte der Richtigkeit von quantitativen Methoden

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

Da kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung steht, wird die Bestimmung der Richtigkeit durch die Wiederfindung von zugesetzten bekannten Mengen des Analyten zu einer Leerwertmatrix akzeptiert, wobei die wiederfindungskorrigierten Daten beim Colistin im Bereich von -20 % bis +10 % liegen müssen. Die Wiederfindungsraten bewegten sich zwischen 99,3 – 100,2 % (Tabelle 3.15) und bedurften damit keiner Korrektur.

Eine wichtige Beobachtung in der quantitativen LC-ESI-MS/MS-Analytik ist allgemein das Vorkommen von matrixbedingten Signalsuppressionen oder -steigerungen (NIESSEN (2003)). Während über Signalsuppressionen häufiger berichtet wird, finden Signalverstärkungen offensichtlich nicht in dem Maße statt. Untersuchungen der Matrixeffekte zeigen, dass sich diese primär in der flüssigen Phase abspielen und von der Konzentration der nichtflüchtigen Verbindungen in der Probe abhängen. Die Ursache für die Ionenverstärkung muss also bereits bei der Tröpfchenbildung und der anschließenden Lösemittelverdunstung liegen (KING U. A. (2000)). Die Charakteristika der Signalintensitäten wurden bereits im Abschnitt 4.3.1 beschrieben. Die Signalverstärkung von Colistin in Milch nimmt mit steigender Colistin-Konzentration in der Milch vom kleinsten dotierten Niveau vom 4,5-fachen bis zum höchsten Niveau auf das 2-fache ab. Colistin A und Colistin B haben in der Gegenüberstellung zu den noch im Extrakt vorhandenen Milchbestandteilen offensichtlich eine höhere Oberflächenaktivität.

Durch diesen Matrixeffekt werden die erforderlichen Bestimmungsgrenzen ohne Weiteres erzielt. Dennoch führen Matrixbeeinträchtigungen aufgrund einer geringeren Re-

produzierbarkeit des Analyseprozesses zu mangelhafter Genauigkeit und Präzision einer Methode. Zur Kompensation dieses Effektes muss der Gehalt an Colistin über Matrixkalibriergeraden errechnet und darüber auch die Wiederfindungsrate bestimmt werden.

4.5.4 Ergebnisse der Validierung

Ein Messergebnis ist unweigerlich mit einer Unsicherheit behaftet. Die Messunsicherheit ist ein Maß dafür, in welchem Werteintervall sich das Ergebnis bewegt und erlaubt dem Labor einzuschätzen, inwiefern es sich auf diesen Wert verlassen kann. Um diesen Aspekt zu berücksichtigen, ist die Angabe der Messunsicherheit eine zentrale Forderung der [EN ISO/IEC 17025:2005 \(2005\)](#). Die in der Entscheidung der Kommission [2002/657/EG](#) geforderte Messunsicherheit in Form der Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ und dem Nachweisvermögen $CC\beta$ entspricht der Vorgabe der ISO-Norm. Zur Messunsicherheit tragen alle Prozesse bei, die zur Messwertermittlung dienen. Diese Unsicherheitskomponenten liegen im präanalytischen Teil wie Probenahme, Transport, Lagerung oder Probenvorbereitung (Homogenisieren, Teilen) und im analytischen Teil. Im Labor werden die analytischen Unsicherheiten ermittelt. Dabei ist die Quantifizierung der einzelnen Unsicherheitskomponenten sehr aufwendig und problematisch. Die Berechnung erfolgt nach separater Ermittlung der einzelnen Unsicherheitsquellen entsprechend den Gesetzen der Fehlerfortpflanzung. Eine enorme Erleichterung bietet das alternative Verfahren mit der Software *InterVal*. Die Software basiert auf algorithmischen Anpassungen zur Berechnung der allgemeinen Messunsicherheit ([JÜLICHER U. A. \(1998, 1999\)](#)). Sie erfasst die Präzisionsdaten wie Wiederholstandardabweichung, laborinterne Reproduzierbarkeitsstandardabweichung sowie Messunsicherheiten innerhalb des validierten Kalibrierbereiches (Tabelle [3.15](#)) und die systematischen Abweichungen in Übereinstimmung mit dem [EURACHEM/CITAC \(2004\)](#) Leitfaden.

Bei der Validierung soll der Zusammenhang bestimmter, die Analytik beeinflussende Parameter/Faktoren untereinander untersucht werden. Bei den üblichen aufwendigen vorgeschalteten Robustheitstests wird der Effekt von einer oder mehrerer Parameteränderungen (Matrices, Spezies, Zentrifugier- und Extraktionsdauer, Kartuschen-Chargen etc.) beobachtet. Wenn ein Faktor signifikant ist, muss eine gründlichere Untersuchung durchgeführt werden, um die Größe des Effektes zu messen und ein mögliches Arbeitsintervall festzulegen. Diese Tests liefern deshalb Informationen über den Einfluss wichtiger Faktoren ([EURACHEM/CITAC \(2004\)](#)). In *InterVal* werden diese Informationen mit der Validierung ermittelt. Durch die Versuchspläne ist es möglich, mehrere faktorielle Effekte systematisch und mit minimalem Aufwand zu untersuchen. Dabei können mit

32 Bestimmungen bis zu sieben Faktoren gleichzeitig untersucht werden.

Der zweite Zentrifugierschritt hat bei den in dieser Arbeit durchgeführten Arbeitsschritten den größten Einfluss auf die Bestimmung von Colistin in Milch. Mit 13% Abweichung von der mittleren Standardabweichung liegt er aber noch im akzeptablen Bereich von $\pm 15\%$ (Tabelle 3.16).

4.5.5 Anwendbarkeit der Analysemethode

Das Ziel eine nach den Vorgaben der Kommissionsentscheidung 2002/657/EG validierte Methode zur Bestimmung von Colistin in Milch zu erstellen, wurde unter geringfügiger Modifikation erreicht. Mit Unterstützung der Software *InterVal* ergab sich nach dem alternativen Validierungsverfahren für $CC\alpha$ ein Wert von $43,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ und für $CC\beta$ ein Wert von $51,3 \mu\text{g}/\text{kg}$. Im Vergleich zum herkömmlichen Validierungsverfahren konnte somit mit relativ geringem Validierungsaufwand eine neue Analysemethode etabliert werden, die auch erfolgreich in der Routineanalytik eingesetzt wird. In allen 43 untersuchten Rohmilchproben konnten keine Colistinrückstände nachgewiesen werden.

4.6 Ausblick

4.6.1 Vorsäulenderivatisierung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Fluoreszenzdetektion mittels Nachsäulenderivatisierung, da unter gleichen chromatographischen Bedingungen die massenspektrometrische Detektion möglich sein sollte. Als Vorteil für die Vorsäulenderivatisierung ist zu werten, dass die Reaktionsdauer ohne wesentliche Bedeutung ist und dass durch zusätzliche gezielte Extraktionen Reagenzüberschüsse oder interferierende Reaktionsprodukte entfernt werden können. Im Rahmen von Routine- und Serienaufarbeitungen findet der Derivatisierungsschritt häufig in Verbindung mit der Probeninjektion statt, so dass zusätzliche Reinigungsschritte entfallen. Isoindolderivate sind bei Raumtemperatur und im sauren pH-Bereich instabil, weshalb eine automatisierte Derivatisierung vorteilhaft ist. Üblicherweise wird die Bildung von Reaktionsprodukten, die die chromatographische Analyse durch Überlagerung von Substanzen stören könnte, als Nachteil angesehen. Ausschließen ist aber nicht, dass es im umgekehrten Fall vorteilhaft sein kann, dass durch die vorherige Derivatisierung von Matrixbestandteilen eine bessere chromatographische Trennung der Colistin-Komponenten möglich wird. Mit einer automatisierten zeitgesteuerten Vorsäulenderivatisierung und anschließender Injektion in das chromatographische

System, könnten die Colistin-Isoindolderivate massenspektrometrisch oder mittels Fluoreszenz detektiert werden. In der Literatur sind massenspektrometrische Untersuchungen von Colistinderivaten zur Überprüfung, ob die Derivatisierungsreaktion mit OPA und 2-Mercaptoethanol an den fünf unmaskierten Aminogruppen stattfindet, beschrieben (DECOLIN U. A. (1997)). Fragmentierungsversuche oder Bestimmungen im Rahmen der Rückstandsanalytik sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht aufgezeigt und waren im Rahmen dieser Arbeit technisch nicht ausführbar. Möglich wäre, dass die Colistinderivate mit den in dieser Arbeit eingesetzten Massenspektrometern ein verbessertes Fragmentierungsverhalten aufzeigen, so dass die Anforderungen der EU in vollem Umfang zu erfüllen wären.

4.6.2 Immunoaffinitätsextraktion

Ein zentraler Aspekt in dieser Arbeit war es, bei der Probenaufarbeitung die Matrix Milch weitest möglich vom Zielanalyten Colistin abzutrennen. Die Spezifität der hier eingesetzten Techniken basiert auf der Molekülgröße (Gelfiltrationschromatographie und Ultrafiltration) und den adsorptiven und/oder Redox-Eigenschaften (*solid-phase-extraction* und Ionenaustausch) von Colistin. Colistin ließ sich nach der SPE-Aufreinigung zwar eindeutig mittels der massenspektrometrischen Detektion nachweisen, führte aber unter dem Einfluss von Matrixbestandteilen zu höheren Signalintensitäten und damit zur häufigeren Reinigung des LC-MS-Systems.

Eine weitere denkbare - im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführte - Technik für analytische Zwecke ist die Immunoaffinitätsextraktion. Das Prinzip beruht auf der selektiven molekularen Erkennung, der Bindung von Antikörper und Antigen. Sie ermöglicht die selektive und spezifische Reinigung und auch Anreicherung eines Analyten (= Antigen) aus einer komplexen Probenmatrix. Bei der Immunoaffinitätsextraktion sind die Antikörper an eine Trägermatrix gebunden. Sie binden die Zielanalyten (= Antigene) aus der Probe. Von Antikörpern nicht gebundene Substanzen werden über einen Waschschritt entfernt. Anschließend werden die Zielanalyten eluiert, indem die Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen aufgehoben wird. Zunächst gilt es allerdings einen entsprechenden Antikörper zu erzeugen, da bisher keine Antikörper für Colistin kommerziell erhältlich sind. HAMMER (1998) und KITAGAWA U. A. (1985) erzeugten Antikörper für Colistin durch Immunisierung von Kaninchen und wiesen damit Colistin mittels ELISA in Rohmilch bzw. mittels EIA in Forelle nach. Der von HAMMER (1998) erzeugte Antikörper wurde von SUHREN U. KNAPPSTEIN (2005) als solcher zum Screenen von Colistin in Rohmilch eingesetzt, um die Ergebnisse anschließend mit

der LC-Fluoreszenzdetektion zu bestätigen.

Die erzeugten Antikörper werden auf einem geeigneten Trägermaterial aufgebracht. Bei der Immunoaffinitätsextraktion wird der Antikörper beispielsweise an Silikate, Agarose, Cellulose, synthetische Polymere und Sol-Gele kovalent gebunden. Die Trägermatrix beeinflusst direkt die Kapazität des Immunadsorbers. So ist die Menge der immobilisierbaren Antikörper durch die verfügbare Oberfläche, die in Verbindung mit der Porengröße steht, festgelegt.

Die Immobilisierung kann auch durch Einpolymerisation der Antikörper in eine Matrix geschehen (Sol-Gel Methode) (HENNION U. PICHON (2003)). Antikörper erkennen in der Regel nicht nur das Antigen, sondern auch strukturverwandte Verbindungen. Im vorliegenden Fall wären solche Kreuzreaktionen mit Polymyxin B denkbar. Mit möglichen Waschschritten könnten Matrixbestandteile abgetrennt und mit der anschließenden Elution das Colistin von den Antikörpern gelöst werden. Die Desorption wird dabei durch pH-Wert-Änderung, Zugabe von chaotropen Ionen oder organischen Lösungsmittel zum Eluenten bewirkt. Das Eluat stünde dann der LC-MS/MS-Analytik zur Verfügung.

5 Experimentelles

5.1 Material, Geräte, Chemikalien und sonstiges Labormaterial

5.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

In Tabelle 5.1 sind die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösemittel aufgeführt. In der Regel hatten die Chemikalien p.a. Qualität und die verwendeten Lösungsmittel für die Flüssigchromatographie LC-Qualität. Das verwendete Wasser zur Herstellung von LC-Eluenten, Reagenzien oder sonstigen Anwendungszwecken wurde in einer Millipore-Q Anlage entionisiert und filtriert. Die Reinstwasserqualität wird durch kontinuierliche Messung der Leitfähigkeit und durch den eingebauten TOC-Monitor sichergestellt.

