

**Entwicklung, Validierung und Anwendung
spurenanalytischer Methoden zum Nachweis
von Fluorchinolon-Antibiotika in biologischen
Matrices mittels LC-MS/MS**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat

im Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

M. Sc. Franziska Janusch

geboren am 12.08.1985 in Dessau

2013

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Franziska Janusch

Gutachter:

1. Prof Dr. Gerd Hamscher
2. Prof. Dr. Bernhard Spengler

Tag der öffentlichen Verteidigung: 28. April 2014

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
Zusammenfassung	XIII
Abstract	XV
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Stand der Literatur	3
2.1 Fluorchinolone	3
2.1.1 Allgemeines.....	3
2.1.2 Struktur-Wirkungsbeziehung	3
2.3.3 Gruppierung	4
2.3.4 Wirkmechanismus	5
2.3.5 Eingesetzte Fluorchinolone	6
2.2 Verbrauch von Veterinärantibiotika	7
2.3 Antibiotika in der Umwelt	10
2.3.1 Allgemeines.....	10
2.3.2 Ausscheidung und Abbau.....	11
2.3.3 Fluorchinolone in der Umwelt	11
2.4 Antibiotikaresistenzen	15
2.4.1 Allgemeines.....	15
2.4.1 Resistenzmechanismen.....	18
2.5 Festphasenextraktion (SPE)	18
2.6 Phospholipide	20
2.7 HPLC-MS/MS	22
2.7.1 Allgemeines.....	22
2.7.2 Detektionsmethoden mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie	24
2.8 Matrixeffekte	26
3. Methodenentwicklung Hühnerplasma	29

3.1 Allgemeines Vorgehen	29
3.2 Auswahl geeigneter SPE-Phasen	30
3.3 Optimierung einzelner Extraktionsschritte.....	31
3.3.1 Waschschriff	31
3.3.2 Elution	34
4. Evaluierung und Minimierung von Matrixeffekten in der Analytik von Hühnerplasma	36
4.1 Allgemeines.....	36
4.2 MS/MS-Methoden zur Bestimmung von Phospholipiden in Hühnerplasma.....	36
4.2.2 Vorläuferionen Scan.....	36
4.2.3 Stoßinduzierte Dissoziation in der Ionenquelle.....	38
4.2.4 Neutralverlust Scan	38
4.2.5 Selected Reaction Monitoring (SRM).....	39
4.3 Phospholipidzusammensetzung und -gehalt in Probenextrakten	48
4.3.1 Phospholipidzusammensetzung	48
4.3.2 Phospholipidgehalt	49
4.4 Bestimmung des quantitativen Matrixeffektes	49
4.5 Post-column-Infusion.....	50
4.6 Methodenoptimierung	51
4.6.1 Chromatographische Bedingungen	51
4.6.2 Festphasenextraktion.....	53
4.7 Konzentrationsabhängigkeit von Matrixeffekten.....	55
4.8 Vergleich der SPE-Phasen Strata X und Oasis MAX/MCX.....	56
4.8.1 Phospholipidgehalt und Analytwiederfindung	57
4.8.2 Post-column-Infusion	57
5. Methodenentwicklung Hühnerfaeces	59
5.1 Allgemeines.....	59
5.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion	59

5.2.1 Allgemeines Vorgehen	59
5.2.2 Einfluss verschiedener Lösungsmittel.....	59
5.2.3 Einfluss von Puffern, Komplexbildnern und pH-Werteinstellung.....	60
5.2.4 Einfluss von Lösungsmittelvolumen und Anzahl der Extraktionszyklen	62
5.2.5 Einfluss der Extraktionszeit	64
5.2.6 Einfluss der Probemenge.....	64
5.3 Mikrowellenextraktion	65
5.3.1 Allgemeines Vorgehen.....	65
5.3.2 Organische Lösungsmittel.....	66
5.3.3 Wässrige Lösungen	67
6. Methodenentwicklung Stallstaub.....	69
6.1 Optimierung des Lösungsmittelvolumens	69
6.2 Optimierung der Extraktionszeit	69
6.3 Optimierung der Probemenge	70
7. Methodenvalidierung	72
7.1 Hühnerplasma	72
7.2 Hühnerfaeces	73
7.3 Stallstaub	74
8. Tierstudien	77
8.1 Allgemeines.....	77
8.2. Hühnerplasma	77
8.2.1 Verschleppungsdosen.....	77
8.2.3 Metabolisierungsprofil	79
8.3 Hühnerfaeces	79
8.3.1 Verschleppungsdosen.....	79
8.3.2 Empfohlene Dosis 10 mg/kg KG Enrofloxacin	82
8.3.3 Metabolisierungsprofil	83
9. Methodenvergleich Hühnerplasma	85

9.1 Allgemeines	85
9.2 Verschleppungsdosis 1 mg/kg KG Enrofloxacin	85
9.3 Verschleppungsdosis 3 mg/kg KG Enrofloxacin	86
10. Stallstaub	88
11. Identifizierung möglicher Enrofloxacin-Metaboliten in Hühnerfaeces .	91
11.1 Messungen mit Triple-Quadrupol-Massenspektrometer.....	92
11.2 Messungen mit hochauflösendem Massenspektrometer	101
12. Diskussion	113
12.1 Methodenentwicklung Hühnerplasma.....	113
12.2 Evaluierung und Minimierung von Matrixeffekten in der Analytik von Hühnerplasma	115
12.3 Methodenentwicklung Hühnerfaeces.....	120
12.4 Tierstudien.....	122
12.5 Methodenvergleich.....	126
12.6 Stallstaubproben	127
12.7 Identifizierung möglicher Enrofloxacin-Metaboliten.....	128
12.8 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....	129
13. Material und Methoden	131
13.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	131
13.2 Chemikalien.....	132
13.2.1 Herstellung Fluorchinolonstandards.....	133
13.3 HPLC-ESI-MS/MS-Methoden	133
13.3.1 HPLC-Methode	133
13.3.2 ESI-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Fluorchinolonen.....	134
13.3.3 MS/MS-Methoden zur Bestimmung von Phospholipiden in Hühnerplasma	136
13.3.4 Geräteparameter hochauflösende Massenspektrometrie	139
13.3.5 Software zur Datenaufnahme und -auswertung	140
13.4 Probenmaterial	140

13.4.1 Hühnerplasma.....	140
13.4.2 Hühnerfaeces.....	140
13.4.3 Stallstaub.....	141
13.5 Methoden zur Evaluierung und Minimierung von Matrixeffekten in der Analytik von Hühnerplasma.....	142
13.5.1 Einfluss des Elutionsmittels.....	142
13.5.2 Qualitativer Matrixeffekt.....	142
13.5.3 Quantitativer Matrixeffekt.....	142
13.5.4 Verschleppung von Phospholipiden.....	143
13.6 Probenaufarbeitungsmethoden.....	143
13.6.1 Hühnerplasma.....	143
13.6.2 Hühnerfaeces.....	145
13.6.3 Stallstaub.....	146
13.7 Methodvalidierung.....	146
13.7.1 Hühnerplasma.....	146
13.7.2 Hühnerfaeces.....	147
13.7.3 Stallstaub.....	147
13.8 Tierstudien.....	148
13.8.1 Hühnerplasma.....	148
13.8.2 Hühnerfaeces.....	148
13.9 Methodenvergleich.....	149
Literaturverzeichnis.....	150
Anhang.....	161
Veröffentlichungen.....	179
Danksagung.....	180

