



Bestimmung von Tierarzneimitteln mit Flüssig-flüssig-Extraktion, dispersiver Festphasenextraktion und HPLC-MS/MS-Detektion

MACHEREY-NAGEL application department · Dr. H. R. Wollseifen, D. Gründemann

Einleitung

Tierarzneimittel werden eingesetzt, um die Qualität von tierischen Lebensmitteln zu verbessern und die Sicherheit des Verbrauchers vor Krankheiten zu gewährleisten. Der übermäßige Gebrauch von Tierarzneimitteln führt zu Resistenzerscheinungen bei den Zielorganismen und zu Rückständen, die vom Konsumenten über die Nahrung aufgenommen werden. Regulierungsbehörden haben Grenzwerte für Rückstandskonzentrationen, in Form eines *maximum residue level* (MRL) festgelegt [1]. Die Herausforderung der Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Tierarzneimittel-Rückständen ist die Komplexität der Proben-Matrizes und die Diversität der Analyten verschiedener Arzneimittel-Gruppen [2]. In dieser Arbeit wurden Alpha2-Adrenorezeptor-Agonisten, Benzimidazole, Chinolone, Glucocorticoide, Sulfonamide (Stream 1), Avermectine (Stream 2), β -Lactame (Stream 3) und Tetracycline (Stream 4) bestimmt [3]. Für die Probenvorbereitung wurde die QuEChERS-Methodik eingesetzt. Die Cleanup-Salze zeigen unterschiedliche Auswirkungen auf die Matrixreduktion. C_{18} ec-Salze adsorbieren unpolare Strukturen wie Proteine und Lipide, Diamino (PSA) reduziert anionische, polare Interferenzen wie Zucker oder Fettsäuren und Salze wie $MgSO_4$ oder Na_2SO_4 entziehen dem System Wasser [2]. In dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung so angepasst, dass der Verlust an Analyt minimal bleibt, bei ausreichender Matrixreduktion. Der Cleanup-Mix von 900 mg Na_2SO_4 , 50 mg Diamino und 100 mg C_{18} ec erwies sich als optimal. Die Methode wurde mit Milch, Honig, Eiern und Rinderhackfleisch erfolgreich durchgeführt. Die chromatographische Trennung erfolgt mit einer NUCLEOSHELL® RP-18-Säule (Core-Shell) und für die Tetracycline wurde eine NUCLEODUR® C_{18} -Pyramid-Säule (vollporös) eingesetzt.

Probenvorbereitung

2 Proben ansetzen: 1x Blank (ohne Standard), 1x Probe mit 50 μ L jeder Standard-Lösung spiken, Gefäß: 50-mL-Falton

Extraction

1. Probe in 8 mL Reinstwasser homogenisieren (Vortex/Ultraschall)
2. 30 mL Acetonitril und 30 μ L Essigsäure hinzufügen (30 Sek. schütteln + 5 Sek. vortexen)
3. Extraktionssalz hinzufügen: 4 g Na_2SO_4 , 1 g NaCl, 1 g Na_2 Citrat, 0,5 g Na_2 HCitrat (60 Sek. schütteln + 5 Sek. vortexen)
4. Zentrifugieren: 10 min, 20 °C, 4500 rpm

Cleanup

1. 6 mL Überstand werden in einen Cleanup-Mix von 900 mg Na_2SO_4 , 50 mg Diamino und 100 mg C_{18} ec überführt
2. 60 Sek schütteln, 5 Sek vortexen und zentrifugieren (10 min, 20 °C, 4500 rpm)
3. 3 mL Überstand in Glasküvette bei 50 °C bis zur Trockenheit eindampfen
4. Rückstand in 250 μ L Methanol vollständig lösen und zentrifugieren (10 min, 13500 rpm)
5. Überstand in HPLC-Vial überführen → LC-MS/MS-Injektion