Tabelle 5.1: Chemikalien und Lösungsmittel zur LC und Probenaufarbeitung

Substanz	Reinheit	Hersteller	Artikelnummer
2-Mercaptoethanol	k. A.	<i>Sigma-Aldrich</i>	M 6250
Acetonitril	LC grade	<i>Promochem</i>	SO-9128-C012; LC Optigrade®; Gradient Grade (Cyclotainer®); 10 L
Ameisensäure	98 % minimum p.a.	<i>J.T. Baker, USA</i>	6037
Ammoniumformate	100,00 %	<i>Sigma-Aldrich</i>	516961
Argon	99,999 %	<i>Air Liquide</i>	
Borsäure	zur Analyse	Merck	1.001.651.000

Tabelle 5.1: Chemikalien und Lösungsmittel zur LC und Probenaufarbeitung

Substanz	Reinheit	Hersteller	Artikelnummer
Brij 35	for synthesis	<i>Merck</i>	801.962.250
Chloroform	for organic residue analysis mind. 99 %	<i>J.T. Baker</i>	9257-22
Cyclohexan	Picograde mind. 99 %	<i>Promochem</i>	SO-1179
Di-Kaliumhydrogen- phosphat	zur Analyse, wasserfrei	<i>Merck</i>	1.051.041.000
Di-Natriumhydrogen- phosphat	wasserfrei zur Analyse	<i>Merck</i>	1.065.860.500
Essigsäure	100% wasserfrei pro analysis	<i>Merck</i>	1.000.631.000
Ethanthiol (Ethylmercaptan)	97 %	<i>Aldrich</i>	E 370-8
Kaliumdihydrogen- phosphat	zur Analyse	<i>Merck</i>	1.048.730.250
Kaliumhydroxid	zur Analyse	<i>Merck</i>	1.050.331.000
Kaliumnitrat	zur Analyse	<i>Merck</i>	1.050.630.500
Methanol	LC grade	<i>Promochem</i>	SO-3041-C012; LC Optigrade®; Gradient Grade (Cyclotainer®); 10 L
o-Phthalaldehyde	chromatographic grade	<i>Pickering Laboratories</i>	O 120
Ortho-Phosphorsäure 85 %	zur Analyse	<i>Merck</i>	1.005.731.000

Tabelle 5.1: Chemikalien und Lösungsmittel zur LC und Probenaufarbeitung

Substanz	Reinheit	Hersteller	Artikelnummer
Oxalsäure-Dihydrat	zur Analyse	<i>Merck</i>	1.004.950.100
Salzsäure, 0,1 mol/L		<i>Merck</i>	1.090.601.000
Schwefelsäure 95 - 97 %	zur Analyse	<i>Merck</i>	1.007.311.011
Trichloressigsäure	zur Analyse	<i>Merck</i>	1.008.070.250
Triethylamin	99 % minimum	<i>Sigma</i>	T-0886
Trifluoressigsäure	99,9 %	<i>J.T. Baker, USA</i>	9470-02

5.1.2 Standardsubstanzen

Die verwendeten Standardsubstanzen sind in Tabelle 5.2 zusammengestellt. Zur Entwicklung und Optimierung wurde mit dem *Sigma-Aldrich* Colistinsulfat-Standard und dem CR-Colistinsulfat-Standard jeweils gelöst in 0,01 M HCl gearbeitet. Die Stabilitätsmessungen für Colistin erfolgten mit dem *Sigma-Aldrich*-Standard. Die Stammlösungen in 0,01 M HCl betragen jeweils 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ und sind im Kühlschrank bei 6 °C für einen Monat stabil (DECOLIN U. A. (1997)). Daraus benötigte Standardlösungen wurden mit entsprechenden Lösungsmitteln frisch hergestellt und in den jeweiligen Abschnitten genau beschrieben. Die Anwendung bzw. Nicht-Anwendung von Korrekturfaktoren aufgrund unterschiedlicher Aktivitäten und Zusammensetzungen ist in Abschnitt 3.1 hergeleitet und erläutert.

Tabelle 5.2: Standardsubstanzen

Substanz	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
Colistinsulfat 19,530 units/mg	1264-72-8	<i>Sigma-Aldrich</i>	C4461
Colistinsulfat CRS batch 3	1264-72-8	<i>Council of Europe</i> Strasbourg	Y0000277
Colistinsulfat 99,0 % \pm 0,5	1264-72-8	<i>Dr. Ehrendorfer</i>	C11693500
Colistinsulfat 19,9000 units/mg	1264-72-8	<i>Alpharma</i>	A 1620284

Tabelle 5.2: Standardsubstanzen

Substanz	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
Colistinsulfat	k. A.	Anonym	2 x
Polymyxin B sulfate 8180 units/mg	1405-20-5	<i>Sigma-Aldrich</i>	P1004
Polymyxin B sulfate batch 4	k. A.	<i>Council of Europe</i> Strasbourg	P2400000

5.1.3 Geräte und sonstiges Labormaterial

Waagen:	Analysenwaage „MC 410S“ Analysen-Feinwaage „MC 5“ Laborwaage „LP6200“ (<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge:	Cryofuge 8500i Megafuge 2.0 R (<i>Heraeus Instruments GmbH</i> , Hanau, Deutschland)
SPE-Vakuum-Einheit:	„Vac Elut SPS 24“ (<i>Varian Deutschland GmbH</i> , Darmstadt, Deutschland)
Schüttler:	Horizontalschüttler HS 501 digital Reagenzglasschüttler Vibrofix VF2 (<i>IKA®-Werke GmbH & Co. KG</i> , Staufen, Deutschland)
Messkolben:	10 – 100 mL
Variable Pipetten:	„Eppendorf Reference® Variabel“ z.B. 50 – 1000 μ L etc. (<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland)

5.1 Material, Geräte, Chemikalien und sonstiges Labormaterial

Zentrifugengläser:	Duranglas mit Gewinde, Schraubkappe und Teflondichtung, 50 mL (<i>BRAND GmbH & Co. KG</i> , Wertheim, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen:	graduiert, unten konisch, Duranglas, 10 mL (<i>BRAND GmbH & Co. KG</i> , Wertheim, Deutschland)
pH-Meter:	pH-Meter mit pH-Elektrode ohne Temperaturfühler „Typ ph-526“ (<i>WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH</i> , Weilheim, Deutschland)
Eindampfblock:	vapo therm mobil II (<i>Barkey GmbH & Co. KG</i> , Leopoldshöhe, Deutschland)
Ultraschallbad:	mit Heizung, Sonorex RK 510 H (<i>Bandelin Electronic GmbH & Co. KG</i> , Berlin, Deutschland)

5.1.4 Verbrauchsmaterial

Spülmittel:	Neodisher FT und Neodisher N (für Laborspülmaschine) (<i>Carl Roth GmbH & Co. KG</i> , Karlsruhe, Deutschland)
Ultrafilter:	<i>Amicon Ultra 4, 5 NMWL</i> (<i>Millipore GmbH</i> , Eschborn, Deutschland), Artikelnummer UFC8 005 24 <i>Amicon Ultra 4, 10 NMWL</i> (<i>Millipore GmbH</i> , Eschborn, Deutschland), Artikelnummer UFC8 010 24
Pasteurpipetten:	150 mm (<i>BRAND GmbH & Co. KG</i> , Wertheim, Deutschland)
Pipettenspitzen:	Standardtips, z.B. 1000 μ L (<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland)
SPE-Kartuschen:	<i>Chromabond C18ec</i> (6 mL/500 mg) (<i>Macherey-Nagel GmbH & Co. KG</i> , Düren, Deutschland), Artikelnummer: 730014, Chargennummern: 14.243 und 24.280 <i>Chromabond C18ec</i> (1 mL/100 mg) (<i>Macherey-Nagel GmbH & Co. KG</i> , Düren, Deutschland), Artikelnummer: 730011 <i>IST C18</i> (10 mL/500 mg), (<i>Separtis GmbH</i> , Grenzach-Wyhlen, Deutschland), Artikelnummer: 220-0050-H <i>Bond Elut LRC SCX</i> (500 mg/3 mL) (<i>Varian Deutschland GmbH</i> , Darmstadt, Deutschland), Artikelnummer: 12102040

5 Experimentelles

Probenfläschchen: (Vials, 2 mL): braun, Bestell-Nr. 8004-NM-D/V und klar, Bestell-Nr. 8004-NM-H/V (für Stabilitätstest) (*Glastechnik Gräfenroda GmbH*, Gräfenroda, Deutschland)

Schraubkappe: 8 mm, schwarz mit PTFE/Silikon-Septon (blau/weiß) mit Schlitz für *Merck XIC 43955* (*Wicom GmbH*, Heppenheim, Deutschland), Artikelnummer: WIC 43955

5.1.5 Sonstiges

Reinstwasseranlage: System: Millipore mit Elektroionisierungssystem „Elix“ zur Vorreinigung (mit Umkehrosmose und Ionenaustauscher mit elektrolytischer Regeneration des Austauschers) und Milli-Q Gradient A10 zur weiteren Reinigung (Reinigungspatronen) und UV-Bestrahlung (*Millipore*, Eschborn, Deutschland).

Laborspülmaschine: Typ G 7735 CD (mit Reinstwasserspülanlage) (*Miele & Co. KG*, Gütersloh, Deutschland)

Reinstwasserspülanlage: Umkehr-Osmoseanlage, R 0500 – 3000/10 μ Siemens (für Laborspülmaschine) (*Loose*, Hagen/Westfalen, Deutschland)

5.2 LC-Anlagen

5.2.1 LC-Fluoreszenzdetektion (*Merck*)

5.2.1.1 LC-System

Entgaser: GT-102 (*Gastorr*, Bad Honnef, Deutschland)

Pumpe: L-7100 (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland)

Pumpe: L-6200 (Nachsäule (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland))

Autosampler/Injektor: L-7200 (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland), Spüllösung: MeOH/H₂O (1/1; v/v)

Säulenofen: Jetstream 2 Plus (*Waters GmbH*, Eschborn, Deutschland)

Fluoreszenzdetektor: F-1080 (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland)

Interface:	D-7000 IF (<i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Deutschland)
Nachsäulenderivatisierungssystem:	Valco T-Stück, 1/16", (<i>Alltech GmbH</i> , Unterhaching, Deutschland), Artikelnummer 28629 mit <i>Teflon</i> ® Schlauch (0,5 m lang und 0,25 mm i. D.)
Datenregistrierung und -auswertung:	D 7000 LC-Manager (<i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Deutschland)

5.2.1.2 LC-Trennsäulen

Bei der etablierten LC-Fluoreszenzmethode wurden die Komponenten standardmäßig auf der „Jupiter Proteo“ von *phenomenex* getrennt. Diese Referenzsäule und alle weiteren im Rahmen der Methodenoptimierung verwendeten Trennsäulen sind in Tabelle 5.3 aufgeführt.

Halterung für Vorsäule: security guard cartridges (*phenomenex Ltd. Deutschland*, Aschaffenburg, Deutschland), Artikelnummer: KJ0-4282

Vorsäulen (Cartridges): C12-cartridges (*phenomenex Ltd. Deutschland*, Aschaffenburg, Deutschland), Artikelnummer: AJ0-6073-S

5.2.1.3 LC-Bedingungen

Zur Herstellung von 1 L Derivatisierungsreagenz wurden 1,000 g Brij 35 und OPA (Einwaage siehe Tabelle 5.4) in 5 mL MeOH gelöst (im Ultraschallbad), dann zu 333 mL Boratpufferlösung gegeben. Anschließend wurde das Thiol (Menge siehe Tabelle 5.4) hinzugefügt und mit Wasser auf 1 L aufgefüllt. Argon wurde, nach Überführen in eine Braunglasflasche, für ca. 15 Sekunden durch das Derivatisierungsreagenz geleitet und erst dann gründlich homogenisiert/vermischt (pH = 9,70).

Boratpuffer:

61,8 g Borsäure und 40,0 g Kaliumhydroxid wurden im 1 L Messkolben in ca. 600 mL Wasser gelöst (Ultraschallbad) und anschließend mit Wasser aufgefüllt und vermischt.