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Grundgerüst der Chinolon-Antibiotika.	4
Abb. 2.2:	Abgabemengen von Veterinärantibiotika 2011 in Deutschland	8
Abb. 2.3:	Durchschnittliche jährliche Antibiotikagesdosen pro Versichertem zwischen 1991 und 2009 sowie der Anteil an Reserveantibiotika in der Humanmedizin	16
Abb. 2.4:	Resistenzentwicklung zwischen 1990 und 2010 von <i>Escherichia coli</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> gegenüber Ciprofloxacin	17
Abb. 2.5:	Resistenzentwicklung zwischen 1986 und 2001 von Salmonellen gegenüber Fluorchinolonen in Geflügel und Geflügelfleisch.	17
Abb. 2.6:	Allgemeines Ablaufschema einer Festphasenextraktion.....	19
Abb. 2.7:	Strukturformel eines Umkehrphasenmaterials auf Polymerbasis.	19
Abb. 2.8:	Strukturformel eines Mixed-Mode-Anionenaustauschers und eines Mixed-Mode-Kationenaustauschers	20
Abb. 2.9:	Grundstruktur der Glycerophospholipide und funktionelle Kopfgruppen.	21
Abb. 2.10:	Grundstruktur der Sphingomyeline.....	21
Abb. 2.11:	Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisation im Positivmodus.	23
Abb. 2.12:	Schematische Darstellung des Selected Reaction Monitorings.	24
Abb. 2.13:	Schematische Darstellung des Vorläuferionen Scans.	25
Abb. 2.14:	Schematische Darstellung des Neutralverlust Scans.....	25
Abb. 2.15:	Schematische Darstellung der stoßinduzierten Dissoziation in der Ionenquelle.....	26
Abb. 3.1:	Sequentielle Elution am Beispiel von Ciprofloxacin.	33
Abb. 3.2:	UV-Chromatogramme (280 nm) der Probenextrakte unter Verwendung eines zusätzlichen Waschschrittes.....	34
Abb. 4.1:	Vorläuferionen Scan von m/z 184,1 zur Erfassung von Phosphatidylcholinen, Lyso Phosphatidylcholinen und Sphingomyelinen.	37
Abb. 4.2:	Vorläuferionen Scan von m/z 153,1 zur Erfassung von Phosphatidylsäuren, Phosphatidylinositolen, Phosphatidylserinen, Phosphatidylglycerinen, Phosphatidylcholinen und Lyso Phosphatidylcholinen	37
Abb. 4.3:	Stoßinduzierte Dissoziation in der Ionenquelle von m/z 184,1 zur Erfassung von Phosphatidylcholinen, Lyso Phosphatidylcholinen und Sphingomyelinen sowie m/z 104,1 zur alleinigen Erfassung von Lyso Phosphatidylcholinen.	38
Abb. 4.4:	Neutralverlust Scan von 141 Da zur Erfassung von Phosphatidylethanolaminen und Lyso Phosphatidylethanolaminen.	39
Abb. 4.5:	Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Phosphatidylcholin Massenübergänge.....	40
Abb. 4.6:	Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Lyso Phosphatidylcholin Massenübergänge.....	41
Abb. 4.7:	Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Sphingomyelin Massenübergänge.....	43
Abb. 4.8:	Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Phosphatidylethanolamin Massenübergänge.....	44
Abb. 4.9:	Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Phosphatidylserin Massenübergänge	45
Abb. 4.10:	Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Phosphatidylglycerin Massenübergänge.....	46
Abb. 4.11:	Selected Reaction Monitoring (Negativmodus) ausgewählter Phosphatidylinositol Massenübergänge.....	47

Abb. 4.12:	Selected Reaction Monitoring (Negativmodus) ausgewählter Phosphatidylsäuren Massenübergänge.....	47
Abb. 4.13:	Prozentuale Phospholipidzusammensetzung extrahierter Hühnerplasmaproben.....	48
Abb. 4.14:	Absolute Peakfläche der einzelnen Phospholipidklassen extrahierten Hühnerplasmaproben	49
Abb. 4.15:	Post-column-Infusionsprofile einer mittels Strata X aufgearbeiteten Leermatrixprobe.	51
Abb. 4.16:	Prozentuale Verschleppung von Phospholipiden in nachfolgende HPLC-Messungen..	52
Abb. 4.17:	Peakflächen für Phosphatidylcholine, Lyso Phosphatidylcholine, Sphingomyeline Phosphatidylethanolamine von fünf nacheinander folgenden Leermatrixinjektionen...	53
Abb. 4.18:	Sequentielle Elution für Fluorchinolone und Phospholipide.	54
Abb. 4.19:	Konzentrationsabhängigkeit von Matrixeffekten.....	56
Abb. 4.20:	Post-column-Infusionsprofile nach Injektion einer mittels der optimierten Strata X Methode aufgearbeiteten Leermatrixprobe	58
Abb. 4.21:	Post-column-Infusionsprofile nach Injektion einer mittels der Kombination aus Oasis MAX/Oasis MCX aufgearbeiteten Leermatrixprobe.....	58
Abb. 5.1:	Vergleich verschiedener Lösungsmittel zur Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces	60
Abb. 5.2:	Vergleich verschiedener Puffer, pH-Werte, Komplexbildner sowie Säure-/Basenzusätze zur Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces.....	61
Abb. 5.3:	Vergleich verschiedener EDTA-Konzentrationen sowie pH-Werte zur Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces	62
Abb. 5.4:	Untersuchungen zur Anzahl der Extraktionszyklen für die Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces	63
Abb. 5.5:	Einfluss des Extraktionsvolumens sowie Anzahl der Extraktionszyklen auf die Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces	63
Abb. 5.6:	Einfluss der Extraktionszeit auf die Analytwiederfindung bei der Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces	64
Abb. 5.7:	Einfluss der Probemenge auf die Analytwiederfindung bei der Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces	65
Abb. 5.8:	Wiederfindungen unter Einsatz verschiedener organischer Lösungsmittel, Lösungsmittelvolumina sowie pH-Werte für die Mikrowellenextraktion.....	67
Abb. 5.9:	Wiederfindungen für diverse wässrige Extraktionslösungen mittels Mikrowellenextraktion und anschließender Festphasenextraktion.....	68
Abb. 6.1:	Analytwiederfindungen für verschiedene Lösungsmittelvolumina bei der Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub	69
Abb. 6.2:	Analytwiederfindungen für verschiedene Extraktionszeiten bei der Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub.	70
Abb. 6.3:	Analytwiederfindungen für verschiedene Probenmengen bei der Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub.....	71
Abb. 8.1:	Plasmakonzentrationsprofil nach der Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 1 mg/kg KG Enrofloxacin	78
Abb. 8.2:	Plasmakonzentrationsprofil nach der Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 3 mg/kg KG Enrofloxacin.....	78
Abb. 8.3:	Metabolisierungsprofil für die Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 1 mg/kg KG Enrofloxacin sowie 3 mg/kg KG Enrofloxacin.....	79
Abb. 8.4:	Faeceskonzentrationsprofil nach Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 0,3 mg/kg KG Enrofloxacin.....	80
Abb. 8.5:	Faeceskonzentrationsprofil nach Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 1 mg/kg Enrofloxacin.....	81

Abb. 8.6:	Faeceskonzentrationsprofil nach Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 3 mg/kg KG Enrofloxacin.....	82
Abb. 8.7:	Faeceskonzentrationsprofil nach Behandlung mit der vom Hersteller empfohlenen Dosis von 10 mg/kg KG Enrofloxacin.....	83
Abb. 8.8:	Metabolisierungsprofil für die Behandlung mit Verschleppungsdosen von 0,3 mg/kg 1 mg/kg; 3 mg/kg sowie der vom Hersteller empfohlenen Dosis von 10 mg/kg.....	84
Abb. 9.1:	Methodenvergleich der Enrofloxacin-Konzentrationen für die Verschleppungsdosis von 1 mg/kg KG Enrofloxacin.....	86
Abb. 9.2:	Methodenvergleich der Enrofloxacin-Konzentrationen für die Verschleppungsdosis von 3 mg/kg KG Enrofloxacin.....	86
Abb. 9.3:	Methodenvergleich der Ciprofloxacin-Konzentrationen für die Verschleppungsdosis von 3 mg/kg KG Enrofloxacin.....	87
Abb. 10.1:	Chronologischer Konzentrationsverlauf für Marbofloxacin und Enrofloxacin in Sedimentationsstaubproben aus dem Forschungsstall R.....	88
Abb. 10.2:	Chronologischer Konzentrationsverlauf für Marbofloxacin und Enrofloxacin in Sedimentationsstaubproben eines Schweinemastbetriebes E.....	89
Abb. 11.1:	Mögliche Metaboliten in Hühnerfaeces.....	91
Abb. 11.2:	TIC-Chromatogramme des möglichen Metaboliten m/z 318.....	97
Abb. 11.3:	TIC-Chromatogramme des möglichen Metaboliten m/z 332.....	98
Abb. 11.4:	TIC-Chromatogramme des möglichen Metaboliten m/z 346.....	98
Abb. 11.5:	TIC-Chromatogramme des möglichen Metaboliten m/z 374.....	99
Abb. 11.6:	TIC-Chromatogramme des möglichen Metaboliten m/z 376.....	99
Abb. 11.7:	Extracted Ion Chromatogramm für die Masse m/z 318,1608.....	103
Abb. 11.8:	Massenspektrum für den möglichen Metaboliten m/z 318,1608.....	103
Abb. 11.9:	Fragmentierungsspektrum die Masse m/z 318,1615.....	104
Abb. 11.10:	Extracted Ion Chromatogramm für die Masse m/z 332,1764.....	105
Abb. 11.11:	Massenspektrum für den möglichen Metaboliten m/z 332,1764.....	105
Abb. 11.12:	Extracted Ion Chromatogramm für die Masse m/z 332,1410.....	106
Abb. 11.13:	Fragmentierungsspektrum für die Masse m/z 332,1767.....	106
Abb. 11.14:	Extracted Ion Chromatogramm für die Masse m/z 346,1194.....	107
Abb. 11.15:	Massenspektrum für den möglichen Metaboliten m/z 346,1194.....	108
Abb. 11.16:	Fragmentierungsspektrum für die Masse m/z 346,1190.....	108
Abb. 11.17:	Extracted Ion Chromatogramm für die Masse m/z 374,1705.....	109
Abb. 11.18:	Massenspektrum für den möglichen Metaboliten m/z 374,1705.....	110
Abb. 11.19:	Fragmentierungsspektrum für die Masse m/z 374,1707.....	110
Abb. 11.20:	Extracted Ion Chromatogramm für die Masse m/z 376,1662.....	111
Abb. 11.21:	Massenspektrum für den möglichen Metaboliten m/z 376,1662.....	112
Abb. 11.22:	Fragmentierungsspektrum für die Masse m/z 376,1664.....	112
Abb. 13.1:	Produktionen Scans.....	135
Abb. 13.2:	SPE-Protokoll Strata X.....	144
Abb. 13.3:	SPE-Protokoll für die Verwendung einer Kombination aus Oasis MAX/MCX.....	145