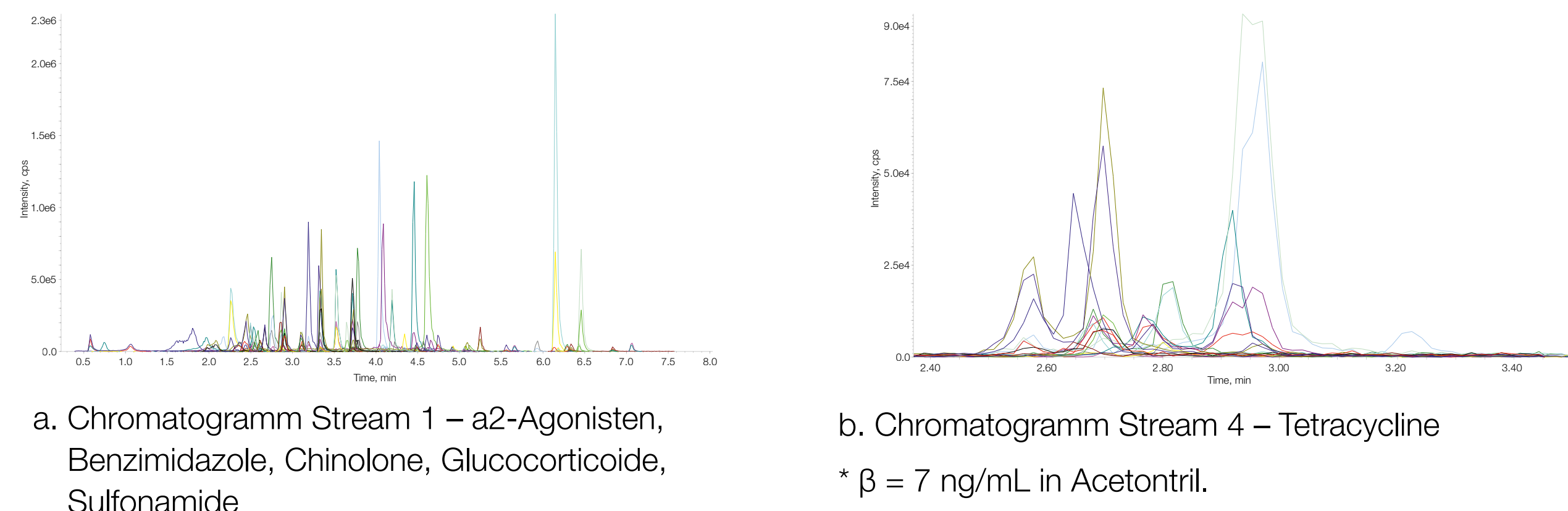
HPLC-MS/MS Analyse

Chromatographische Bedingungen

Säule	Stream 1: NUCLEOSHELL® RP 18, 2 x 100 mm, 2,7 μ m Stream 4: NUCLEODUR® C_{18} -Pyramid 2 x 100 mm, 3 μ m
Eluent A	0,1 % Ameisensäure in Reinstwasser
Eluent B	0,1 % Ameisensäure in Acetonitril
Gradient Stream 1:	5 % B für 0,5 min, in 2 min von 5 auf 75 % B, in 7,5 min von 75 auf 100 % B, 100 % B für 2 min, in 0,5 min von 100 % auf 5 % B, 5 % B für 3,5 min
Gradient Stream 4:	1 % B für 0,5 min, in 1,5 min von 5 auf 35 % B, in 1,5 min von 35 auf 45 % B, 45 % B für 2,5 min, in 0,5 min von 45 auf 100 % B, 100 % B für 1,5 min, in 0,5 min von 100 % auf 1 % B, 1 % B für 2,5 min
Fluss	0,4 mL/min
Temperatur	40 °C
Injektionsvolumen	2 μ L (10 °C)
MS Bedingungen	Ionenquellen-Parameter siehe [4]