Tabelle 5.3: Getestete stationäre Phasen

	LiChroCART Superspher 100	Inertsil ODS-3	ProntoSil	Jupiter Proteo	Jupiter Proteo	Zorbax-SB
Hersteller	<i>Merck</i>	<i>VDS optilab</i>	<i>VDS optilab</i>	<i>phenomenex</i>	<i>phenomenex</i>	<i>Agilent Technologies</i>
pH-Bereich	-	2 - 7,5	bis zu pH 1	1,5 - 10	1,5 - 10	1 - 8
Material	C 18	C 18	C 30	C 12	C 12	C 8
Länge	125	125	250	150	100	150
i.D. mm	2	2	2	2	2	2
Partikelgröße [μm]	4	5	5	4	4	5
Porendurchmesser [\AA]	100	100	300	90	90	80
Oberfläche [m^2/g]	350	450	100	475	475	180
endcapped	nein	ja	ja	ja	ja	nein
Säule Nr.	1	2	3	5a	5b	4

Tabelle 5.4: Derivatisierungsreagenz

Reagenz-Nr.	Einwaage OPA [g]	2-Mercaptoethanol [mL]	Ethanthiol
1	0,333	1,00	
2	0,333	1,25	
3	0,333	1,50	
4	0,333	1,75	
5	1	1,75	
6	0,333		1,80
7	0,333	3,50	

Tabelle 5.5: Übersicht über die eingesetzten Fließmittel

Fließmittel-Nr.	Zusammensetzung	Elutionsart
1	ACN und 0,035 M TEA-Lösung (18,5/81,5; <i>v/v</i>) mit Phosphorsäure auf pH = 2,5 eingestellt	isokratisch
2	ACN und 0,01 M wässrige TFA-Lösung (2/8; <i>v/v</i>) pH = 2,1	isokratisch
3	Gradient 1 Fließmittel A: ACN Fließmittel B: TFA/H ₂ O (1,0/1000; <i>v/v</i>) (pH = 2,1)	Gradient
4	ACN und 0,01 M wässrige TFA-Lösung (21/79; <i>v/v</i>) pH = 2,1	isokratisch
5	ACN und 0,01 M wässrige TFA-Lösung (25/75; <i>v/v</i>) pH = 2,1	isokratisch
6	Gradient 2 Fließmittel A: ACN Fließmittel B: TFA/H ₂ O (1,0/1000; <i>v/v</i>) (pH = 2,1)	Gradient

Tabelle 5.5: Übersicht über die eingesetzten Fließmittel

Fließmittel- Nr.	Zusammensetzung	Elutionsart
7	Gradient 3 Fließmittel A: ACN Fließmittel B: TFA/H ₂ O (1,0/1000; <i>v/v</i>) (pH = 2,1)	Gradient
8	Gradient 4 Fließmittel A: TFA/ACN (1,0/1000; <i>v/v</i>) (pH = 1,6) Fließmittel B: TFA/H ₂ O (1,0/1000; <i>v/v</i>) (pH = 2,1)	Gradient

Tabelle 5.6: Übersicht über die optimalen Bedingungen zur Analyse eines Colistin-Standards mit LC-Fluoreszenzdetektion mittels Nachsäulenderivatisierung

Bedingung	Ergebnis
Säule	Jupiter proteo (<i>phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg, Deutschland</i>), 150 x 2 mm
Säulentemperatur	T = 35 °C
Derivatisierungsreagenz	Nr. 4 (Tabelle 5.4);
Fluss	0,5 mL/min
Fließmittel	A: TFA/ACN (1,0/1000; <i>v/v</i>) (pH = 1,6) B: TFA/H ₂ O (1,0/1000; <i>v/v</i>) (pH = 2,1)
Fluss	0,15 mL/min
Gradient	Gradient 4 (Tabelle 5.7)
λ_{excit} [nm]	330 nm
λ_{emiss} [nm]	430 nm

Tabelle 5.7: Übersicht über die verwendeten LC-Gradienten

Zeit [min]	Gradient 1			Gradient 2			Gradient 3			Gradient 4		
	Fluss [mL/min]	A ^a [%]	B ^b [%]	Fluss [mL/min]	A ^a [%]	B ^b [%]	Fluss [mL/min]	A ^a [%]	B ^b [%]	Fluss [mL/min]	A ^c [%]	B ^b [%]
0,0	0,30	20	80	0,18	19	81	0,15	19	81	0,15	22	78
0,5				0,18	19	81	0,15	19	81	0,15	22	78
10,0	0,30	20	80				0,15	20	80			
15,0				0,18	20	80	0,15	21	79	0,15	24	76
20,0							0,15	22	78			
25,0				0,18	21	79	0,15	23	77	0,15	24	76
30,0							0,15	23	77			
35,0	0,30	30	70	0,18	22	78	0,15	19	81			
40,0										0,15	80	20
45,0	0,30	20	80	0,18	23	77						
50,0				0,18	23	77						
55,0	0,30	20	80	0,18	19	81				0,15	22	78
60,0				0,18	19	81	0,15	19	81			
70,0										0,15	22	78

^aFließmittel A: ACN^bFließmittel B: TFA/H₂O (1,0/1000; v/v) (pH = 2,1)^cFließmittel A: TFA/ACN (1,0/1000; v/v) (pH = 1,6)

Tabelle 5.8: Übersicht über die Methodenoptimierung

Säule (Ta- belle 5.3)	Fließ- mittel (Tabelle 5.5)	Fluss [mL/min]	Injektions- volumen [μ L]	cStandard [mg/L]	λ_{excit} [nm]	λ_{emiss} [nm]	OPA- Reagenz-Nr.	Fluss (OPA)	Säulentem- peratur
1	1	0,2	5	100, 500	305	375	1	0,5	35
1	1	0,2	5	500	305	375	1	0,4	35
1	1	0,2	5	500	305	375	1	0,6	35
1	2	0,3	10	10	330	465	1	0,5	35
1	3	0,3	10	10	330	465	1	0,5	35
3	4	0,3	10	10	330	465	2	0,5	35
3	4	0,3	10	10	330	465	3	0,5	35
3	4	0,3	10	10	330	465	4	0,5	35
3	5	0,15	10	10	330	465	5	0,5	35
3	3	0,3	20	10	330	465	4	0,5	35
4	3	0,3	10	10	330	465	4	0,5	35
4	6	0,18	10	10	330	465	4	0,5	35
2	3	0,3	20	10	330	465	4	0,5	35
5a	3	0,3	20	10	330	465	4	0,5	35
5a	6	0,18	10	1	330	465	4	0,5	35
5a	7	0,15	20	2	330	465	4	0,5	35
5a	7	0,15	20	2, 1	330	430	4	0,5	35
5a	8	0,15	20	1	330	430	4	0,5	35
5a	8	0,15	20	1	330	430	4	0,5	30
5a	8	0,15	20	1	330	430	4	0,5	40
5a	8	0,15	20	1	330	430	4	0,5	50
5a	8	0,15	20	1	330	430	4	0,5	60
5a	8	0,15	20	1	330	430	4	0,5	70
5a	8	0,15	20	1	330	430	7	0,5	35

5.2.2 LC-ESI-MS/MS (*Varian*)

Massenspektrometer

Massenspektrometer:	1200 L Quadrupole MS mit Ion Electrospray zur Ionisierung (<i>Varian Deutschland GmbH</i> , Darmstadt, Deutschland)
Stickstoffgenerator:	Modell 75-72, (<i>Balston jetzt Parker Hannifan GmbH</i> , Kaarst, Deutschland)
Spritzenpumpe:	Model 11 Plus, (<i>Harvard Apparatus GmbH</i> , March-Hugstetten, Deutschland)
ESI-Modus:	positiv
ESI-Nadelspannung:	4800 V
Trockengas:	Stickstoff
Trockengas-Temperatur:	200 °C - 350 °C
Trockengas-Druck:	19 psi (= 1,31 bar)
Nebulizing Gas:	53,1 °C
Capillary (Cone/Skimmer):	45 V
Q1 (MS1 Ion Energy):	0,5 V
Shield:	600 V
Detektor:	1260 V
API-Housing-Temperatur (Quellentemperatur):	50 °C
Kollisionsgas:	Argon 5.0 (99,999 %)
Druck in der Stoßzelle:	1,5 – 3,3 mTorr (= 0,0019 – 0,0044 mbar)
SIM width:	0,700 amu
Scan-time:	0,800 sec, für MS/MS-Versuche 1,000 sec

Tabelle 5.9: Direktinjektion in das Massenspektrometer

<i>drying-gas</i> [°C]	Detektor [V]	Needle [V]	Scan-Bereich
200	1260	4800	100,0 - 1300,0

Die höchste Empfindlichkeit des Massenspektrometers wurde zunächst für die Quadrupole 1 und 3 über die automatische Einstellung (*AutoTune*) erreicht. Der direkte Einlass der Colistinlösung in das Massenspektrometer erfolgte über eine Spritzenpumpe bei einem Fluss von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Die Konzentration der Colistinlösung betrug 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Die Verdünnung der Stammlösung erfolgte mit ACN/ H_2O (2/8; v/v) bzw. MeOH/ H_2O (2/8; v/v). Auf diese Weise erhielt man kontinuierliche Massenspektren von Colistin und konnte die Systemeinstellungen wie Detektorspannung oder neue Ionenmassen zum Tunen hinzufügen. Allerdings führten die veränderten Einstellungen zu keiner höheren Empfindlichkeit, so dass die Einstellungen des *AutoTune* übernommen wurden.

Bei den nachfolgenden Experimenten mit unterschiedlichen Fließmitteln und Verdünnungs-Lösungsmitteln wurde die Probelösung über eine 5 μL Probeschleife injiziert und das Fließmittel (isokratische Bedingungen) mit einem Fluss von 0,3 mL/min über die Spritzenpumpe geleitet.

Tabelle 5.10: Manuelle Injektion über eine Probeschleife und Zugabe des Fließmittels über die Spritzenpumpe

Verdünnungs-Lösungsmittel	Fließmittel
ACN/ H_2O (2/8; v/v)	ACN/ H_2O (2/8; v/v)
ACN/ H_2O (2/8; v/v)	1 mM NH_4Ac in 0,5 % HFO/ACN (8/2; v/v)
1 mM NH_4Ac in 0,1 % HFO/ACN (8/2; v/v)	1 mM NH_4Ac in 0,1 % HFO/ACN (8/2; v/v)
1 mM NH_4Ac in 0,5 % HFO/ACN (8/2; v/v)	ACN/ H_2O (2/8; v/v)
1 mM NH_4Ac in 0,5 % HFO/ACN (8/2; v/v)	0,5 mM NH_4Ac in 0,25 % HFO/ACN (8/2; v/v)
0,5 mM NH_4Ac in 0,25 % HFO/ACN (8/2; v/v)	0,5 mM NH_4Ac in 0,25 % HFO/ACN (8/2; v/v)
ACN/ H_2O (2/8; v/v)	0,5 mM NH_4Ac in 0,25 % HFO/ACN (8/2; v/v)

Weitere Injektionsversuche dienten der Feststellung der optimalen *drying-gas*-Temperatur. Zusätzlich wurden die Höhe der *spray-needle* (*y*-adjustment) und deren Abstand zur Einlasskapillare (*x*-adjustment) geringfügig variiert. Diese Variation der *spray-needle* Stellung zeigte keinerlei Änderungen.

Die anschließenden Fragmentierungs-Experimente erfolgten ebenfalls über die Direktinfusion von Colistin-Standardlösungen. Als Kollisionsgas wurde Argon (Reinheit 99,999 %) eingesetzt, die *drying-gas*-Temperatur lag bei 300 °C. Der Druck in der Kollisionszelle und die Lösungsmittel wurden variiert.

Tabelle 5.11: Fragmentierungsverhalten von Colistin und Polymyxin B, *drying-gas* 300 °C, Detektor 1260 V, Needle 4800 V

Vorläufer-Ion [<i>m/z</i>]	Druck in der Kollisionszelle [mTorr]	Lösungsmittel	c (Colistin) [mg/kg]	Peak Intensität
586	1,6	A: 0,05 % HFO in ACN	1	7,4e +7
		B: 0,05 % HFO in ACN + 0,05 mM NH ₄ Ac (5/95; <i>v/v</i>)		
		A/B: 30/70; <i>v/v</i>		
579	1,7	dito	1	2,3e +7
586	3,3	dito	10	5,2e +7
603	1,5	dito	1	1,6e +7
586	1,6	0,01 M HCl-Lösung	10	0,4e +7
585	1,8	dito	10	0,1e +7
587	1,9	dito	10	0,4e +7
579	1,9	0,01 % TFA-ACN/0,01 % TFA-H ₂ O 2/8; <i>v/v</i>	10	2,0e +7
586	1,9	dito	10	6,3e +7

5.2.3 LC-ESI-MS/MS (*Micromass*)

5.2.3.1 Massenspektrometer

Massenspektrometer:	Quattro LC 9011 Triple Quadrupol mit Ion Electrospray zur Ionisierung (<i>Micromass-Waters GmbH</i> , Eschborn, Deutschland)
Stickstoffzeuger:	Modell 75-72 (<i>Parker Hannifin GmbH</i> , Kaarst, Deutschland)
Spritzenpumpe:	Model 11 Plus (<i>Harvard Apparatus GmbH</i> , March-Hugstetten, Deutschland)
ESI-Modus:	positiv
<i>Capillary (Needle):</i>	2,0 kV
<i>Cone:</i>	30 V (Skimmer)
<i>Dwell-Time:</i>	0,2 s bzw. 0,5 s
Extraktor:	3 V
<i>RF-Lens:</i>	0,15 V
Quellentemperatur:	100 °C (Source Block Temp.)
Desolvation Temperatur:	350 °C
<i>Nebulizer-Gas:</i>	100 L/h (<i>Cone Gas Flow</i>)
<i>Drying-Gas</i> (Stickstoff):	300 L/h (<i>Desolvation Gas Flow</i>)
<i>MS1 Low Mass/High Mass</i>	
<i>Resolution:</i>	12
<i>MS1-Ion-Energy:</i>	0,8 V
<i>MS-Entrance:</i>	2 V
<i>Collision-Energy:</i>	10 eV
Kollisionsgas:	Argon 5.0 (99,999%)
Druck in der Stoßzelle:	0,0013 mbar
MS-Exit:	1 V
<i>MS2 Low Mass/High Mass</i>	
<i>Resolution:</i>	15
<i>MS2-Ion-Energy:</i>	1,0 V
<i>MS Multiplier:</i>	650 V
Datenaufnahme:	MS/MS-Modus: multiple reaction monitoring (MRM)
Datenregistrierung und -auswertung:	Software MassLynx 3.2 für Windows NT (<i>Micromass Waters GmbH</i> , Eschborn Deutschland)

Zur Entwicklung der neuen MS/MS-Methode wurde das Massenspektrometer zunächst im MS-Modus auf maximale Empfindlichkeit eingestellt. Dazu wurde eine Standard-Lösung ($c = 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$) direkt über die Spritzenpumpe injiziert ($50 \mu\text{L}/\text{min}$). Für die Direktinjektion wurde der Desolvation-Gas-Fluss auf $200 \text{ L}/\text{h}$ reduziert. Anschließend erfolgte unter gleichen Bedingungen die Optimierung im MS/MS-Modus. Durch Variation der Systemparameter wie *Cone*-Spannung, Kollisionsenergie und Kapillar-Spannung wurden die Einstellungen gewählt, bei denen charakteristische Fragmentationen mit der größten Signalintensität resultierten. Einen Überblick über die getesteten Bedingungen gibt Tabelle 5.13.