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Verschiedene Generationen von Chinolon-Antibiotika..	5
Tab. 2.2:	Molare Masse und Strukturformel der eingesetzten Fluorchinolone.	6
Tab. 2.3:	Vergleich der im Jahr 2011 und 2012 abgegebenen Mengen einzelner Antibiotika- klassen.	9
Tab. 2.4:	Überblick über Ciprofloxacin- und Enrofloxacin-Konzentrationen in verschiedenen Oberflächengewässern	13
Tab. 3.1:	Übersicht über die Wiederfindungen der untersuchten SPE Säulen sowie der optimalen Elutionsmittel.	31
Tab. 3.2:	Analytwiederfindung unter Verwendung reduzierter Elutionsvolumina.	35
Tab. 4.1:	Relative Intensität der einzelnen Phosphatidylcholin Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit.	40
Tab. 4.2:	Relative Intensität der einzelnen Lyso Phosphatidylcholin Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit	41
Tab. 4.3:	Relative Intensität der einzelnen Sphingomyelin Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit.	42
Tab. 4.4:	Relative Intensität der einzelnen Phosphatidylethanolamin Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit	43
Tab. 4.5:	Relative Intensität der einzelnen Phosphatidylserin Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit.	44
Tab. 4.6:	Relative Intensität der einzelnen Phosphatidylglycerin Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit	45
Tab. 4.7:	Relative Intensität der einzelnen Phosphatidylinositol Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit	46
Tab. 4.8:	Bestimmung des quantitativen Matrixeffektes.	50
Tab. 4.9:	Phospholipidgehalt im Probenextrakt	55
Tab. 4.10:	Vergleich von Strata X mit der Kombination aus Ionenaustauschern	57
Tab. 7.1:	Ergebnisse der Methodvalidierung zur Extraktion von Hühnerplasma.	73
Tab. 7.2:	Erlaubter Toleranzbereich des Verhältnisses der beiden Massenübergänge für jeden Analyten.	73
Tab. 7.3:	Ergebnisse der Methodvalidierung zur Extraktion von Hühnerfaeces.	74
Tab. 7.4:	Ergebnisse der Methodvalidierung zur Extraktion von Stallstaub.	76
Tab. 10.1:	Fluorchinolongehalt in 40 Sedimentationsstaubproben aus Schweineställen.	90
Tab. 11.1:	Charakteristische Produktionen sowie Fragmentierungsreaktion möglicher Metaboliten in Hühnerfaeces.	93
Tab. 11.2:	Vergleich der absoluten Peakflächen sowie relativen Intensitäten für Massenübergänge der möglichen Metaboliten.	100
Tab. 13.1:	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.	131
Tab. 13.2:	Verwendete Festphasenextraktionskartuschen.	132
Tab. 13.3:	Verwendete Chemikalien.	132
Tab. 13.4:	Ursprünglicher und modifizierter HPLC-Gradient.	134
Tab. 13.5:	Massenspektrometrische Parameter für die Detektion von Fluorchinolonen.	135
Tab. 13.6:	MS-Parameter des Neutralverlust Scans von 141 Da.	136
Tab. 13.7:	MS-Parameter der stoßinduzierten Dissoziation innerhalb der Ionenquelle für die Produktionen m/z 184,1 und m/z 104,1.	136
Tab. 13.8:	MS-Parameter des positiven Vorläuferionen Scans von m/z 184,1 und des negativen Vorläuferionen Scans von m/z 153,3.	137

Tab. 13.9:	MS-Potentiale zur Erfassung von Phospholipiden im positiven sowie im negativen Selected Reaction Monitoring Modus.....	137
Tab. 13.10:	Massenübergänge und Kollisionsenergien zur Erfassung von Phosphatidylcholinen und Lyso Phosphatidylcholinen im positiven Selected Reaction Monitoring Modus.	138
Tab. 13.11:	Massenübergänge und Kollisionsenergien zur Erfassung von Sphingomyelinen und Phosphatidylethanolaminen im positiven Selected Reaction Monitoring Modus.....	138
Tab. 13.12:	Massenübergänge und Kollisionsenergien zur Erfassung von Phosphatidylserinen und Phosphatidylglycerinen im positiven Selected Reaction Monitoring Modus.	139
Tab. 13.13:	Massenübergänge und Kollisionsenergien zur Erfassung von Phosphatidylinositolen und Phosphatidsäure im negativen Selected Reaction Monitoring Modus.....	139
Tab. 13.14:	Geräteparameter der hochauflösenden Massenspektrometrie.....	140

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
amu	atomare Masseneinheit
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (atmospheric pressure chemical ionization)
API	Atmosphärendruck-Ionisation (atmospheric pressure ionization)
AS	Ameisensäure
BG	Bestimmungsgrenze
CE	Kollisionsenergie (collision energy)
CFX	Ciprofloxacin
CFX d8	Ciprofloxacin d8
CEP	Eintrittspotential Kollisionszelle (cell entrance potential)
cps	Zählschritte pro Sekunde (counts per second)
CXP	Austrittspotential Kollisionszelle (collision exit potential)
DiFX	Difloxacin
DP	Declustering-Potential
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFX	Enrofloxacin
EP	Eintrittspotential (entrance potential)
ESI	Elektrospray-Ionisation
FC	Fluorchinolone
FLD	Fluoreszenz-Detektor
FP	Fokussierungs-Potential (focusing potential)
HPLC-MS/MS	Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometer
In-source CID	stoßinduzierte Dissoziation in der Ionenquelle (in-source collision induced dissociation)
KG	Körpergewicht
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid-liquid extraction)
Lyso PC	Lyso Phosphatidylcholine
MDR	Multidrug-resistent
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
ME	Matrixeffekt
MeOH	Methanol
MFX	Marbofloxacin
MW	Mittelwert
<i>m/z</i>	Masse zu Ladungsverhältnis
NLS	Neutralverlust Scan (neutral loss scan)
NWG	Nachweisgrenze
PCI	Post-column-Infusion
PA	Phosphatidylphosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PG	Phosphatidylglycerine
PI	Phosphatidylinositole
PIS	Vorläuferionen Scan (precursor ion scan)

PL	Phospholipide
PS	Phosphatidylserine
RP	Umkehrphase (reversed-phase)
RSD	relative Standardabweichung
SD	Standardabweichung
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SPE	Festphasenextraktion (solid-phase-extraction)
SM	Sphingomyeline
S/N	Signal zu Rauschverhältnis
SRM	Selected Reaction-Monitoring
WDF	Wiederfindung

Zusammenfassung

Antibiotika sind seit ihrer Entwicklung Anfang des 20. Jahrhunderts in der Veterinär- und Humanmedizin wichtige Pharmazeutika zur Behandlung von Infektionskrankheiten. Jedoch ist parallel zum Antibiotikaeinsatz auch die Anzahl resistenter Mikroorganismen gestiegen. In der Veterinärmedizin werden Antibiotika zur Therapie aber auch zur Metaphylaxe eingesetzt, jedoch unterliegt dieser Einsatz strengen Auflagen. Trotz des Verbotes von Antibiotika als Leistungsförderer im Jahr 2006 nimmt ihr Verbrauch kontinuierlich zu. Im Jahr 2011 wurden über 1700 Tonnen Antibiotika an Veterinäre abgegeben (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2012). Auch 2012 war die Abgabemenge mit 1619 Tonnen nur unwesentlich geringer (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2013). Dies kann z. T. auf die erhöhte Nachfrage der Verbraucher an Fleischprodukten und den damit verbundenen Anstieg der Tierbestände zurückgeführt werden.

Fluorchinolone sind synthetische Antibiotika, die auf Grund ihrer günstigen pharmakologischen Eigenschaften in der Humanmedizin – insbesondere in Form von Ciprofloxacin – häufig verschrieben werden. In der Veterinärmedizin hingegen werden sie wegen ihres Status als Reserveantibiotika und ihres vergleichsweise hohen Preises in einem deutlich geringeren Umfang eingesetzt.

Über den Zusammenhang zwischen der Aufnahme subtherapeutischer Antibiotikadosen und der damit verbundenen Induktion resistenter Mikroorganismen ist wenig bekannt. Aus diesem Grund ist die Entwicklung und Anwendung sensitiver Methoden zum Nachweis von Fluorchinolonen in biologischen Matrices bei gleichzeitiger Verfolgung der Resistenzentwicklung ein wichtiges Forschungsgebiet. Dazu wurden im Rahmen dieses Projektes Hühner mit subtherapeutischen Dosen (Simulation von Verschleppungen) und der vom Hersteller empfohlenen Dosis des in der Veterinärmedizin am häufigsten eingesetzten Fluorchinolons Enrofloxacin unter definierten Bedingungen behandelt und die Konzentration u. a. in Faeces- und Plasmaproben bestimmt.