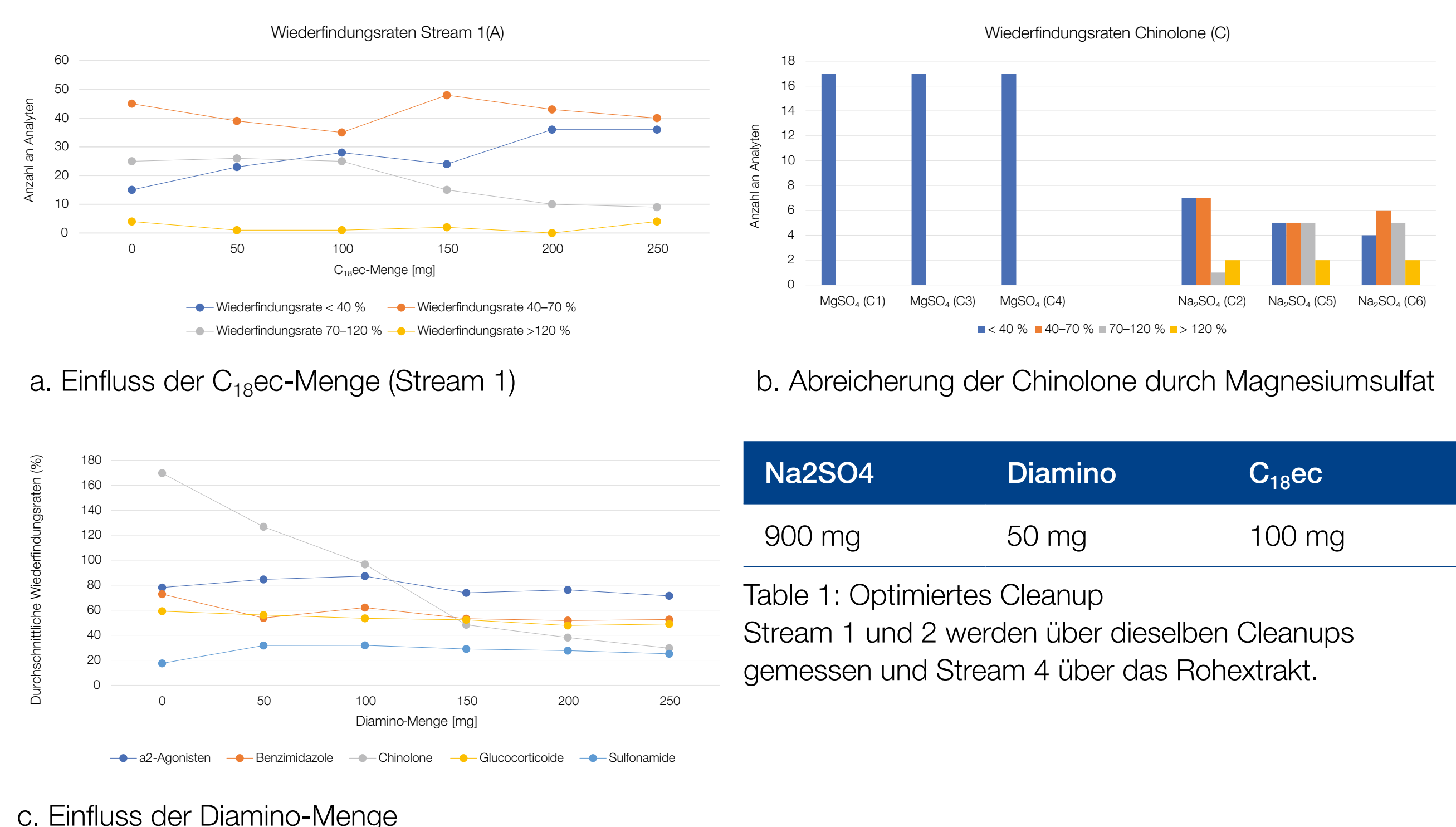
Chromatogramme

Figure 1 a-b:



Optimierung der Zusammensetzung des Cleanup Mixes

Figure 2 a-c:

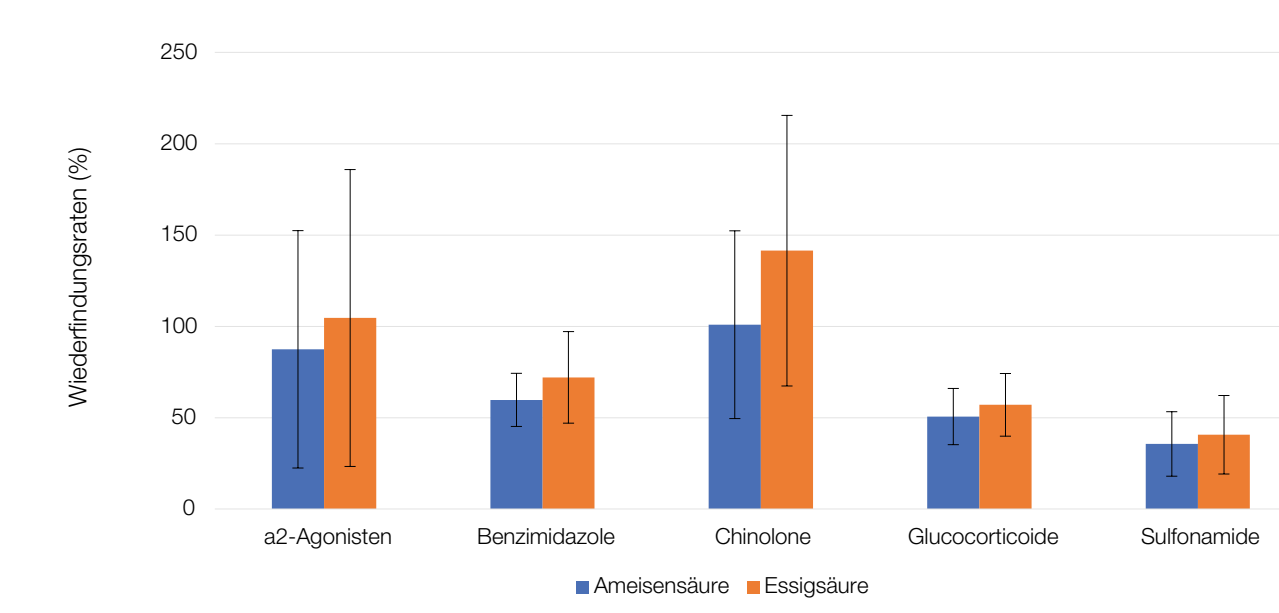


Na_2SO_4	Diamino	C_{18} ec
900 mg	50 mg	100 mg

Table 1: Optimiertes Cleanup Stream 1 und 2 werden über dieselben Cleanups gemessen und Stream 4 über das Rohextrakt.

Vergleich Essigsäure-/Ameisensäurezugabe

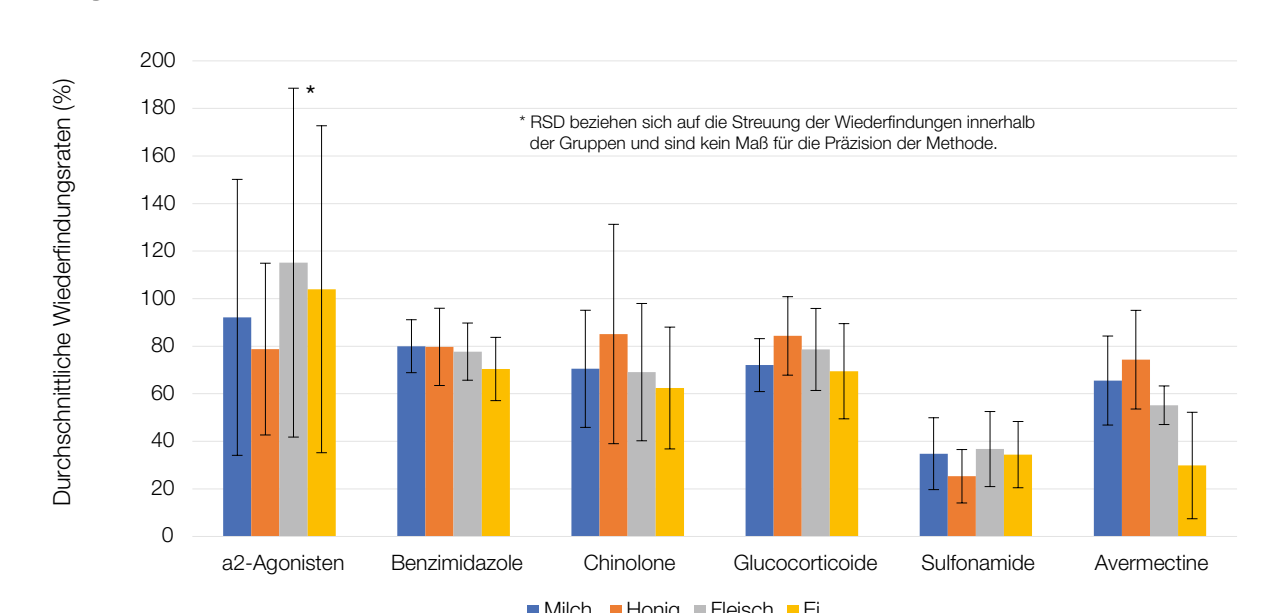
Figure 3:



Einfluss der Zugabe von Essigsäure und Ameisensäure auf die Wiederfindungsraten

Wiederfindungsraten

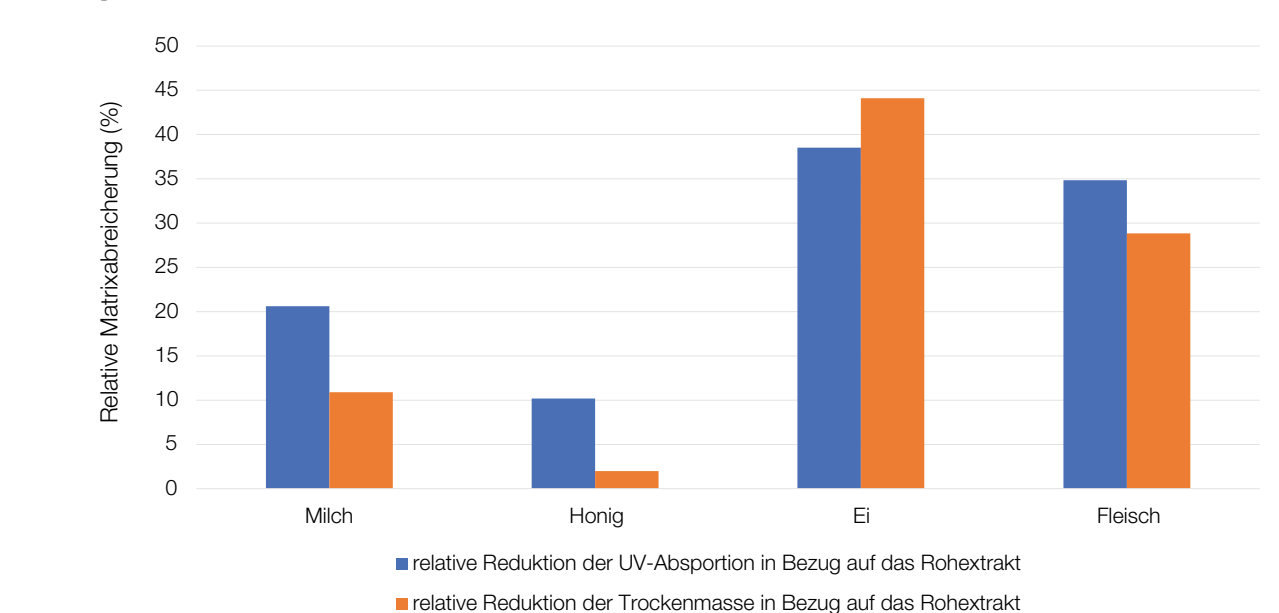
Figure 4:



Wiederfindungsraten der betrachteten Analytgruppen

Matrixanreicherung

Figure 5:



Relative Matrixanreicherung der UV-Absorption und der Trockenmasse bezogen auf den Rohextrakt.