5.2.3.2 LC-System

Agilent:	1100 Serie (<i>Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG</i> , Waldbronn, Deutschland)
Pumpe:	Binäre Pumpe
Entgaser:	Vakuumentgaser
Säulenofen:	Temperatur: $35 \text{ }^\circ\text{C}$
automatischer thermostatisierter	
Autosampler/Injektor:	Tray-Temperatur: $10 \text{ }^\circ\text{C}$, $100 \mu\text{L}$ -Schleifenkapillare mit automatischer Nadelpülung, $50 \mu\text{L}$ (Standardinjektionsvolumen)

5.2.3.3 LC-Säulen

Die Trennung der Analyten erfolgte standardmäßig auf der Trennsäule „Jupiter Proteo“ von *phenomenex*. Zur Validierung wurde die Trennsäule mit der Dimension $100 \times 2,0 \text{ mm}$ (Tabelle 5.12) verwendet.

Tabelle 5.12: Säule zur chromatographischen Trennung von Colistin mittels massenspektrometrischer Detektion

Hersteller	Material	Dimension [mm]	Partikelgröße [μm]	Porendurchmesser [Å]
<i>phenomenex</i>	Jupiter Proteo C12	$100 \times 2,0$	4	90

Tabelle 5.13: Bedingungen zur Entwicklung der MS/MS-Methode

Substanz	Konzentration	Lösungsmittel	Cone-Spannung [V]	Kollisionsenergie [eV]	Kapillarspannung [kV]	Source Block [°C]	Desolvation [°C]
Polymyxin B	1 µg/mL	0,1 % HFO	35	-	3	120	250
Polymyxin B	1 µg/mL	0,1 % HFO	35	25	3	120	250
Colistin	1 µg/mL	0,01 M HCl	34	-	3	120	250
Colistin	1 µg/mL	9 mM NH ₄ Ac/1,3 % HFO	30	-	3	120	250
Colistin	1 µg/mL	1 mM NH ₄ Ac/0,5 % HFO	30	-	3	120	250
Colistin	1 µg/mL	0,1 % HFO	30	-	3	120	250
Colistin	1 µg/mL	1 mM NH ₄ Ac/0,5 % HFO	30	20	3	120	250
Colistin	1 µg/mL	1 mM NH ₄ Ac/0,5 % HFO	30	23	3	120	250
Colistin	1 µg/mL	1 mM NH ₄ Ac/0,5 % HFO	30	25	3	120	250
Colistin	1 µg/mL	1 mM NH ₄ Ac/0,5 % HFO	30	28	3	120	250
Colistin	1 µg/mL	1 mM NH ₄ Ac/0,5 % HFO	30	30	3	120	250
Colistin	1 µg/mL	0,1 % HAc/ACN (88/12, v/v)	30	10	2,5	100	250
Colistin	1 µg/mL	0,1 % HAc/ACN (88/12, v/v)	30	10	2,5	100	350

Tabelle 5.13: Bedingungen zur Entwicklung der MS/MS-Methode

Colistin	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 mM $\text{NH}_4\text{FO}/\text{ACN}$ (88/12, v/v)	30	10	2	100	350
----------	---------------------------	--	----	----	---	-----	-----

Tabelle 5.14: Parametereinstellungen für die LC-ESI-MS/MS-Methode

Analyt	Vorläufer-Ion [m/z]	Fragment (Quantifier / Qualifier Ion)	Dwell [sec]	Kollisionsenergie [eV]	Cone-Spannung [V]
Colistin B	579	579	0,5	10	30
Colistin A	586	586	0,5	10	30
Polymyxin B	603	603	0,5	10	30

5.2.3.4 LC-Bedingungen

Der Gradient basierte auf einem binären Fließmittelsystem mit 1 M NH₄FO/HFO/H₂O/ACN (1/15/984/50; *v/v/v/v*) (pH = 2,3) und 0,1 % HFO in ACN (pH = 1,6). Der entsprechende Gradient ist in der nachfolgenden Tabelle 5.15 aufgeführt.

Tabelle 5.15: Gradient zur chromatographischen Trennung von Colistin mittels massenspektrometrischer Detektion

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	A ^a [%]	B ^b [%]
0	0,25	91	9
2	0,25	91	9
20	0,25	70	30
25	0,25	20	80
30	0,25	20	80
35	0,25	91	9
45	0,25	91	9

^aFließmittel A: 1 M NH₄FO/HFO/H₂O/ACN (1/15/984/50; *v/v/v/v*) (pH = 2,3)

^bFließmittel B: 0,1 % HFO in ACN (pH = 1,6)

5.3 Erarbeitung der Probenaufarbeitung

Für alle Bestimmungen war eine homogene Verteilung der Zielanalyten in der Matrix Voraussetzung. Dazu wurden sämtliche Milchproben vor jeder weiteren Probenaufarbeitung durch gutes Durchschütteln homogenisiert.

5.3.1 Aufarbeitung von Milch - Extraktion mit TCA

In ein 50 mL Zentrifugenglas wurden exakt 10 mL Milch pipettiert, mit 2 mL 10 %ige TCA versetzt und mithilfe eines Horizontalschüttlers 10 min (300/min) geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren (2500 U/min, 5 °C, 30 min) wurde der Überstand in ein 20 mL Messkolben überführt, anschließend 0,2 mL 1 M NaOH-Lösung hinzugefügt und mit MeOH/

0,01 M HCl (1/1; *v/v*) aufgefüllt. Ein Aliquot von 2 mL wurde mittels Festphasenextraktion (*Chromabond C18ec*, 500 mg/6 mL) gereinigt und aufkonzentriert.

1. Konditionieren mit 2 mL MeOH
2. Äquilibrieren mit 2 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1; *v/v*)
3. Probenaufgabe von 2 mL
4. Elution mit 1 mL MeOH/0,01 M HCl (55/45; *v/v*)

Parallel dazu wurde einer weiteren Probe 1 mL eines Colistin-Standards (Sigma, $c = 100 \text{ mg/L}$ in 0,01 M HCl) zudotiert, die absolute Konzentration von Colistin im Injektionsvolumen betrug dabei 100 ng. Das Eluat diente der LC-Fluoreszenzbestimmung an einer Jupiter Proteo (150 x 2 mm) mit dem in Tabelle 5.16 aufgeführten Gradienten. Die weiteren Bedingungen sind der Tabelle 5.6 zu entnehmen. Das Injektionsvolumen betrug 10 μL .

Tabelle 5.16: Gradient zur chromatographischen Trennung von Colistin in Rohmilch mit Fluoreszenzdetektion

Gradient				Gradient			
Zeit [min]	Fluss [mL/min]	A ^a [%]	B ^b [%]	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	A ^a [%]	B ^b [%]
0	0,18	17	83	50	0,18	22	78
5	0,18	17	83	60	0,18	23	77
10	0,18	18	82	65	0,18	23	77
20	0,18	19	81	70	0,18	20	80
30	0,18	20	80	75	0,18	17	83
40	0,18	21	79	85	0,18	17	83

^aFließmittel A: ACN

^bFließmittel B: TFA/H₂O (1,0/1000; *v/v*) (pH = 2,1)

5.3.2 Aufarbeitung für die Gelfiltrationschromatographie

In ein 50 mL Zentrifugenglas wurden exakt 10 mL Milch pipettiert, mit 2 mL 10 %ige TCA versetzt und mithilfe eines Horizontalschüttlers 15 min (300/min) geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren (2500 U/min, 20 °C, 40 min) wurde der Überstand in ein 20 mL Messkolben überführt, anschließend 0,2 mL 1 M NaOH-Lösung hinzugefügt und mit MeOH/0,01 M HCl (1/1; v/v) aufgefüllt. 10 mL Probelösung wurden mittels Festphasenextraktion (*Chromabond C18ec*, 500 mg/6 mL) gereinigt und aufkonzentriert.

1. Konditionieren und Äquilibrieren mit 2 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1; v/v)
2. Probenaufnahme von 10 mL
3. Elution mit 2 x 2 mL MeOH/0,01 M HCl-Lösung (55/45; v/v)

Das Eluat wurde im Stickstoffstrom bei 35 °C auf ca. 0,5 mL eingeeengt, auf genau 1 mL mit 0,01 M HCl aufgefüllt und mittels LC-Fluoreszenzdetektion chromatographiert. LC-Bedingungen sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL.

5.3.2.1 Gelfiltration

Ein Aliquot des aufkonzentrierten Eluates aus 5.3.2 wurde der Gelfiltrations-Chromatographie zugeführt.

GFC-System zur Probenaufreinigung:

Autosampler/Injektor: AS-2000A, (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland), 100 µL Probenschleife, Injektionsvolumen: 50 µL

Integrator: Chromato-Integrator D-2500 (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland)

Pumpe: LC-COMPACT PUMP (*Bischoff Analysetechnik und -geräte GmbH*, Leonberg, Deutschland)

Degaser: DG-1310, Degasys (*VDS optilab Chromatographie Technik GmbH*, Berlin, Deutschland)

UV-Detektor: L-4000, (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland) $\lambda = 215$ nm

Fraktionssammler: L-5200, (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland)

GFC-Säule:	<i>Superdex® Peptide</i> HR 10/30 (<i>Amersham Biosciences Europe GmbH</i> , Freiburg, Deutschland), Artikelnummer: 17145301
Fließmittel:	ACN/0,1 % wässrige TFA (35/65; <i>v/v</i>) + 0,25 M NaCl (pH = 1,9)
Fluss:	0,3 mL/min

Die gesammelte Fraktion wurde bei 40 °C im Stickstoffstrom auf ca. 0,5 mL eingengt, mit 0,01 M HCl auf genau 1 mL aufgefüllt und mittels LC- analysiert. LC-Bedingungen sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst. Das Injektionsvolumen betrug 20 μ L.

5.3.3 Kartuschen für die *solid phase extraction*

Für diese Versuche wurden jeweils 1 mL eines 1 mg/L *Sigma*-Colistin-Standards bzw. CR-Colistin-Standards nach dem Konditionieren und Äquilibrieren auf die SPE-Kartusche gegeben. Die absolute Konzentration betrug somit 1 μ g Colistinsulfat absolut. Die Versuchsbedingungen sind in der Tabelle 5.17 aufgeführt.

Tabelle 5.17: Ergebnisse der SPE-Kartuschen-Versuche

Kartusche	Konditionieren/Äquilibrieren	Waschen	Eluieren	Eluatbehandlung	Colistin A	WDF [%]	Colistin B
<i>Chromabond</i> C18ec 6 mL/500 mg	1. 2 ml MeOH 2. 2 ml MeOH/0,01 M HCl (1/1)*		2 x 1 mL und 1 x 2 mL MeOH/0,01 M HCl (55/45)*	30' bei 40 °C im Stickstoffstrom auf 1 mL eingeeengt	40		57
<i>Chromabond</i> C18ec 6 mL/500 mg	1. 2 ml MeOH 2. 2 ml MeOH/0,01 M HCl (1/1)*		2 x 1 mL und 1 x 2 mL ACN/0,1 % TFA (2/8)*	30' bei 40 °C im Stickstoffstrom auf 1 mL eingeeengt	n.n.		n.n.
<i>Chromabond</i> C18ec 6 mL/500 mg	1. 2 mL MeOH 2. 2 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1)*		2 x 1 mL und 1 x 2 mL ACN/0,1 % TFA (55/45)*	30' bei 40 °C im Stickstoffstrom auf 1 mL eingeeengt	44		51
<i>Chromabond</i> C18ec 6 mL/500 mg	2 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1)*		1 x 2 mL MeOH/0,01 M HCl (55/45)*	30' bei 40 °C im Stickstoffstrom auf 2 mL eingeeengt	67		75
<i>Chromabond</i> C18ec 6 mL/500 mg	2 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1)*		4 x 1 mL MeOH/0,01 M HCl (55/45)*	30' bei 40 °C im Stickstoffstrom auf 2 mL eingeeengt	80		90
<i>Chromabond</i> C18ec## 6 mL/500 mg	3 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1)*	2 mL ACN/0,1 %TFA (2/8)*	3 x 2 mL MeOH/0,01 M HCl (55/45)*	auf 7 mL aufgefüllt mit 0,01 M HCl	104		93
<i>Chromabond</i> C18ec## 6 mL/500 mg	3 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1)*	2 mL ACN/H ₂ O (2/8)*	3 x 2 mL MeOH/0,01 M HCl (55/45)*	auf 7 mL aufgefüllt mit 0,01 M HCl	9		6
<i>Chromabond</i> C18ec 1 mL/100 mg	1 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1)*		3 x 1 mL MeOH/0,01 M HCl (55/45)*	30' bei 40 °C im Stickstoffstrom auf 1 mL eingeeengt	6		5
<i>Chromabond</i> C18ec# 6 mL/500 mg	1. 6 mL MeOH 2. 6 mL 5% igeNH ₃ -Lsg	1. 3 mL 5 % ige NH ₃ -Lsg 2. 2 mL 1 N H ₂ SO ₄	3 x 3 mL MeOH / 0,01 M HCl (55/45)*	auf 10 mL aufgefüllt mit 0,01 M HCl	99		113