In dieser Arbeit wurden neue, selektive und sensitive Methoden zur Extraktion sowie zum Nachweis von Fluorchinolonen mittels LC-MS/MS in biologischen Matrices wie Plasma und Faeces erfolgreich entwickelt. Die Extraktion von Hühnerplasma erfolgte mittels Festphasenextraktion. Hierbei hat sich gezeigt, dass bei der Verwendung von Umkehrphasen auf Polymerbasis die Analytbestimmung von Matrixeffekten beeinflusst wird, die durch einen geeigneten Waschschrift sowie der Verwendung von Methanol als Elutionsmittel im

Vergleich zu Acetonitril oder angesäuerten Elutionsmitteln minimiert, jedoch nicht vollständig eliminiert werden. Daher ist eine Kompensation dieser Matrixeffekte erforderlich. Eine Kombination aus Mixed-Mode-Ionenaustauschern zeigte hingegen keine Beeinflussung der Fluorchinolonanalytik durch Matrixeffekte und wurde somit für weitere Untersuchungen verwendet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Phospholipide geeignete Marker zur Evaluierung von Matrixeffekten sind.

Die Extraktion von Fluorchinolonen aus Hühnerfaeces ist, auf Grund der starken Sorption dieser Verbindungen an Matrixbestandteile, schwierig. Jedoch konnten die Wechselwirkungen zwischen Matrix und Analyt durch den Zusatz von EDTA während des Extraktionsprozesses minimiert werden.

Insgesamt wurden 220 Hühnerfaecesproben unterschiedlicher Behandlungsszenarien auf ihren Gehalt an Enrofloxacin und seines Hauptmetaboliten Ciprofloxacin untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Enrofloxacin hauptsächlich unmetabolisiert ausgeschieden wird, die durchschnittliche Metabolisierung zu Ciprofloxacin jedoch mit steigender Enrofloxacinosis zunimmt. Die beiden Wirkstoffe konnten in Faecesproben bei Gabe von subtherapeutischen Enrofloxacinosen (0,3; 1 und 3 mg/kg Körpergewicht) sowie der vom Hersteller empfohlenen Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht Enrofloxacin mit maximalen Konzentrationen von ca. 60 mg/kg Enrofloxacin und ca. 20 mg/kg Ciprofloxacin bestimmt werden. Beide Antibiotika wurden im Spurenbereich in Kontrollproben detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die Aufnahme der Wirkstoffe wahrscheinlich über Verschleppungen, wie z. B. über Stallstaub, erfolgte.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit Faecesproben auf 14 mögliche Enrofloxacin-Metaboliten untersucht, wodurch sich Hinweise auf drei neue Metaboliten, deren Anwesenheit in Vögeln und Säugetieren zuvor nicht in der Literatur beschrieben wurde, ergaben.

Abstract

Since their discovery at the beginning of the 20th century antibiotics are important pharmaceuticals for the treatment of infectious diseases in veterinary and human medicine. However, simultaneously to the use of antibiotics also the number of resistant strains of bacteria has risen steadily. In veterinary medicine, antibiotics are used not only for therapeutic but also for metaphylactic purposes, which are allowed under strict requirements. Despite the ban of antibiotics as growth promoters in 2006 the consumption rises continuously. In 2011, more than 1700 tons of antibiotics were purchased by veterinarians in Germany (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2012). The amount in 2012 was only slightly lower (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2013). This can be attributed partially to the increased consumer demand for meat products and the associated increase in livestock population.

Fluoroquinolones are synthetic antibiotics which are frequently used in human medicine (especially ciprofloxacin) because of their good pharmacological properties. However, in veterinary medicine they are used to a much lesser extent because of their status as antibiotics of last resort and their high price.

Little is known about the relationship between the intake of subtherapeutic antibiotic doses and the associated induction of resistant microorganisms. Therefore, the development and application of sensitive methods for the detection of fluoroquinolones in biological matrices and the simultaneous monitoring of resistance development is an important field of research. Hence, as part of this project chickens were treated with subtherapeutic and therapeutic enrofloxacin – the fluoroquinolone which is mainly applied in veterinary medicine – doses under defined conditions. The concentration of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin were determined in feces and plasma samples.

In this work, new, selective and sensitive methods for the extraction and detection of fluoroquinolones by LC-MS/MS in biological matrices such as plasma and feces were successfully developed. The extraction of chicken plasma was carried out by solid-phase-extraction. When using polymer-based reversed-phase materials the analysis is influenced by matrix effects which can be minimized using an appropriate washing step and methanol as elution solvent in comparison to acetonitrile or acidified elution solvents. These matrix effects have to be compensated, e. g. by the use of an in-matrix-calibration. However, the combination of a mixed-mode-anion-exchange material and a mixed-mode-cation-exchange material showed

no influence of the fluoroquinolone analysis by matrix effects. Therefore, this combination was used for sample preparation. Furthermore, it was shown that phospholipids are a suitable marker for the evaluation of matrix effects.

The extraction of fluoroquinolones from chicken feces is difficult due to the high sorption potential of these compounds to matrix components. However, matrix interactions were minimized by the addition of EDTA during the extraction process.

In total, 220 chicken feces samples of different treatment scenarios were analyzed. Enrofloxacin is mainly excreted unchanged. However, only small amounts are metabolized into ciprofloxacin. The average metabolism increased with increasing enrofloxacin doses. Both antibiotics were detected in feces samples of subtherapeutic and therapeutic doses with maximum concentrations of 60 mg/kg enrofloxacin and 20 mg/kg ciprofloxacin. They were also determined at trace levels in control samples of chickens indicating a possible intake of these agents by carryover (e.g. stable dust).

Furthermore, feces samples were investigated for 14 possible enrofloxacin metabolites. The results indicate the presence of three new metabolites which have never been reported for birds and mammals before.

1. Einleitung und Problemstellung

Fluorchinolone sind synthetische Antibiotika, die auf Grund ihres breiten Wirkungsspektrums und ihrer geringen Nebenwirkungen sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin von Relevanz sind. In der Veterinärmedizin wird hauptsächlich Enrofloxacin, z. B. für die Behandlung von Infektionskrankheiten bei Geflügel, eingesetzt (Martinez *et al.* 2006). Seit ihrer Markteinführung Ende der 1980er Jahre hat sich die Anzahl sowie der Anteil Fluorchinolon-resistenter Keime stetig erhöht, wodurch die therapeutischen Möglichkeiten zunehmend eingeschränkt werden (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2009). Resistente Keime können sowohl bei Mensch, Tier, Lebensmitteln als auch in der Umwelt vorhanden sein und sowohl zwischen als auch innerhalb dieser Gruppen übertragen werden. Insbesondere die Übertragungswege sowie -mechanismen zwischen Tier und Mensch sind aus medizinischer Sicht von Interesse. Dabei zeigt Geflügelfleisch einen wesentlich höheren Anteil an resistenten *E. coli* Bakterien im Vergleich zu Rind- oder Schweinefleisch (Käsbohrer 2012).

Der Einsatz von Antibiotika ist in der intensiven Nutztierhaltung weit verbreitet (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2012). Durch den Gebrauch dieser Wirkstoffe können Antibiotikaresistenzen induziert werden und so die Wirkung der Antibiotika beeinträchtigt werden. Daher muss der Einsatz von Antibiotika in Hinblick auf die Verabreichungsform, Dosierung, Behandlungsdauer sowie Freisetzung, Verteilung und Anreicherung in der Umwelt kritisch betrachtet werden. Vor allem die ungewollte Aufnahme über die Stallumgebung, z. B. durch Staub oder getrocknete Exkremente, und die damit möglicherweise verbundene Induktion resistenter Keime muss genauer untersucht werden, da angenommen wird, dass insbesondere die Aufnahme subtherapeutischer Konzentrationen über einen langen Zeitraum zu Resistenzen führen kann. Aus diesem Grund ist es auch notwendig, selektive und sensitive Methoden zum Nachweis dieser Substanzen in biologischen Matrices wie u. a. Plasma und Faeces zu entwickeln.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung geeigneter Extraktionsmethoden für die Bestimmung von Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin im Spurenbereich (ng/L bzw. ng/kg) in Hühnerplasma, Hühnerfaeces sowie Stallstaub mittels LC-MS/MS und die Anwendung der entwickelten Methoden im Rahmen von Fütterungsversuchen. Hierzu wurden Hühner mit subtherapeutischen Enrofloxacinosen und der vom Hersteller empfohlenen Enrofloxacinosis behandelt. Das Antibiotikum sollte hierbei sowohl über das Tränkwasser als auch über

das Futter verabreicht und an definierten Zeitpunkten die Enrofloxacin-Konzentration sowie die Konzentration seines aktiven Metaboliten Ciprofloxacin in verschiedenen Matrices bestimmt werden.