Standardabweichungen

	Ei	Fleisch	Standard 1	Milch	Honig	Standard 2
a2-Agonisten	4,22 %	3,28 %	3,16 %	8,80 %	8,93 %	5,90 %
Benzimidazole	9,22 %	4,56 %	6,08 %	8,88 %	7,45 %	10,7 %
Chinolone	10,2 %	6,89 %	11,2 %	8,19 %	8,34 %	12,8 %
Glucocorticoide	10,6 %	8,03 %	9,33 %	10,3 %	10,6 %	10,3 %
Sulfonamide	7,45 %	8,87 %	10,1 %	9,58 %	13,6 %	13,5 %
Avermectine	4,54 %	14,7 %	10,0 %	5,45 %	5,28 %	3,38 %
Tetracycline	13,5 %	12,5 %	-	13,8 %	13,9 %	-
Probenanzahl(n)	4	4	3	4	4	3

Table 2: Durchschnittliche Standardabweichungen pro Analyt-Gruppe pro Matrix/Lösemittelstandard

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Gruppe	LOD (ng/mL)	Standardabweichung (LOD) (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Standardabweichung LOQ (ng/mL)
a2-Agonist	0,009	± 0,007	0,029	± 0,022
Benzimidazole	0,017	± 0,011	0,055	± 0,038
Chinolone	0,032	± 0,024	0,106	± 0,082
Glucocorticoide	0,024	± 0,018	0,079	± 0,059
Sulfonamide	0,044	± 0,027	0,146	± 0,089
Avermectine	0,071	± 0,108	0,237	± 0,361
Tetracycline	0,002	± 0,001	0,007	± 0,004

Table 3: Durchschnittliche Nachweis- und Bestimmungsgrenzen pro Analyt-Gruppe

Ergebnis

Die optimierte Methode wurde mit 0,1 % Essigsäure in Acetonitril als Extraktions-Lösemittel, 4 g Natriumsulfat, 1 g Natriumchlorid, 1 g Natriumcitrat und 0,5 g Natriumhydrogencitrat als Extraktionssalz und 900 mg Natriumsulfat, 50 mg Diamino und 100 mg C_{18} ec als Cleanup-Salz erfolgreich mit Ei, Rinderhackfleisch, Milch und Honig durchgeführt. Der QuEChERS-Mix zeigte eine effektive Matrix-Reduktion bei akzeptablen Wiederfindungen der Analyten. Mit dieser Methode konnten 93 Tierarzneimittel nach den Anforderungen AOAC SMPR® zuverlässig bestimmt werden ($C_{Standard} > MRL$, $POD > 90\%$, Precursorion sowie mindestens zwei Übergänge detektierbar). Die Ergebnisse der Probenvorbereitung brachten Standardabweichungen unter 25 % hervor und dürften demnach zuverlässig sein.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei der MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG und allen Beteiligten bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser wissenschaftlichen Abschlussarbeit beigetragen haben.

Daniel Gründemann
Kleve, 15.08.22

Literatur

- [1] VERORDNUNG (EU) Nr. 37/2010 DER KOMMISSION vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs
- [2] Agilent Technologies: Screening 36 Veterinary Drugs in Animal Origin Food by LC/MS/MS Combined with Modified QuEChERS Method, Authors: Jin-Lan Sun, Chang Liu, Yue Song, Shanghai, China, Jian-Zhong Li, Beijing, China, 2012
- [3] AOAC INTERNATIONAL: Screening of 154 Veterinary Drug Residues in Foods of Animal Origin Using LC-MS/MS: First Action 2020.04, Authors: Aurélien Desmarchelier, Thomas Bessaire, Marie-Claude Savoy, Adrienne Tarres, Claudia Mujahid, Andrea Beck, Pascal Mottier, Thierry Delatour
- [4] Wissenschaftliche Abschlussarbeit: Tierarzneimittel in Lebensmitteln (Optimierung einer LC-MS/MS-Methode), Daniel Gründemann, 2022