Tabelle 5.17: Ergebnisse der SPE-Kartuschen-Versuche

Kartusche	Konditionieren/Äquilibrieren	Waschen	Eluieren	Eluatbehandlung	Colistin A	WDF [%] Colistin B
<i>Chromabond</i> C18sec## 6 mL/500 mg	1. 6 mL MeOH 2. 6 mL NaOH-Lsg (pH = 9,85)	3 mL H ₂ O	3 x 3 mL MeOH/0,01 M HCl (55/45)*	auf 10 mL aufgefüllt mit 0,01 M HCl	33	97
<i>IST Separatis</i> C18 10 mL/500 mg	1. 2 mL MeOH 2. 2 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1)*	HCl	2 x 1 mL und 1 x 2 mL MeOH/0,01 M HCl (55/45)*	30' bei 40 °C im Stickstoffstrom wieder auf 1 mL eingeengt	38	64
<i>IST Separatis</i> C18 10 mL/500 mg	1. 2 mL MeOH 2. 2 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1)*	HCl	2 x 1 mL und 1 x 2 mL ACN/0,1 % TFA (2/8)*	30' bei 40 °C im Stickstoffstrom auf 1 mL eingeengt	n.n.	n.n.
<i>IST Separatis</i> C18 10 mL/500 mg	1. 2 mL MeOH 2. 2 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1)*	HCl	2 x 1 mL und 1 x 2 mL ACN/0,1 % TFA (55/45)*	30' bei 40 °C im Stickstoffstrom auf 1 mL eingeengt	44	52
<i>Bond Elut</i> SCX ** 500 mg/3 mL	6 mL MeOH 6 mL MeOH/0,01 M (1/1)*	3 mL H ₂ O 3 mL ACN/H ₂ O (2/3)* 3 mL 1 M KAc/ACN (3:1)*	1 x 3 mL 1 M K ₃ BO ₃ /ACN/TEA (40/10/0,5)*	auf 5 mL aufgefüllt mit 0,1 M HCl	59	52
<i>Bond Elut</i> SCX ** 500 mg/3 mL	6 mL MeOH 6 mL MeOH/0,01 M (1/1)*	3 mL H ₂ O 3 mL ACN/H ₂ O (2/3)* 3 mL 1 M KAc/ACN (3/1)*	2 x 2 mL 1 M K ₃ BO ₃ /ACN/TEA (40/10/0,5)* (pH = 10,9)	auf 6 mL aufgefüllt mit 0,1 M HCl	82	90
<i>Bond Elut</i> SCX ** 500 mg/3 mL	6 mL MeOH 6 mL MeOH/0,01 M (1/1)*	3 mL H ₂ O 3 mL ACN/H ₂ O (2/3)* 3 mL 1 M KAc/ACN (3/1)*	2 x 2 mL 1 M KAc/ACN/TEA (40/10/0,05)* mit KOH auf pH = 11,0 eingestellt	auf 6 mL aufgefüllt mit 0,1 M HCl	n.n.	n.n.

* Bei den angegebenen Verhältnissen handelt es sich um Volumenverhältnisse

** Die aufgebene Probenmenge betrug hier 0,05 µg

Die aufgebene Probenmenge betrug hier 5 µg absolut

Die aufgebene Probenmenge betrug hier 10 µg absolut

5.3.4 Aufarbeitung - Extraktion mittels TCA/ACN

In ein 50 mL Zentrifugenglas wurden exakt 5 mL Milch pipettiert, mit 2 mL 10 %ige TCA/ACN-Lösung (2/3; v/v) versetzt, dannach mithilfe eines Horizontalschüttlers 10 min (300/min) geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren (2500 U/min, 0 °C, 20 min) erfolgte die Reinigung des gesamten Überstandes mittels Festphasenextraktion (*Chromabond C18ec*, 500 mg/6 mL) wie folgt:

1. Konditionieren mit 6 mL MeOH
2. Äquilibrieren mit 6 mL 5 %iger Ammoniak-Lösung
3. Probenaufnahme des ganzen Überstandes
4. Waschen mit 2 mL 5 %iger Ammoniak-Lösung
5. Waschen mit 2 mL 1 N Schwefelsäure-Lösung
6. Elution mit 3 x 3 mL MeOH/0,01 M HCl-Lösung (55/45; v/v)

Tabelle 5.18: Gradient zur Bestimmung von Colistin in Milch

Gradient				Gradient			
Zeit [min]	Fluss [mL/min]	A ^a [%]	B ^b [%]	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	A ^a [%]	B ^b [%]
0	0,15	22	78	40	0,15	80	20
5	0,15	22	78	45	0,15	80	20
15	0,15	24	76	60	0,15	22	78
25	0,15	24	76	90	0,15	22	78

^aFließmittel A: TFA/ACN (1,0/1000; v/v) (pH = 1,6)

^bFließmittel B: TFA/H₂O (1,0/1000; v/v) (pH = 2,1)

Das Eluat wurde mit 0,01 M Salzsäurelösung auf genau 10 mL aufgefüllt, wobei im Eluat eine geringe Niederschlagsbildung beobachtet werden konnte.

Parallel dazu wurde einer weiteren Probe 500 μL eines Colistin-Standards (CRS, $c = 10 \text{ mg/L}$ in 0,01 M HCl) zudosiert. Die absolute Konzentration von Colistin im Injektionsvolumen betrug dabei 20 ng. Das Eluat wurde mittels LC-Bestimmung an einer Jupiter Proteo (150 x 2 mm) mit dem in Tabelle 5.18 aufgeführten Gradienten chromatographiert. Weitere Bedingungen sind Tabelle 5.6 zu entnehmen. Das Injektionsvolumen betrug 20 μL .

5.3.5 Ultrafiltration

Jeweils 2 mL Milch wurden in einen mit Wasser vorbehandelten Ultrafilter gegeben.

Tabelle 5.19: Ultrafiltration der Milchproben

Ultrafilter	Probe
5 kDa	2 mL Leerwertprobe
5 kDa	2 mL dotierte Probe ($c = 100 \mu\text{g/L}$)
10 kDa	2 mL Leerwertprobe
10 kDa	2 mL dotierte Probe ($c = 100 \mu\text{g/L}$)

Zentrifugieren: 3 x 25 Minuten (4000 U/min, 25 °C). Das Permeat betrug jeweils ca. 1 mL. Es wurde mit 1 mL 10%ige TCA/ACN-Lösung (2/3; v/v) versetzt, nochmals 15 Minuten bei 4000 U/min und 0 °C zentrifugiert und die wässrige Phase mittels Festphasenextraktion (*Chromabond* C18ec, 500 mg/6 mL) wie folgt gereinigt:

1. Konditionieren mit 6 mL MeOH
2. Äquilibrieren mit 6 mL 5%iger Ammoniak-Lösung
3. Probenaufgabe des ganzen Überstandes
4. Waschen mit 2 mL 5%iger Ammoniak-Lösung
5. Waschen mit 2 mL 1 N Schwefelsäure-Lösung
6. Elution mit 3 x 1 mL MeOH/0,01 M HCl-Lösung (55/45; v/v)

Das Eluat wurde mit 0,01 M HCl-Lösung auf genau 4 mL aufgefüllt. Im Eluat wurde eine geringe Niederschlagsbildung beobachtet. Die chromatographische Bestimmung erfolgte wie in Abschnitt 5.3.4 beschrieben.

5.3.6 Aufarbeitung - Extraktion mit Oxalsäure und TCA/HCl

Es wurden zunächst genau 10 mL Milch in ein 50 mL Zentrifugenglas mit Schraubdeckel gegeben, dazu anschließend 2 mL 0,6 mol/L Oxalsäure, die Lösung dann 20 Minuten geschüttelt und zentrifugiert (2500 U/min, 20 °C, 30 Minuten). Der Überstand wurde mit 15 mL 0,5 mol/L HCl/0,3 mol/L (= 5%ig) TCA (1/1; v/v) versetzt, 15 Minuten geschüttelt und bei 2500 U/min und 20 °C 30 Minuten zentrifugiert. Die Reinigung der wässrigen Phase erfolgte anschließend an einer *Chromabond* C18ec-Kartusche wie folgt:

1. Konditionieren und Äquilibrieren mit 2 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1; v/v)
2. Probenaufgabe des ganzen Überstandes
3. Waschen: 2 mL ACN/0,1 % TFA in H₂O (2/8; v/v)
4. Elution mit 3 x 2 mL MeOH/0,01 M HCl-Lösung (55/45; v/v)

Das Eluat wurde in einem graduierten Reagenzglas aufgefangen und mit Wasser anschließend auf 7 mL aufgefüllt.

Parallel dazu wurde einer weiteren Probe 500 µL des Colistin-Standards (CRS, $c = 1 \text{ mg/L}$ in 0,01 M HCl, entspricht einer Konzentration von 50 µg/L in der Milch) zudoziert. Die absolute Konzentration von Colistin im Injektionsvolumen betrug dabei 2,5 ng. Die Eluate wurden mittels LC-Bestimmung an einer Jupiter Proteo (150 x 2 mm) mit dem in Tabelle 5.20 aufgeführten Gradienten chromatographiert. Als Derivatisierungsreagenz diente OPA-Nr. 4 mit einem Fluss von 0,5 mL/min, detektiert wurde bei $\lambda_{\text{excit}} = 330 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{emiss}} = 430 \text{ nm}$. Das Injektionsvolumen betrug 50 µL. Die massenspektrometrische Detektion ist unter Abschnitt 5.2.3.4 dargelegt.

Tabelle 5.20: Gradient zur Bestimmung von Colistin in Milch mittels LC-Fluoreszenzdetektion

Gradient				Gradient			
Zeit [min]	Fluss [mL/min]	A ^a [%]	B ^b [%]	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	A ^a [%]	B ^b [%]
0	0,15	19	81	60	0,15	24	76
10	0,15	19	81	75	0,15	80	20
15	0,15	23	77	80	0,15	80	20
25	0,15	23	77	95	0,15	19	81
45	0,15	24	76	120	0,15	19	81

^aFließmittel A: TFA/ACN (1,0/1000; *v/v*) (pH = 1,6)

^bFließmittel B: TFA/H₂O (1,0/1000; *v/v*) (pH = 2,1)

5.4 Validierung der Untersuchungsmethode

Die Validierung der Untersuchungsmethode kann entsprechend der EG-Entscheidung entweder nach dem herkömmlichen oder dem alternativen Verfahren erfolgen. In jedem Fall waren kritische Faktoren (Merkmale) der Probenaufarbeitung, die die Messergebnisse beeinflussen können, zu hinterfragen und zu berücksichtigen. Bei der Probenaufarbeitung sollten die Schritte verwendet und kombiniert werden, die sich in Vorversuchen als geeignet erwiesen hatten.

Die wesentlichste Auswirkung der EG-Entscheidung betrifft den zu leistenden Mehraufwand bei der Validierung der Bestätigungsverfahren. Der Untersuchungsumfang nach herkömmlichem Verfahren umfasst mindestens 80 Probenuntersuchungen, um das Ausmaß systematischer und zufälliger Fehler auf das Untersuchungsergebnis zu bewerten. Nach dem in der EG-Entscheidung vorgeschlagenen alternativen Verfahren sind die Aussagen mit nur 32 Probenuntersuchungen möglich. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe statistischer Versuchsplanung durch simultanes Variieren der Einfluss mehrerer Faktoren bestimmt. Das zugrunde liegende statistische Modell ist als Software (*InterVal*) kommerziell erhältlich und wird auch im Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebens-

mittelsicherheit, dem EU- und nationalem Referenzlabor für Rückstände, verwendet. Voraussetzung für diese Vorgehensweise ist, dass die dem Modell zugrunde liegenden Validierungsstrategie, Annahmen und Formeln dargelegt oder auf die entsprechenden Quellen verwiesen wird (JÜLICHER U. A. (1998, 1999)).

Zusätzlich wurden die verfahrensunabhängigen Leistungskriterien wie Stabilität, Spezifität und Richtigkeit bestimmt.