Zusätzlich sollten Methoden zur Evaluierung und Minimierung von Matrixeffekten in der LC-MS/MS-Analytik von Hühnerplasma entwickelt werden. Diese Teilarbeit beinhaltete auch die Optimierung von Probenvorbereitungsmethoden. Ein weiteres Ziel war die Identifizierung neuer Enrofloxacin-Metaboliten in Hühnerfaeces.

2. Stand der Literatur

2.1 Fluorchinolone

2.1.1 Allgemeines

Fluorchinolone sind synthetische, hochwirksame Antibiotika, die sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin verwendet werden. Diese Wirkstoffe zeichnen sich durch eine geringe Anzahl an Nebenwirkungen, ein großes Wirkungsspektrum gegenüber gram-negativen und gram-positiven Bakterien sowie einer guten Bioverfügbarkeit, Verteilung im Körper und Gewebegängigkeit aus (Martinez *et al.* 2006). Als Vorgänger der Fluorchinolone gilt das nicht fluorierte Antibiotikum Nalidixinsäure, das als Nebenprodukt der Malariaforschung Anfang der 1960er Jahre entdeckt wurde. Die Anwendung von Nalidixinsäure war jedoch auf Grund seiner schlechten pharmakologischen Eigenschaften auf die Behandlung von Harnwegsinfektionen beschränkt (Ball 2000). Daher wurde intensiv nach wirksameren Antibiotika geforscht, wodurch Ende der 1970er Jahre der Durchbruch gelang, indem erstmals durch die Einführung eines Fluoratoms sowie Piperazinrestes Fluorchinolone synthetisiert werden konnten. Durch diese Substituenten wurden die Bioverfügbarkeit sowie die Verteilung im Körper erheblich verbessert. Somit konnten Wirkstoffe mit einer bis zu 1000fach höheren antimikrobiellen Wirkung im Vergleich zu Nalidixinsäure entwickelt werden (Gootz und Brighty 1996; Mokrushina *et al.* 1995).

2.1.2 Struktur-Wirkungsbeziehung

Fluorchinolone besitzen ein gemeinsames Grundgerüst (Abb. 2.1). Für die antimikrobielle Aktivität sind fünf Strukturkomponenten ausschlaggebend:

- Substituierung (z. B. Ethyl- oder Cyclopropylgruppe) an R₁,
- Carboxylgruppe an C-3
- Ketogruppe an C-4
- Fluorierung an R₆
- Substituierung an R₇ (z. B. Piperazinrest) (Martinez *et al.* 2006).

Insbesondere durch die Fluorierung an R₆ konnte das antibakterielle Wirkungsspektrum nachhaltig verbessert werden. Einige neuere Fluorchinolone sind nicht nur an R₆ fluoriert, sondern auch an Position X. Durch diese strukturelle Modifikation konnten die Bioverfügbarkeit

sowie Eliminationshalbwertszeit (Plasmahalbwertszeit) weiter verbessert werden. Jedoch wird dadurch auch die Phototoxizität erhöht (Wright *et al.* 2000). Die Carboxylgruppe an C-3 sowie die Ketogruppe an C-4 sind entscheidend für den Wirkmechanismus der Fluorchinolone (Sukul und Spiteller 2007). Des Weiteren wird durch die Einführung eines Substituenten an die R₁-Position die antimikrobielle Aktivität gegenüber gram-negativen als auch gram-positiven Bakterien gesteigert (Mokrushina *et al.* 1995). Die Diffusion der Wirkstoffe durch die Bakterienzellwand sowie die antimikrobielle Aktivität gegenüber gram-negativen Bakterien wurden durch die Einführung eines Piperazinrestes an R₇ verbessert (Appelbaum und Hunter 2000).

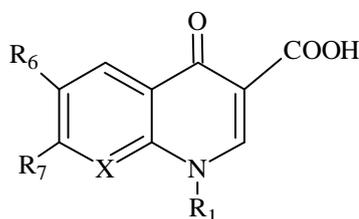


Abb. 2.1: Grundgerüst der Chinolon-Antibiotika.

Auf Grund ihres amphoteren Charakters ist die Ladung der meisten Fluorchinolone bei physiologischem pH-Wert neutral. Dies ermöglicht ihnen die ungehinderte Diffusion durch biologische Membranen. Die Diffusion ins Gewebe wird durch die geringe Wasserlöslichkeit und erhöhte Fettlöslichkeit bei physiologischem pH-Wert verstärkt. Abhängig von den pK_s-Werten eines Wirkstoffes, kann es bei einem pH-Gradienten zwischen Gewebe und Blut zur Anreicherung eines Wirkstoffes in einem Kompartiment kommen (Ionenfallen-Prinzip). Folglich verbleibt der ionisierte Wirkstoff im Gewebe, was zu erhöhten Konzentrationen im Vergleich zum Blut führt (Martinez *et al.* 2006).

2.3.3 Gruppierung

Anhand ihres antimikrobiellen Wirkungsspektrums, ihrer Wirksamkeit und ihren pharmakologischen Eigenschaften werden Fluorchinolone in vier verschiedene Generationen (Tab. 2.1) gruppiert (Blondeau 2004; Burgmann 2007; Martinez *et al.* 2006; Scholar 2003).

Tab. 2.1: Verschiedene Generationen von Chinolon-Antibiotika.

Generation	Wirkstoff
1	Nalidixinsäure, Oxolinsäure, Pipemidsäure, Cinoxacin
2	Norfloxacin, Enoxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Marbofloxacin, Difloxacin
3	Orbifloxacin, Levofloxacin, Sparfloxacin, Grepafloxacin
4	Trovafoxacin, Gatifloxacin, Clinafloxacin, Moxifloxacin, Gemifloxacin, Sitafoxacin

Die erste - noch nicht fluorierte - Generation zeichnet sich durch eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, Verteilung im Körper sowie ein auf wenige gram-negative Bakterien (z. B. *Escherichia coli*) beschränktes Wirkungsspektrum aus. Durch die Fluorierung an R₆ konnte das Anwendungsgebiet über Harnwegsinfektionen hinaus erweitert werden. Des Weiteren war auf Grund der erhöhten antimikrobiellen Aktivität gegenüber gram-negativen sowie gram-positiven Bakterien ein Einsatz dieser zweiten Generation zur Behandlung systemischer Infektionen möglich (Carlucci 1998; Martinez *et al.* 2006). Die dritte Generation verfügt über eine erhöhte intrinsische Aktivität gegenüber gram-positiven Bakterien, wie z. B. Streptokokken oder Staphylokokken (Burgmann 2007). Die vierte Generation der Chinolon-Antibiotika unterscheidet sich durch die Einführung einer Methoxy-Seitengruppe an Position X wodurch sie ein erweitertes Wirkungsspektrum gegenüber anaeroben Bakterien, Chlamydien und Mykoplasmen aufweist. Zusätzlich konnte die antimikrobielle Aktivität gegenüber gram-positiven Bakterien erhöht werden (Blondeau 2004; Carlucci 1998; Martinez *et al.* 2006).

2.3.4 Wirkmechanismus

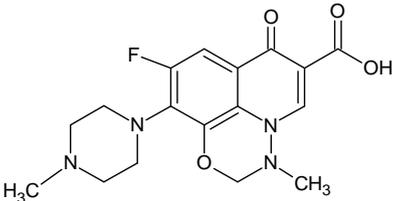
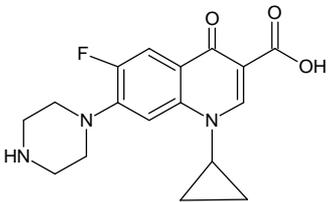
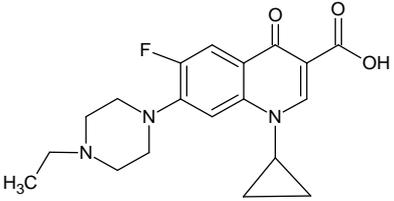
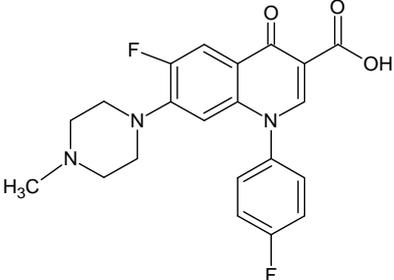
Der Wirkmechanismus der Fluorchinolone beruht auf der Inhibierung der beiden bakterien-eigenen Topoisomerasen II (Gyrase) und IV, die für das Wachstum von Bakterien unabdingbar sind. Topoisomerasen sind Enzyme, die für die räumliche Anordnung von Nukleinsäuren in der Bakterienzelle verantwortlich sind (Martinez *et al.* 2006; Scholar 2003). Durch die irreversible Bildung eines Fluorchinolon-DNA-Gyrase-Komplexes wird die DNA Replikation und Transkription verhindert wodurch auch die Vermehrung gestoppt wird. Topoisomerase IV ist notwendig, um replizierte Tochterchromosomen voneinander zu trennen. Wird dies verhindert, kann keine Verteilung der Chromosomen in beide Tochterzellen stattfinden und die Proliferation kommt zum Stillstand (Blondeau 2004; Martinez *et al.* 2006; Scholar 2003; Wiedemann und Heisig 2001). Bei gram-negativen Bakterien zielt die Wirkung der Fluor-

chinolone insbesondere auf die Inhibierung der Gyrase ab, bei gram-positiven Bakterien wird vorwiegend Topoisomerase IV gehemmt (Burgmann 2007).