5.4.1 Stabilitätstest

Für den Stabilitätstest wurde eine Standardlösung mit $c = 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ in 0,01 M HCl hergestellt, von dieser Lösung 64 Vials (je ca. 1 mL, Klarglas) befüllt. Im Dunkeln wurden 16 Vials bei -20°C , 16 weitere bei 6°C und 16 bei 20°C gelagert, die restlichen 16 im Hellen bei 20°C . Die Überwachung der Lagerungsbedingungen war im Rahmen des akkreditierten Labors ein vorgegebener Bestandteil. Die nahezu konstante Raumtemperatur war durch die Klimatisierung der Räume gegeben. Der pH-Wert der Lösungen betrug sowohl am Anfang als auch am Ende der Messungen $\text{pH} = 2,0$. Zur Stabilitätsmessung wurde jeweils ein Vial aus jeder Lagerungsbedingung entnommen, um weitere Einfrier-Auftau-Effekte zu vermeiden.

Tabelle 5.21: Lagerungsbedingungen für den Kalibrierstandard

Standard	Lagerungsbedingung
A	Dunkel -20°C
B	Dunkel $+6^\circ\text{C}$
C	Dunkel $+20^\circ\text{C}$
D	Hell $+20^\circ\text{C}$

Im Intervall von 1, 2, 3 und 4 Wochen wurde jeweils ein Kalibrierstandard aus jeder Lagerungsbedingung gemessen und mit einem frisch hergestellten Standard verglichen. Weitere zwölf Messungen aus jeder Lagerungsbedingung wurden anschließend im vierwöchigen Intervall durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.22 dargestellt. Angegeben ist der prozentuale Anteil des Restanalyten.

LC-Bedingungen: Fließmittel 8, Derivatisierungsreagenz: OPA-Nr. 4 mit einem Fluss von $0,5 \text{ mL}/\text{min}$, detektiert wurde bei $\lambda_{\text{excit}} = 330 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{emiss}} = 430 \text{ nm}$ (Bedin-

gungen siehe Tabellen 5.4 und 5.5). Das Injektionsvolumen betrug 20 μL . Am Ende der Versuchsreihe wurden die Kalibrierstandards der letzten Woche massenspektrometrisch vermessen (Scan-Modus, Bedingungen siehe Abschnitt 5.2.3).

5.4.2 Probenvorbereitung und –aufarbeitung für die Validierung

Tiefgefrorene Milchproben wurden über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und vor der Aufarbeitung durch Schütteln homogenisiert. Genau 10 mL Milch werden in ein 50 mL Zentrifugenglas mit Schraubdeckel gegeben. Anschließend wurden 2 mL 0,6 mol/L Oxalsäure hinzu gegeben, 15 bzw. 20 Minuten geschüttelt und zentrifugiert (2500 U/min, 20 °C, 20 bzw. 30 Minuten). Der Überstand wurde mit 15 mL 0,5 mol/L HCl/0,3 mol/L (= 5%ig) TCA (1/1; v/v) versetzt, 10 bzw. 15 Minuten geschüttelt und bei 2500 U/min und 20 °C 20 bzw. 30 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend an einer *Chromabond C18ec*-Kartusche wie folgt gereinigt:

1. Konditionieren und Äquilibrieren mit 2 mL MeOH/0,01 M HCl (1/1; v/v)
2. Probenaufgabe des ganzen Überstandes
3. Waschen: 2 mL ACN/0,1 % TFA in H₂O (2/8; v/v)
4. Elution mit 3 x 2 mL MeOH/0,01 M HCl-Lösung (55/45; v/v)

Das Eluat wurde in einem graduierten Reagenzglas aufgefangen und mit Wasser anschließend auf 7 mL aufgefüllt.

Tabelle 5.22: Ergebnisse der Kalibrierstandard-Stabilitäts-Untersuchungen in %

Lagerungsbe- dingungen	1*	2*	3*	4*	8*	12*	16*	20*	24*	28*	32*	36*	40*	44*	48*	52*	
A	E2	99,9	99,2	101,4	99,8	107,0	105,7	101,1	92,2	92,2	80,8	81,8	84,2	74,1	86,7	76,7	78,6
	E1	102,8	100,9	98,6	98,1	103,5	104,9	95,2	89,7	90,8	81,1	79,5	75,0	66,6	77,4	62,4	66,7
B	E2	102,0	107,7	107,7	98,3	113,1	109,8	111,5	107,6	108,6	100,7	110,4	101,1	90,7	104,4	96,6	98,5
	E1	98,7	104,9	106,3	99,9	112,4	111,7	110,6	109,2	112,8	109,5	107,6	101,1	90,3	103,4	93,3	96,2
C	E2	103,8	105,0	108,0	94,7	109,4	113,5	108,8	105,4	105,4	96,5	102,5	99,7	93,5	100,3	98,4	96,7
	E1	101,6	105,7	106,6	97,1	106,9	113	108,9	105,2	109,1	101,1	100,8	98,9	94,3	98,8	95,8	93,9
D	E2	100,0	94,7	98,6	86,0	96,4	97,0	96,2	92,4	98,3	81,6	86,6	79,7	76,9	85,3	61,5	61,1
	E1	98,1	93,7	95,1	86,8	92,2	95,3	95,1	90,5	100,7	84,5	86,0	77,5	75,9	80,9	53,2	51,1

* = Wochen

5.4.3 Versuchsplan

In Tabelle 5.23 sind die Merkmale aufgeführt, die in jeweils zwei Ausprägungen variiert wurden. Bei der Validierung der Untersuchungsmethode waren kritische Faktoren (Merkmale) der Probenaufarbeitung, die die Messergebnisse beeinflussen können zu hinterfragen. Die zu berücksichtigenden Faktoren waren gezielt zu verändern und ihre Auswirkungen zu bestimmen. Die Faktoren wurden in dem Rahmen verändert, wie sie im Routinelabor vorkommen. Die Untersuchung bezog sich dabei nicht auf einzelne Parameter, sondern auf mehrere Faktoren gleichzeitig. Die faktorielle Kombination mit Unterstützung des *InterVal*-Programms, ergab die in Tabelle 5.24 aufgeführten Kombinationen der Faktoren.

Die Konzentrationslevel (festgelegt durch die EG-Entscheidung) sowie das Dotierungsvolumen der 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CR-Colistinsulfat-Standardlösung zu 10 mL (= 10 g) Aliquot sind der Tabelle 5.25 zu entnehmen.

Tabelle 5.23: Merkmale (Faktoren) und deren verwendete Ausprägungen (Variationen)

Faktor	Variation	
	A	B
Bearbeiter	Laborantin	Autorin
Extraktionsdauer 1	15 Minuten	20 Minuten
Zentrifugierdauer 1	20 Minuten	30 Minuten
Extraktionsdauer 2	10 Minuten	15 Minuten
Zentrifugierdauer 2	20 Minuten	30 Minuten
Unterbrechung vor SPE	Ohne	mit
Charge der Kartuschen	Charge 1 (Nr. 14243)	Charge 2 (Nr. 24280)

Tabelle 5.24: Faktor Level-Kombination - Durchführungsplan

Lauf	Mitarbeiter	E1 ¹ [min]	Z1 ² [min]	E2 ¹ [min]	Z2 ² [min]	Unterbrechung vor SPE	Charge
S01	Lab	15	20	10	20	Nein	2
S02	Lab	15	30	10	30	Ja	1
S03	Lab	20	20	15	20	Ja	1
S04	Lab	20	30	15	30	Nein	2
S05	Aut	15	20	15	30	Nein	2
S06	Aut	15	30	15	20	Ja	1
S07	Aut	20	20	10	30	Ja	1
S08	Aut	20	30	10	20	Nein	2

Tabelle 5.25: Konzentrationslevel und Dotierungsvolumen für die Validierung

Konzentrationslevel	Volumen des CR-Standards ($c = 1 \mu\text{g}/\text{mL}$) zu 10 mL Milch-Aliquot [mL]
0	0
25 $\mu\text{g}/\text{L}$	0,25
50 $\mu\text{g}/\text{L}$	0,5
75 $\mu\text{g}/\text{L}$	0,75
100 $\mu\text{g}/\text{L}$	1

¹E1 = Extraktionszeit 1, E2 = Extraktionszeit 2²Z1 = Zentrifugierdauer 1, Z2 = Zentrifugierdauer 2

5.4.4 Messung

Der massenspektrometrische Nachweis und die Bestimmung von Colistin erfolgte mit der in Abschnitt 5.2.3 aufgeführten apparativen Ausstattung und dem dort beschriebenen Verfahren. Die Proben wurden einfach aufgearbeitet und analysiert, das Injektionsvolumen betrug $50 \mu\text{L}$.

5.4.5 Auswertung

Die Peakflächen von Colistin A und B wurden wegen der nicht optimalen Auflösung eines Matrixbestandteiles und Colistin A manuell integriert und mit dem Faktor 0,7 (Konzentrationsfaktor) korrigiert. Die Summe der jeweiligen Peakflächen von Colistin A und B sind in Tabelle 5.26 zusammengestellt.

Tabelle 5.26: Summe der Peakflächen von Colistin A und Colistin B korrigiert um den Konzentrationsfaktor 0,7

	19,5 ³	39,0 ³	58,4 ³	77,9 ³
Serie 01	3682	7473	11131	14687
Serie 02	3825	7538	10949	13994
Serie 03	3866	7582	11609	14949
Serie 04	3853	7652	11425	13673
Serie 05	4477	7664	10849	13397
Serie 06	3562	6701	10164	15259
Serie 07	3644	6724	10235	13353
Serie 08	3793	7946	11623	14809

Die Konzentration von Colistin (die Summe aus Colistin A und Colistin B) in Milch wurde mittels der externen Standard-Methode berechnet. Der funktionelle Zusammenhang zwischen der Konzentration an Colistin in der Probe und der sich daraus ergebenden Messwerte (Peakflächen) wird durch die Geradengleichung beschrieben:

³dotierte Konzentration an Colistin (bezogen auf die Summe aus Colistin A und Colistin B) in $\mu\text{g}/\text{kg}$

$$y = a + bx$$

x = Konzentration von Colistin
y = Peakfläche der Probe
b = Steigung der Kalibrierfunktion
a = Achsenabschnitt der Geraden

Abbildung 5.1: Geradengleichung

Anhand der Konstanten der Matrixkalibriergeraden ergaben sich die in Tabelle 5.27 angegebenen Kenngrößen.

$$x = \frac{\text{Peakflächeneinheit von Colistin} - a}{b}$$

Abbildung 5.2: Gleichung zur Berechnung der Konzentration von Colistin in Milch

Die Konzentrationen wurden in μg Colistin pro kg Milch angegeben.

Tabelle 5.27: Mittlere Kalibrierfunktion aus den Peakflächen zur Colistin-Bestimmung (Summe aus Colistin A und B) in Milch von vier Konzentrationsstufen (ohne Null) über den Arbeitsbereich von 1,25 – 5 ng Colistin nach Bestimmung LC-ESI-MS/MS 4

Analyt	a ⁵ [Area]	b ⁵ [Area/ $\mu\text{g/L}$]	s _y ⁵ [Area]	r ²	s _{x0} ⁵ [$\mu\text{g/L}$]	V _{x0} ⁵ [%]	cnf (a) ⁵ [Area]
Colistin A	409,0961	179,0626	529,73	0,9915	2,96	6,08	468,36

⁴Methode: Abschnitte 5.2.3 und 5.3.6

⁵Abk.: a, Achsenabschnitt; b, Steigung der Geraden; s_y, Reststandardabweichung; r², Bestimmtheitsmaß; s_{x0}, Verfahrensstandardabweichung; V_{x0}, Verfahrensvariationskoeffizient; cnf (a), Vertrauensbereich des Achsenabschnittes; Signifikanzniveau P = 95 % und Freiheitsgrad f = n-2

Tabelle 5.28: Summe der Konzentrationen von Colistin A und Colistin B korrigiert um den Konzentrationsfaktor 0,7

	19,5 ⁶	39,0 ⁶	58,4 ⁶	77,9 ⁶
Serie 01	18,3	39,5	59,9	79,7
Serie 02	19,1	39,8	58,9	75,9
Serie 03	19,3	40,1	62,6	81,2
Serie 04	19,2	40,5	61,5	74,1
Serie 05	22,7	40,5	58,0	72,5
Serie 06	17,6	35,1	54,5	82,9
Serie 07	18,1	35,3	54,9	72,3
Serie 08	18,9	42,1	62,6	80,4

5.4.6 Analytische Anforderungen für LC-MS-Analysemethoden

In der EG-Entscheidung werden Mindestforderungen an die Analysemethoden gestellt. So muss bei LC-MS-Verfahren die chromatographische Trennung mit geeigneten LC-Säulen durchgeführt werden. Die Retentionszeit für den Zielanalyten in der Analyseprobe muss im Vergleich zu derjenigen des Kalibrierstandards innerhalb eines Retentionszeitfensters von $\pm 2,5\%$ liegen. Zusätzlich darf die maximale Toleranz für die relative Ionenintensität $\pm 20\%$ für eine relative Intensität von $> 50\%$ des Basispeaks nicht überschreiten. Aufgrund des schlechten Fragmentierverhaltens von Colistin wurden in der vorliegenden Arbeit die Signalfächen der beiden „pseudo-Fragmentationen“ m/z 586 und m/z 579 ins Verhältnis gesetzt (siehe auch Abschnitt 3.2), das beim CR-Colistin-Standard 1,31 beträgt. Als zulässige Höchttoleranz für dieses Verhältnis wurde der Wert von $\pm 20\%$ zugrunde gelegt.

⁶dotierte Konzentration an Colistin (bezogen auf die Summe aus Colistin A und Colistin B) in $\mu\text{g}/\text{kg}$

Tabelle 5.29: Verhältnis der Signalflächen von m/z 586 zu m/z 579

Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	19,5	39,0	58,4	77,9
Serie 01	1,30	1,31	1,28	1,35
Serie 02	1,31	1,32	1,30	1,25
Serie 03	1,31	1,33	1,31	1,37
Serie 04	1,28	1,35	1,32	1,35
Serie 05	1,09	1,24	1,30	1,35
Serie 06	1,27	1,41	1,32	1,32
Serie 07	1,20	1,41	1,30	1,35
Serie 08	1,35	1,39	1,40	1,31

Tabelle 5.30: Retentionszeiten [min] der Analyten in den Analyseproben

Konzentrationslevel Colistin [$\mu\text{g}/\text{kg}$] (Komponente)	19,5 (Col A)	19,5 (Col B)	39,0 (Col A)	39,0 (Col B)	58,4 (Col A)	58,4 (Col B)	77,9 (Col A)	77,9 (Col B)
Serie 01	15,6	13,8	15,5	13,8	15,5	13,8	15,6	13,9
Serie 02	15,5	13,8	15,5	13,8	15,5	13,8	15,5	13,8
Serie 03	15,5	13,8	15,5	13,8	15,4	13,6	15,4	13,6
Serie 04	15,5	13,8	15,5	13,8	15,5	13,8	15,6	13,8
Serie 05	15,5	13,8	15,5	13,8	15,5	13,8	15,5	13,8
Serie 06	15,5	13,8	15,5	13,8	15,5	13,8	15,3	13,5
Serie 07	15,6	13,8	15,5	13,8	15,5	13,8	15,3	13,6
Serie 08	15,4	13,6	15,4	13,6	15,4	13,6	15,4	13,5

5.5 Herkunft und Probenahme der Milchproben

Für die Validierung und die anschließenden Routinemessungen dienten authentische Milchproben, die im Rahmen des NRKPs von den Kreisordnungsbehörden in NRW entsprechend der Entscheidung der Kommission 98/79/EG entnommen wurden. Das Material wurde bei -20°C gelagert. Die Entwicklung und Optimierung der Methode erfolgte mit garantiert rückstandsfreier Bio-Milch.

5.5.1 Statistik

Die Berechnungen in dieser Arbeit wurden mit Microsoft® Excel 97 SR-2 (*Microsoft Corporation*) ausgeführt.

Graphische Darstellungen erfolgten unter Zuhilfenahme von CorelDRAW 8 (TM) (*Corel Corporation und Corel Corporation Limited*)

Die statistischen Auswertungen wurden mit den kommerziell erhältlichen Software von Valoo 1.0 (*AS Analytik Software e.K.*, Leer, Deutschland) und *InterVal* 1.3 (*quo data GmbH*, Dresen-Langenbrück, Deutschland) durchgeführt.

Literaturverzeichnis

- [2002/657/EC] 2002/657/EC, Decision: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C(2002) 3044). In: *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft* L 221, S. 8–36
- [2002/657/EG] 2002/657/EG, Entscheidung: Entscheidung der Kommission 2002/657/EG vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. In: *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft* L 221, S. 8–36
- [96/23/EC] 96/23/EC, Directive: Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. In: *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft* L 125, S. 10–32
- [96/23/EG] 96/23/EG, Richtlinie: Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG. In: *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft* L 125, S. 10–32
- [97/747/EG] 97/747/EG, Entscheidung: Entscheidung 97/747/EG der Kommission vom 27. Oktober 1997 über Umfang und Häufigkeit der in der Richtlinie 96/23/EG des Rates vorgesehenen Probenahmen zum Zweck der Untersuchung in Bezug auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände in bestimmten tierischen Erzeugnissen. In: *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft* L 303, S. 12–15
- [98/179/EG] 98/179/EG, Entscheidung: Entscheidung 98/179/EG der Kommission vom 23. Februar 1998 mit Durchführungsvorschriften für die amtlichen Probenahmen

- zur Kontrolle von lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände. In: *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft* L 065, S. 31–34
- [Aktories u. a. 2005] AKTORIES, K. ; FÖRSTERMANN, U. ; HOFMANN, F. ; STARKE, S.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Aufl. München-Jena : Urban & Fischer Verlag, 2005. – 781–787, 845 S.
- [Amersham Biosciences Europe GmbH 2002] AMERSHAM BIOSCIENCES EUROPE GMBH, Freiburg: *Gel Filtration, Principles and Methods*. 2002 [http://www1.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/6EEE47990D9F933EC1256F9000DD697/\\$file/18102218AJ.pdf](http://www1.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/6EEE47990D9F933EC1256F9000DD697/$file/18102218AJ.pdf)
- [BVL] BVL: *Jahresberichte zum Nationalen Rückstandskontrollplan*. online. http://www.bvl.bund.de/cln_027/nn_493978/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit__Kontrollen/04__NRKP/01__berichte__nrkp/nrkp__bericht__2005.html#doc992014bodyText3
- [Cancho Grande u. a. 2001] CANCHO GRANDE, B. ; RODRIGUEZ-COMESANA, M. ; SIMAL-GÁNDARA, S.: Simple HPLC determination of colistin in medicated feeds by precolumn derivatization and fluorescence detection. In: *Chromatographia* 54 (7/8) (2001), S. 481–484
- [Cech u. Enke 2000] CECH, N. ; ENKE, C. G.: Relating electrospray ionization response to non-polar character of small peptides. In: *Analytical Chemistry* 72 (13) (2000), S. 2717–2723
- [Decolin u. a. 1997] DECOLIN, D. ; LEROY, P. ; NICOLAS, A. ; ARCHIMBAULT, P.: Hyphenated liquid chromatography method for the determination of colistin residues in bovine tissues. In: *Journal of Chromatographic Science* 35 (1997), S. 557–564
- [DIMDI 2004] DIMDI: *Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information*. online-Datenbankrecherchen 2004. <http://www.dimdi.de/static/de/amg/amis/index.htm>. Version: 2004
- [DIMDI 2006] DIMDI: *Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information*. online-Datenbankrecherchen 2006. <http://www.dimdi.de/static/de/amg/amis/index.htm>. Version: 2006
- [Dürfahrt u. Marahiel 2005] DÜRFAHRT, T. ; MARAHIEL, M. A.: Peptidantibiotika vom molekularen Fließband. In: *Nachrichten aus der Chemie* 53 (5) (2005), S. 507–513

- [(EG) 1181/2002] (EG) 1181/2002, Verordnung: Verordnung (EG) Nr. 1181/2002 der Kommission vom 1. Juli 2002 zur Änderung des Anhangs I der Verordnung (EWG) 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. In: *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft* L 172, S. 13–20
- [Elverdam u. a. 1981] ELVERDAM, I. ; LARSEN, P. ; LUND, E.: Isolation and characterization of three new polymyxins in polymyxins B and E by high performance liquid chromatography. In: *Journal of Chromatography* 218 (1981), S. 653–661
- [EMEA 1999] EMEA: *Antibiotic resistance in the European union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment, by the committee for veterinary medicinal products. 14. July 1999. The European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMEA), Comitee for Veterinary Medicinal Products (CVMP)*. online. <http://www.eudra.org/vetdocs/PDFs/General/034299en.pdf>. Version: 1999
- [EMEA 2002] EMEA: *Committee for veterinary medicinal products. Colistin. Summary report (1) und Summary report (2)*. online. <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/001695en.pdf><http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/081502en.pdf>. Version: 2002
- [EN ISO/IEC 17025:2005 2005] EN ISO/IEC 17025:2005, Norm: EN ISO/IEC 17025:2005, Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien. (2005)
- [Endo u. a. 1997] ENDO, T. ; MIYAGI, M. ; UJIE, A: Simultaneous determination of glycyl-L-histidyl-L-lysine and its metabolite, L-histidyl-L-lysine, in rat plasma by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization. In: *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 692 (1997), S. 37–42
- [EURACHEM/CITAC 2004] EURACHEM/CITAC: *EURACHEM/CITAC Leitfaden (2004). Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen, zweite Auflage (Internetversion) Stand: Februar 2004*. online. http://www.eurolab-d.bam.de/eurachem_dokumente/Ermittlung%20der%20Messunsicherheit%20bei%20analytischen%20Messungen,.pdf. Version: 2004
- [(EWG) 2377/90] (EWG) 2377/90, Verordnung: Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchst-

- mengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs vom 26. Juni 1990. In: *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft* L 224, S. 1–8
- [Falagas u. Kasiakou 2006a] FALAGAS, M. E. ; KASIAKOU, S. K.: Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. In: *Critical Care* 10 (2006), 1-13. <http://ccforum.com/content/10/1/R27>
- [Falagas u. Kasiakou 2006b] FALAGAS, M. E. ; KASIAKOU, S. K.: Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (2006), S. 2274–2275
- [FIHV 2002] FLHV: *Dritte Verordnung zur Änderung fleisch- und geflügelfleischhygienerechtlicher Vorschriften vom 14. März 2002*. Bundesgesetzblatt Jahrgang 2002 Teil I Nr. 18, ausgegeben zu Bonn am 20. März 2002, 2002
- [Gmur u. a. 2003] GMUR, D. J. ; BREDL, . R. ; STEELE, S. J. ; CAI, S. ; VAN DEVANTER, D. R. ; NARDELLA, P. A.: Determination of polymyxin E1 in rat plasma by high-performance liquid chromatography. In: *Journal of Chromatography B* 789 (2003), S. 365–372
- [Govaerts u. a. 2002] GOVAERTS, C. ; ORWA, J. ; VAN SCHEPDAEL, A. ; ROETS, E. ; HOOGMARTENS, J.: Liquid chromatography ion trap tandem mass spectrometry for the characterization of polypeptid-antibiotics of the colistin series in commercial samples. In: *Journal of Chromatography A* 976 (2002), S. 65–78
- [Govaerts u. a. 2003] GOVAERTS, E. C. and A. C. and Adams ; VAN SCHEPDAEL, A. ; HOOGMARTENS, J.: Hyphenation of liquid chromatography to ion trap mass spectrometry to identify minor components in polypeptide antibiotics. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (2003), S. 909–921
- [Gowik 2003] GOWIK, P.: Neue Begriffe für analytische Grenzen, Inhalte der Kommissionsentscheidung 2002/657/EG. In: *LABO* 9 (2003), S. 29–35
- [Hamm u. a. 1990] HAMM, M. ; EBRECHT, A. ; WENZEL, S.: Ein mikrobiologisches Testsystem zum Nachweis der Polypeptidantibiotika Colistin und Polymyxin B. In: *Archiv für Lebensmittelhygiene* 41 (1990), S. 109–112

- [Hammer 1998] HAMMER, P.: ELISA zum Nachweis von Colistin aus Rohmilch. In: *Ta- gungsbericht der 39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deut- schen veterinärmedizinischen Gesellschaft, e. V.* (1998), S. 411–414
- [Hancock u. Chapple 1999] HANCOCK, R. E. W. ; CHAPPLE, D. S.: Peptide Antibiotics. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (1999), S. 1317–1323
- [Hennion u. Pichon 2003] HENNION, M. C. ; PICHON, V.: Immuno-based sample prepa- ration for trace analysis. In: *Journal of Chromatography A* 1000 (2003), S. 29–52
- [Ikai 1995] IKAI, Y. ; OKA, H. (Hrsg.) ; NAKAZAWA, H. (Hrsg.) ; HARADA, K. (Hrsg.) ; MACNEIL, J.D. (Hrsg.): *Chemical analysis for antibiotics used in agriculture*. Ar- rington, VA, AOAC International, 1995. – 407–437 S.
- [Jülicher u. a. 1998] JÜLICHER, B. ; GOWIK, P. ; UHLIG, S.: Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. In: *Analyst* 123 (1998), S. 173–179
- [Jülicher u. a. 1999] JÜLICHER, B. ; GOWIK, P. ; UHLIG, S.: A top-down in house validation based approach for the investigation of the measurement uncertainty using fractional factorial experiments. In: *Analyst* 124 (1999), S. 537–545
- [Kearle 2000] KEARLE, P.: A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. In: *Journal of Mass Spectrometry* 35 (2000), S. 804–817
- [Kearle u. Tang 1993] KEARLE, P. ; TANG, Li.: From ions in solution to ions in the gas phase. In: *Analytical Chemistry* 65 (1993), S. 972–986
- [Kietzmann 2004] KIETZMANN, M.: Einfluss pharmakologisch aktiver Substanzen auf die Lebensmittelsicherheit. In: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Ge- sundheitsschutz* 47 (2004), S. 834–840
- [Kimura u. a. 1981] KIMURA, Y. ; KITAMURA, H. ; ARAKI, T. ; NOGUCHI, K. ; BABA, M. ; HORI, M.: Analytical and preparative methods for polymyxin antibiotics using high performance liquid chromatography with a porous styrene-divinylbenzene copolymer packing. In: *Journal of Chromatography* 206 (1981), S. 563–572