2.3.5 Eingesetzte Fluorchinolone

In dieser Arbeit waren vor allem das in der Veterinärmedizin eingesetzte Enrofloxacin und sein Hauptmetabolit Ciprofloxacin von Interesse. Ciprofloxacin ist ausschließlich für die Verwendung in der Humanmedizin zugelassen. Zusätzlich wurden Marbofloxacin und Difloxacin in die Methodik integriert, da sie von zunehmender Bedeutung in der Veterinärmedizin sind.

Tab. 2.2: Molare Masse und Strukturformel der eingesetzten Fluorchinolone.

Fluorchinolon	Molare Masse [g/mol]	Strukturformel
Marbofloxacin	362,36	
Ciprofloxacin	331,34	
Enrofloxacin	359,39	
Difloxacin	399,39	

Enrofloxacin wurde Ende der 1980er Jahre in Deutschland als erstes Fluorchinolon in der Veterinärmedizin zugelassen. In der Leber wird es durch Deethylierung in Ciprofloxacin metabolisiert (je nach Spezies bis zu 40 %), welches sich auf Grund seines breiten Wirkungsspektrums von einem Reserveantibiotikum in den 1980er Jahren zu einem der momentan am häufigsten eingesetzten Antibiotika in der Humanmedizin entwickelt hat. Ciprofloxacin gilt zudem als das potenteste Fluorchinolon zur Behandlung von Infektionen, die durch gram-negative Bakterien ausgelöst werden (Carlucci 1998). Des Weiteren kommen Studien, die die Wirksamkeit von Enrofloxacin und Ciprofloxacin gegenüber ausgewählten Bakterien verglichen haben, zu dem Ergebnis, dass Ciprofloxacin eine wesentlich größere antimikrobielle Wirkung aufweist (Mevius *et al.* 1990; Prescott und Yielding 1990). Daher wird vermutet, dass die Wirksamkeit von Enrofloxacin vor allem auf der Metabolisierung in Ciprofloxacin beruht (Küng *et al.* 1993). Die Ausscheidung beider Wirkstoffe erfolgt vorwiegend renal, aber auch eine biliäre Elimination ist möglich (Lode *et al.* 1990).

In der Europäischen Union sind Marbofloxacin, Enrofloxacin und Difloxacin für die Behandlung von Haustieren, aber auch von Nutztieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen wie Rindern, Schweinen und Geflügel, zugelassen. Diese Wirkstoffe werden vorwiegend zur Behandlung von Infektionen der Atemwege sowie des Gastrointestinaltraktes eingesetzt (Martinez *et al.* 2006). Erhöhte Rückstandskonzentrationen dieser Antibiotika in tierischen Produkten wie Milch, Fleisch oder Organen werden als Risiken für die menschliche Gesundheit angesehen. Daher wurden maximale Rückstandshöchstmengen (MRL - maximum residue level) festgelegt, die nicht überschritten werden dürfen. Die maximale Rückstandshöchstmenge für Enrofloxacin setzt sich aus der Summe von Enrofloxacin und seinem Metaboliten Ciprofloxacin zusammen und beträgt z.B. für Geflügelfleisch 100 µg/kg (Commission of the European Communities 1990).

2.2 Verbrauch von Veterinärantibiotika

Antibiotika sind in der Veterinärmedizin eine Wirkstoffgruppe mit enormer Bedeutung. Dies zeigen auch vom Bundesverband für Tiergesundheit e. V. herausgegebene Daten für den Tierarzneimittelmarkt in Deutschland im Jahr 2012. Demzufolge liegen Antiinfektiva - zu denen Antibiotika gezählt werden - mit einem Umsatz von 25 % nach den pharmazeutischen Spezialitäten (30 %), Biologika (26 %) knapp auf dem dritten Rang gefolgt von Antiparasitika (18 %) (Bundesverband für Tiergesundheit e.V. 2013).

Im September 2012 veröffentlichte das BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) erstmals genauere Daten zur Abgabemenge von Veterinärantibiotika in Deutschland (Abb. 2.2). Demzufolge wurden im Jahr 2011 über 1700 Tonnen Antibiotika an Veterinäre abgegeben, davon 99 % in der Nutztierhaltung. Die am häufigsten abgegebenen Antibiotika gehören entweder zur Klasse der Tetracykline (576 Tonnen) oder Aminopenicilline (505 Tonnen) (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2012). Im Vergleich dazu ist die Abgabemenge von Fluorchinolonen mit 8 Tonnen wesentlich geringer, wovon 75 % in Form von Enrofloxacin verbraucht wurden (Wallmann *et al.* 2012). Gründe für die geringe Abgabemenge sind zum einen, dass Fluorchinolone in der Veterinärmedizin auf Grund ihres breiten Wirkungsspektrums als Reserveantibiotika angesehen werden und zum anderen sind sie im Vergleich zu den anderen Wirkstoffen sehr teuer. Des Weiteren ist zu beachten, dass in der Statistik nur die Abgabemengen berücksichtigt wurden. Im Gegensatz zu Tetracyklinen sind Fluorchinolone hochwirksame Antibiotika, die in wesentlich geringeren Dosen verabreicht werden können.

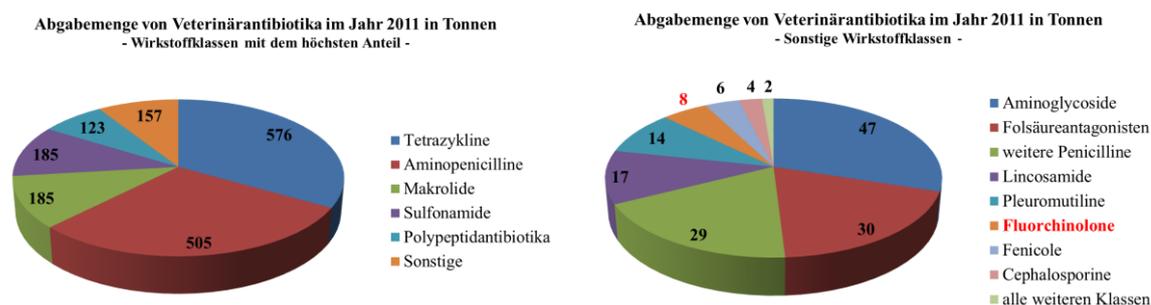


Abb. 2.2: Abgabemengen von Veterinärantibiotika 2011 in Deutschland (Wallmann *et al.* 2012).

Im November 2013 wurden die Abgabemengen für das Jahr 2012 vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit veröffentlicht. Die Gesamtabgabemenge ist mit 1619 Tonnen im Vergleich zu 2011 nur unwesentlich geringer; jedoch ist die Menge abgegebener Fluorchinolone um 25 % auf 10 Tonnen gestiegen. Ebenso ist die abgegebene Menge an Cephalosporinen, die wie Fluorchinolone als Reserveantibiotika gelten, um über 60 % gestiegen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2013). Ein Vergleich der einzelnen Antibiotikaklassen für das Jahr 2011 und 2012 ist in Tab. 2.3 aufgeführt.

Tab. 2.3: Vergleich der im Jahr 2011 und 2012 abgegebenen Mengen einzelner Antibiotikaklassen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2013, Wallmann *et al.* 2012)

Antibiotikaklasse	Abgegebene Menge 2011 [t]	Abgegebene Menge 2012 [t]	Differenz [%]
Tetrazykline	564	566	+ 0,4
Aminopenicilline	528	498	- 5,7
Makrolide	173	145	- 16,2
Sulfonamide	185	162	- 12,4
Polypeptidantibiotika	127	124	+ 2,4
Aminoglycoside	47	40	- 14,9
Fölsäureantagonisten	30	26	- 13,3
Lincosamide	17	15	- 11,8
Pleuromutiline	14	18	+ 28,6
Fluorchinolone	8	10	+ 25,0
Fenicole	6	6	± 0,0
Cephalosporine	5,5	9	+ 63,6

Im Jahr 2008 wurde ein Bericht über den Antibiotikaverbrauch sowie Antibiotikaresistenzen unter der Schirmherrschaft des Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. und der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg veröffentlicht. Zur Ermittlung des Antibiotikaverbrauchs wurde aus den verkauften Einheiten über die angegebenen Konzentrationen die Wirkstoffmenge berechnet. Angegeben wurden Gesamtverbrauchsdaten für die Jahre 2003 (724 Tonnen) und 2005 (784 Tonnen) (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2008). Diese Werte können nicht direkt mit den veröffentlichten Abgabemengen von 2011 und 2012 verglichen werden. Jedoch ist damit zumindest eine grobe Abschätzung des Antibiotikaeinsatzes zwischen 2005 und 2011 möglich. Demnach hätte sich beispielsweise der Einsatz von Veterinärantibiotika in diesem Zeitraum mehr als verdoppelt. Dies gilt auch für die Gruppe der Fluorchinolone, deren Verbrauch/Abgabe von 3,7 Tonnen (2005) auf 8 Tonnen (2011) gestiegen ist (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2008 und 2012). Auf Grund des Verbotes von Antibiotika als Leistungsförderer in der Veterinärmedizin im Jahr 2006 ist dieser Anstieg nicht zu erwarten gewesen. Von der FEDESA (European Federation of Animal Health) wurden Antibiotikaverbrauchsmengen (Human- und Veterinärmedizin) in der Europäischen Union für die Jahre 1997 (12752 Tonnen) und 1999 (13216 Tonnen) publiziert. Darüber hinaus wurde der Anteil der verbrauchten Antibiotika als Leistungsförderer in der Veterinärmedizin ermittelt. Dieser betrug 46 % im Jahr 1997 und konnte im Jahr 1999 auf 20 % reduziert werden (FEDESA 2001). Über das Jahr 1999 hinaus sind keine Daten zum Verbrauch von Antibiotika als Leistungsförderer bekannt. Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Anteil bis 2006 weiter reduziert wurde.

2.3 Antibiotika in der Umwelt

2.3.1 Allgemeines

Die Antibiotikamengen, die sowohl durch die Human- als auch durch die Veterinärmedizin in die Umwelt eingetragen werden, sind beträchtlich. Haupteintragswege durch die Humanmedizin sind vor allem die Ausscheidung und unsachgemäße Entsorgung von Antibiotika über das Abwassersystem. Ohne eine effiziente Eliminierung durch geeignete Wasseraufbereitungsverfahren in der Kläranlage können diese Wirkstoffe die aquatische Umwelt wie Oberflächen-, Grund- oder Trinkwasser erreichen. Im Gegensatz dazu findet der Eintrag von Veterinärantibiotika hauptsächlich in die terrestrische Umwelt - und von dort je nach Eigenschaften der Stoffe weiter in das aquatische System (Antibiotikarückstände im Sickerwasser können in das Oberflächen- und Grundwasser gelangen) - statt (Holm *et al.* 1995). Alleine durch die Verwendung von tierischen Ausscheidungen als Dünger in der Landwirtschaft gelangen jährlich hunderte Tonnen Antibiotika in die Umwelt (Kemper 2008). Des Weiteren gelangen Antibiotika durch die Verwendung in Aquakulturen unmittelbar in die aquatische Umwelt sowie Sedimente (Ervik *et al.* 1994; Samuelsen *et al.* 1994). Ein weiterer, mengenmäßig jedoch von untergeordneter Bedeutung, Eintragungsweg von Veterinärantibiotika in die Umwelt ist durch die Abluft von antibiotikabelasteten Stallstäuben (Hamscher *et al.* 2003).

Mehrere mit dem Eintrag von Antibiotika in die Umwelt verbundene Risiken werden in Betracht gezogen u. a. die Entstehung von resistenten Mikroorganismen sowie eine Beeinflussung mikrobiologischer Lebensgemeinschaften. Die Entstehung von Antibiotikaresistenzen hat vor allem eine Verschlechterung der therapeutischen Anwendbarkeit zur Folge. Obwohl mögliche Risiken und Konsequenzen für die Umwelt nicht umfassend abgeschätzt werden können, gibt es bisher keine Regelungen über Grenzwerte oder maximale Eintragungsmengen (Kemper 2008). Jedoch wurden vom VICH (Steering Committee of Veterinary International Committee on Harmonization) sowie der EMA (European Medicines Agency) Schwellenwerte von 10 ng/L für die aquatische Umwelt und 100 µg/kg für Boden festgelegt, ab denen mit ökotoxischen Effekten, die durch Antibiotika ausgelöst wurden, zu rechnen ist. Auf Grund neuer Studien und Erkenntnisse sind diese pauschalen Schwellenwerte für alle Wirkstoffe wissenschaftlich nicht vertretbar, sondern sollten laut Montforts (2005) für die aquatische Umwelt auf 0,4 ng/L und für Boden auf 1 µg/kg gesenkt werden.

2.3.2 Ausscheidung und Abbau

Im Organismus werden Antibiotika häufig nicht vollständig abgebaut, sondern in Form der Muttersubstanz oder ihrer Metaboliten ausgeschieden (Kümmerer *et al.* 2000; Thiele-Bruhn 2003). Die Ausscheidungsraten sind sowohl vom Organismus als auch vom Wirkstoff abhängig. In der Umwelt können insbesondere Phase-II-Metaboliten, also Konjugate, teilweise wieder in die Muttersubstanz transformiert werden (Christian *et al.* 2003). Das Verhalten dieser Wirkstoffe in der Umwelt hängt stark von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Struktur, Molekülgröße, Ladung, Löslichkeit und Hydrophobizität ab. Im Boden adsorbieren die meisten Antibiotika sehr schnell an Matrixbestandteile, wobei die antimikrobielle Aktivität minimiert aber nicht zwangsläufig eliminiert wird (Kemper 2008).

Der Abbau von Antibiotika in der Umwelt ist von vielen Faktoren wie z. B. Temperatur und Bodentyp abhängig. Sowohl abiotische als auch biotische Eliminationsprozesse sind möglich und wirken der Akkumulation dieser Wirkstoffe im Boden entgegen. Hauptsächlich werden Antibiotika im Boden durch mikrobielle Prozesse wie z. B. enzymatische Reaktionen (Hydroxylierung oder Decarboxylierung) transformiert. Im Gegensatz zur aquatischen Umwelt spielt die Photodegradation in der terrestrischen Umwelt eine untergeordnete Rolle, da die antimikrobiellen Wirkstoffe im Boden oder Gülle nur an der Oberfläche Licht ausgesetzt sind (Kemper 2008; Sukul und Spitteller 2007).

2.3.3 Fluorchinolone in der Umwelt

Fluorchinolone verlassen den Organismus nahezu unverändert oder nur teilweise metabolisiert (Sörgel und Kinzig 1993; Tyczkowska *et al.* 1989). Daher werden sie sowohl in der terrestrischen als auch in der aquatischen Umwelt in Konzentrationen oberhalb der empfohlenen Schwellenwerte gefunden. Der Abbau von Fluorchinolonen in der terrestrischen Umwelt wird durch ihre starke Adsorption an Bodenbestandteile sowie unspezifische Adsorption an gelöstem organischem Material im Boden verzögert (Hektoen *et al.* 1995; Marengo *et al.* 1997; Wetzstein *et al.* 1997). Studien zeigen, dass der Piperazinrest der Fluorchinolone vorwiegend verantwortlich für die Sorption im Boden ist. Allerdings wird dieses Strukturelement teilweise im Boden dealkyliert oder hydroxyliert, wodurch die antimikrobielle Aktivität minimiert wird (Tolls 2001).

In der Umwelt werden Fluorchinolone unter aeroben Bedingungen wesentlich schneller abgebaut. Der Abbau durch mikrobielle Abbauprozesse spielt dabei eine untergeordnete Rolle (Al-Ahmad *et al.* 1999; Kümmerer *et al.* 2000; Marengo *et al.* 2001). Jedoch können

Ciprofloxacin und Enrofloxacin durch Pilze ohne Abbau des heterozyklischen Ringes transformiert werden (Parshikov *et al.* 1999; Wetzstein *et al.* 1999). In den aquatischen Umweltkompartimenten ist vor allem die Photodegradation ein wichtiger Abbauschritt. Die überwiegenden Reaktionsmechanismen sind dabei: Oxidation, Dealkylierung und Spaltung des Piperazinringes (Burhenne *et al.* 1999).

Gülle

Ein Eintragsweg von Fluorchinolonen in die Umwelt ist die Düngung von landwirtschaftlichen Nutzflächen mit antibiotikahaltiger Gülle. Ciprofloxacin sowie Enrofloxacin konnten sowohl in Schweine-, Rinder-, Hühner- als auch Truthahnfaeces nachgewiesen werden. Die in Schweinegülle gefundenen Konzentrationen variieren zwischen 0,27 und 34 mg/kg (Pierini *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2010). In einer Studie von Zhao *et al.* (2010) wurden in 25 % aller untersuchten Schweinegülleproben Enrofloxacin (Mittelwert: 2 mg/kg) und Ciprofloxacin (Mittelwert: 2 mg/kg) in 49 % der analysierten Proben nachgewiesen. Martinez-Carballo *et al.* (2007) konnten in 25 % aller Hühnerfaecesproben und 38 % aller Truthahnfaecesproben Enrofloxacin mit einer maximalen Konzentration von 2,8 mg/kg respektive 8,3 mg/kg detektieren. Ähnliche Ergebnisse wurden von Zhao *et al.* (2010) veröffentlicht, die in 35 % aller Hühnerfaecesproben im Durchschnitt 4,7 mg/kg Enrofloxacin bestimmt haben. In China konnte Enrofloxacin in einer Probe mit einer Konzentration von 1,4 g/kg nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten Enrofloxacin (Mittelwert: 6,8 mg/kg) und Ciprofloxacin (Mittelwert: 3,4 mg/kg) in 64 % bzw. 25 % aller untersuchten Rindergülleproben detektiert werden (Zhao *et al.* 2010).