- [King u. a. 2000] KING, R. ; BONFIGLIO, R. ; FERNANDEZ-METZLER, C. ; MILLER-STEIN, C. ; OLAH, T.: Mechanistic investigation of ionization suppressoin in electrospray ionization. In: *Journal of American Society for Mass Spectrometry* 11 (2000), S. 942–950
- [Kitagawa u. a. 1985] KITAGAWA, T. ; OHTANI, W. ; MAENO, Y. ; FUJIWARA, K. ; KIMURA, Y.: Sensitive enzyme immunoassay of colistin and its application to detect residual colistin in rainbow trout tissue. In: *Journal of the Association of Offical Analytical Chemists* 68 (4) (1985), S. 661–664
- [Kline u. a. 2001] KLINE, T. ; HOLUB, D. ; THERRIEN, I. ; LEUNG, T. ; RYCKMAN, D.: Synthesis and characterization of the colistin peptide polymyxin E1 and related antimicrobial peptides. In: *Journal of Peptid Research* 57 (2001), S. 175–187
- [Kommission 2000] KOMMISSION, Europäische: *Weißbuch zur Lebensmittelsicherheit*. online. http://ec.europa.eu/food/food/intro/white_paper_de.htm. Version: 2000
- [Koyama u. a. 1950] KOYAMA, Y. ; KUROSAWA, A. ; TSUCHIYA, A. ; TAKAKUTA, K.: A new antibiotic "colistin" produced by spore-forming soil bacteria. In: *The Journal of Antibiotics* 3 (1950), S. 457–458
- [Kristensen u. Hansen 1993] KRISTENSEN, H. K. ; HANSEN, S. H.: Separation of polymyxins by micellar electrokinetic capillary chromatography. In: *Journal of Chromatography* 628 (1993), S. 309–315
- [Leroy u. a. 1989] LEROY, P. ; DECOLIN, D. ; NICOLAS, S. ; ARCHIMBAULT, P. ; NICOLAS, A.: Residue determination of two co-administered antibacterial agents - cephalixin and colistin - in calf tissues using high-performance liquid chromatography and microbiological methods. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 7 (12) (1989), S. 1837–1846
- [LFGB 2005] LFGB: *Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch vom 1. September 2005*. Bundesgesetzblatt Jahrgang 2005 Teil I Nr. 55, ausgegeben zu Bonn am 6. September 2005, 2005
- [Li u. a. 2003a] LI, J. ; MILNE, R. W. ; NATION, R. L. ; TURNIDGE, J. D. ; COULTHARD, S.: Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (4) (2003), S. 1364–1367

- [Li u. a. 2003b] LI, J. ; MILNE, R. W. ; NATION, R. L. ; TURNIDGE, J. D. ; COULTHARD, S.: Use of high performance liquid chromatography to study the pharmacokinetics of colistin sulfate in rats following intravenous administration. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (5) (2003), S. 1766–1770
- [Li u. a. 2005] LI, J. ; NATION, R. L. ; MILNE, R. W. ; TURNIDGE, J. D. ; COULTHARD, K.: Evaluation of colistin as an agent against multiresistant gramnegative bacteria. In: *International Journal of Antimicrobial Agents* 25 (1) (2005), S. 11–25
- [Li u. a. 2006] LI, J. ; NATION, R. L. ; TURNIDGE, J. D.: Defining the dosage units for colistin methanesulfonate: urgent need for international harmonization. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (12) (2006), S. 4231–4232
- [Lindroth u. Mopper 1979] LINDROTH, P. ; MOPPER, K.: High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of aminoacids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. In: *Analytical Chemistry* 51 (11) (1979), S. 1667–1674
- [Littlewood u. a. 2000] LITTLEWOOD, J. M. ; KOCH, C. ; LAMBERT, P. A. ; HØIBY, N. ; ELBOORN, J. S. ; CONWAY, S. P. ; DINWIDDIE, R. ; DUNCAN-SKINGLE, F.: A ten year review of colomycin. In: *Respiratory Medicine* 94 (2000), S. 632–640
- [Löscher u. a. 2006] LÖSCHER, W. ; UNGEMACH, F. R. ; KROKER, R.: *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 7. Aufl. Berlin : Parey-Buchverlag, 2006. – 266–267 S.
- [Ma u. a. 2008] MA, Z. ; WANG, J. ; GERBER, J. P. ; MILNE, R. W.: Determination of colistin in human plasma, urine and other biological samples using LC-MS/MS. In: *Journal of Chromatography B* 862 (2008), S. 205–212
- [Morovján u. a. 1998] MOROVJÁN, G. ; CSOKÁN, P. P. ; NÉMETH-KONDA, L.: HPLC determination of colistin and aminoglycoside antibiotics in feeds by postcolumn derivatization and fluorescence detection. In: *Chromatographia* 48 (1-2) (1998), S. 32–36
- [Mutschler u. a. 2008] MUTSCHLER, E. ; GEISSLINGER, G. ; KROEMER, H. K. ; RUTH, P. ; SCHÄFER-KORTING, M.: *Mutschler Arzneimittelwirkungen kompakt*. 9. Aufl. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2008. – 843–844 S.
- [Niessen 2003] NIESSEN, W. M. A.: Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. In: *Journal of Chromatography A* 1000 (2003), S. 413–436

- [Nouws u. a. 1999] NOUWS, J. ; VAN EGMOND, H. ; SMULDERS, L. ; LOEFFEN, G. ; SCHOUTEN, J. ; STEGEMAN, H.: A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels. In: *International Dairy Journal* 9 (2) (1999), S. 85–90
- [Orwa u. a. 2001] ORWA, J. A. ; GOVAERTS, C. ; BUSSON, R. ; ROETS, E. ; VAN SCHEPDAEL, A. ; HOOGMARTENS, J.: Isolation and structural characterization of colistin components. In: *The Journal of Antibiotics* 54 (7) (2001), S. 595–599
- [Orwa u. a. 2002] ORWA, J. A. ; GOVAERTS, C. ; GEVERS, K. ; ROETS, E. ; VAN SCHEPDAEL, A. ; HOOGMARTENS, J.: Study of the stability of polymyxins B1, E1 and E2 in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29 (2002), S. 203–212
- [Orwa u. a. 2000] ORWA, J. A. ; VAN GERVEN, A. ; ROETS, E. ; HOOGMARTENS, J.: Development and validation of a liquid chromatography method for analysis of colistin sulphate. In: *Chromatographia* 51 (7-8) (2000), S. 433–436
- [Peterson u. a. 1985] PETERSON, A. ; HANCOCK, R. W. ; MCGROARTY, E. J.: Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Journal of Bacteriology* 164 (3) (1985), S. 1256–1261
- [Pharmacopoeia 2004] PHARMACOPOEIA, European: *Bekanntmachung zum Europäischen Arzneibuch 4. Ausgabe, 6. Nachtrag, Amtliche deutsche Ausgabe zum Deutschen Arzneibuch, Europäische Arzneibuch-Kommission, Straßburg, Frankreich.* online. <http://194.153.219.140/de/Arzneimittel/azbuch/bekanntm/index.php?more=Bekanntm406.php>. Version: 2004
- [ROEMPP 2005] ROEMPP: *Chemie-Lexikon, Version 2.9, Thieme RÖMPP.* online im Informations- und Kommunikationssystem Lebensmittelüberwachung NRW (ILM), 2005
- [Roth 1971] ROTH, M.: Fluorescence reaction for amino acids. In: *Analytical Chemistry* 43 (7) (1971), S. 880–882
- [Schwarz u. Kehrenberg 2000] SCHWARZ, S. ; KEHRENBERG, C.: Antimikrobielle Resistenz: Resistenzmechanismen, Resistenzgene und Übertragungswege. In: *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle* 7 (1) (2000), S. 55–60

- [Sewald u. Jakubke 2002] SEWALD, N. ; JAKUBKE, H.D.: *Peptides: Chemistry and Biology*. 1. Aufl. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002. – 5–35, 61–90, 119–124, 518 S.
- [Simons u. Johnson 1977] SIMONS, S. S. J. ; JOHNSON, D. F.: Ethanethiol: A thiol conveying improved properties to the fluorescent product of o-phthalaldehyde and thiols with amines. In: *Analytical Biochemistry* 82 (1977), S. 250–254
- [Simons u. Johnson 1978] SIMONS, S. S. J. ; JOHNSON, D. F.: Reaction of o-phthalaldehyde and thiols with primary amines: fluorescence properties of 1-alkyl (and aryl) thio-2-alkylisoindoles. In: *Analytical Biochemistry* 90 (1978), S. 705–725
- [Sin u. a. 2005] SIN, D. W. ; HO, C. ; WONG, Y. ; HO, S. ; IP, A. C.: Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. In: *Analytica Chimica Acta* 535 (1-2) (2005), S. 23–31
- [Stobaugh u. a. 1983] STOBAUGH, J. F. ; REPTA, A. J. ; A., Sternson L. ; GARREN, K. W.: Factors affecting the stability of fluorescent isoindoles derived from reaction on o-phthalaldehyde and hydroxyalkylthiols with primary amines. In: *Analytical Biochemistry* 135 (2) (1983), S. 495–504
- [Suhren u. Knappstein 2005] SUHREN, G. ; KNAPPSTEIN, K.: Detection of colistin in spiked and incurred milk samples by LC- and ELISA-technique. In: *Analytica Chimica Acta* 529 (2005), S. 97–101
- [Suzuki u. Fujikawa 1965] SUZUKI, T. ; FUJIKAWA, K.: The chemical structure of polymyxin E: the identities of polymyxin E1 with colistin A and of polymyxin E2 with colistin B. In: *The Journal of Biochemistry* 57 (2) (1965), S. 226–227
- [Thomas u. a. 1980] THOMAS, A. H. ; THOMAS, J. M. ; HOLLOWAY, I.: Microbiological and chemical analysis of polymyxin B and polymyxin E (colistin) sulphates. In: *Analyst* 105 (1980), S. 1068–1075
- [Toepel 2004] TOEPEL, A.: *Chemie und Physik der Milch: Naturstoff-Rohstoff-Lebensmittel*. 3. Aufl. Hamburg : Behr's Verlag, 2004. – 444–446 S.
- [Wan u. a. 2006] WAN, E. C. ; HO, C. ; SIN, D. W. ; WONG, Y.: Detection of residual bacitracin A, colistin A and colistin B in milk and animal tissues by liquid chroma-

tography tandem mass spectrometry. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385 (1) (2006), S. 181–188

Veröffentlichungen:

- SCHULTE-SUTRUM, M.; HORN, D.: Separatorenfleisch – Eignungsprüfung. In: *Fleischwirtschaft*, 83 (1) (2003), S. 78 – 81
- SCHULTE-SUTRUM, M.; HORN, D.: Proficiency testing – mechanically deboned meat, . In: *Fleischwirtschaft International*, (4) (2004), S. 44 - 46

Danksagung

Die vorliegende Arbeit basiert auf Untersuchungen, die in der Zeit vom Mai 2003 bis September 2005 sowie im Jahr 2008 im SVUA Krefeld (jetzt CVUA-RRW) durchgeführt wurden. Die Entwicklung und Validierung der Untersuchungsmethode entstand im Rahmen eines Verbraucherschutzprojektes NRW in der Abteilung Rückstandsanalytik des SVUA Krefeld (jetzt CVUA-RRW).

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerd Hamscher, Institut für Lebensmitteltoxikologie der Stiftung Tierärztlichen Hochschule Hannover, für die Bereitschaft mich als externe Doktorandin zu betreuen. Ohne seine Unterstützung und Geduld wäre eine Realisierung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Prof. Dr. Carla Vogt und Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger danke ich für die Bereitschaft zur Durchführung des Promotionsverfahrens an der Leibniz Universität Hannover, für die Begutachtung der Arbeit und das Interesse am Thema.

Dem Abteilungsleiter der Rückstandsanalytik Herrn Dr. Gerd Burgbacher möchte ich für die interessante Themenstellung und für die vortreffliche Betreuung vor Ort, für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und die Hilfe bei allen organisatorischen Fragen ganz herzlich danken.

Ein großer Dank gilt auch dem Dienststellenleiter des SVUA-Krefeld, Herrn Dr. Detlef Horn, der mich stets gefördert und es mir ermöglicht hat, diese Dissertation neben meiner täglichen Arbeit anzufertigen und Analysengeräte, Laborgeräte und Chemikalien dafür zu benutzen.

Darüber hinaus danke ich Liane Gouran, Marcus Breuer-Grau, Gerd Plässer und Jaqueline Diable für die Unterstützung im Labor, für die Einweisung in die Gerätebedienung und fachlichen Diskussionen sowie all meinen damaligen Arbeitskollegen und -innen, die auf verschiedene Arten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. Gabriele Luyven für die Bereitstellung der garantiert rückstandsfreien Rohmilch.

Friedhelm und Daniela Leenen sowie meinem Bruder Thomas danke ich für die sprachliche und inhaltliche Korrektur dieser Arbeit.

Abschließend bedanke ich mich bei meinem Mann für die Hilfsbereitschaft in computertechnischen Fragen, für die gestalterische Korrektur und die Gabe mich unermüdlich zu motivieren.