Boden

In Studien von Martinez-Carballo *et al.* (2007) konnten in 17 % der untersuchten Bodenproben sowohl Enrofloxacin als auch Ciprofloxacin in Konzentrationen von bis zu 0,37 mg/kg nachgewiesen werden. Obwohl Ciprofloxacin in der Veterinärmedizin nicht zugelassen ist, wurde es in zu Enrofloxacin vergleichbaren Konzentrationen im Boden detektiert. Jedoch ist Klärschlamm, welcher vor allem Ciprofloxacin aus humanmedizinischen Anwendungen enthält, unter bestimmten Umständen zum Düngen von landwirtschaftlichen Nutzflächen zugelassen, so dass Golet *et al.* (2002) bis zu 0,45 mg/kg Ciprofloxacin in mit Klärschlamm gedüngten Böden nachweisen konnten. Karıcı und Balcıoğlu (2009) konnten in Bodenproben, die sieben Monate zuvor mit fluorchinolonhaltiger Gülle behandelt wurden, Enrofloxacin-Gehalte von bis zu 0,05 mg/kg nachweisen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die

hohe Affinität von Fluorchinolonen zur Bodenmatrix, sowie die Stabilität dieser Substanzklasse im Boden über einen längeren Zeitraum.

Wasserkompartimente

Zahlreiche Studien in Europa, Asien und Amerika beschäftigen sich mit der Bestimmung von Fluorchinolonen in Oberflächengewässern (Tab. 2.3). Der Fokus liegt dabei zumeist auf dem Nachweis von Ciprofloxacin (Calamari *et al.* 2003; Christian *et al.* 2003; Golet *et al.* 2002a; Nakata *et al.* 2005; Pena *et al.* 2007; Peng *et al.* 2008; Pozo *et al.* 2006; Senta *et al.* 2008; Vieno *et al.* 2006). Jedoch wurde vereinzelt auch Enrofloxacin bestimmt (Nakata *et al.* 2005; Pena *et al.* 2007; Sturini *et al.* 2009). Die in Flüssen gefundenen Ciprofloxacin-Konzentrationen variieren zwischen 5 ng/L und 459 ng/L (Golet *et al.* 2002a; Peng *et al.* 2008). Enrofloxacin konnte in Portugal in Konzentrationen von bis zu 103 ng/L detektiert werden (Pena *et al.* 2007). Im Vergleich dazu wurden in Italien in der Nähe von landwirtschaftlichen Betrieben Flussproben entnommen, in denen bis zu 37 ng/L Enrofloxacin bestimmt werden konnten (Sturini *et al.* 2009). Daher liegt die Vermutung nahe, dass Enrofloxacin durch die Düngung mit antibiotikahaltiger Gülle in Oberflächengewässer gelangt.

Tab. 2.4: Überblick über Ciprofloxacin- und Enrofloxacin-Konzentrationen in verschiedenen Oberflächengewässern (*k.A.: keine Angabe darüber welches Oberflächengewässer untersucht wurde).

Oberflächengewässer	Wirkstoff	Konzentration	Quelle
k.A. *, Holland	Ciprofloxacin	< 10 ng/L	(Pozo <i>et al.</i> 2006)
k.A. *, Spanien			
Montego, Portugal	Ciprofloxacin	80 - 119 ng/L	(Pena <i>et al.</i> 2007)
	Enrofloxacin	67 - 103 ng/L	
Glatt, Schweiz	Ciprofloxacin	5 - 18 ng/L	(Golet <i>et al.</i> 2002a)
k.A. *, Deutschland	Ciprofloxacin	9 ng/L	(Christian <i>et al.</i> 2003)
Po, Italien	Ciprofloxacin	26 ng/L	(Calamari <i>et al.</i> 2003)
Lambro, Italien		14 ng/L	
Luhtajoki, Finnland	Ciprofloxacin	25 ng/L	(Vieno <i>et al.</i> 2006)
Sava, Kroatien	Ciprofloxacin	< 13 ng/L	(Senta <i>et al.</i> 2008)
Danube, Kroatien			
Drava, Kroatien			
Detroit, USA	Ciprofloxacin	< 19 ng/L	(Nakata <i>et al.</i> 2005)
Lansing, USA			
Petoskey, USA			
Lake Ontario, Kanada			
Po, Italien	Enrofloxacin	37 ng/L	(Sturini <i>et al.</i> 2009)
Ticino, Italien		27 ng/L	
Pearl, China	Ciprofloxacin	459 ng/L	(Peng <i>et al.</i> 2008)

Bisher konnten Fluorchinolone nicht in Grund- oder Trinkwasser nachgewiesen werden (Vázquez *et al.* 2012). Jedoch sind – wie zu erwarten – die nachgewiesenen Fluorchinolone-Konzentrationen in Abwässern im Vergleich zu Oberflächengewässern deutlich erhöht. In der Kläranlage können je nach Aufarbeitungsmethode bis zu 80 % der Fluorchinolone eliminiert werden. Der entscheidende Mechanismus scheint dabei die Adsorption an Klärschlamm zu sein, wie die relativ hohen Konzentration (bis zu 230 µg/kg Ciprofloxacin) implizieren (Golet *et al.* 2002b). Die detektierten Ciprofloxacin-Konzentrationen in Abwasser schwanken zwischen 149 ng/L und 1343 ng/L (Golet *et al.* 2002a; Senta *et al.* 2008; Shi *et al.* 2009). Im Vergleich dazu sind die in Krankenhausabwässern gefundenen Ciprofloxacin-Konzentrationen in Schweden (4 - 101 µg/L) und Deutschland (1 - 125 µg/L) nahezu um den Faktor 1000 höher. Jedoch erreichen diese Abwässer in verdünnter Form die Kläranlage.

Pflanzen

Es besteht die Möglichkeit, dass im Boden enthaltene Antibiotika über die Wurzeln von Pflanzen aufgenommen werden können. In einer Stellungnahme des BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) wurde der aktuelle Kenntnisstand zusammengefasst. Demnach wurden in 11 von 20 Arbeiten vier Fluorchinolone – darunter Enrofloxacin und Ciprofloxacin - in Pflanzen nachgewiesen. Sowohl Enrofloxacin als auch Ciprofloxacin wurden in Weißkohl (Grote *et al.* 2009), Porree (Grote *et al.* 2009), Gerste (Lillenberg 2010), Salat (Boxall *et al.* 2006; Lillenberg 2010; Migliore *et al.* 2003), Gurke (Lillenberg 2010; Migliore *et al.* 2003), Bohnen (Migliore *et al.* 2003), Karotten (Boxall *et al.* 2006) und Radieschen (Migliore *et al.* 2003), die mit antibiotikahaltigen Substraten gezüchtet wurden, nachgewiesen. Studien belegen zudem, dass Pflanzen Enrofloxacin – analog zum Mensch und verschiedenen Tierspezies – zu Ciprofloxacin metabolisieren (Grote *et al.* 2009; Migliore *et al.* 2003). Die Metabolisierung ist pflanzenspezifisch: für Gurke, Salat und Bohne beträgt sie ungefähr 30 % wohingegen sie für Weißkohl, Porree und Radieschen kleiner als 1 % ist (Grote *et al.* 2009; Migliore *et al.* 2003).

Wenige Studien, die sich mit den phytotoxischen Auswirkungen der Antibiotikaaufnahme beschäftigen, sind bekannt. Jedoch belegen diese Studien, dass das Pflanzenwachstum unter Umständen beeinflusst wird, was sich in verringerter Wurzellänge, Blattlänge, Blattanzahl sowie durch das Ausbleichen von Blättern widerspiegelt (Boxall *et al.* 2006; Grote *et al.* 2009; Migliore *et al.* 2003). Des Weiteren wird vermutet, dass Antibiotika innerhalb der Wachstumsperiode in der Pflanze akkumulieren, da die Pflanze nicht in der Lage ist, diese Wirkstoffe abzubauen. Dadurch können phytotoxische Effekte verstärkt werden (Lillenberg

2010). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass diese Studien größtenteils unter worst-case-Bedingungen durchgeführt worden sind (u. a. hohe Dosierungen, Applikation der Wirkstoffe in Hydrokultur).

Problematisch ist zudem, dass die Auswirkungen für den Menschen bei der Aufnahme antibiotikahaltiger Pflanzen nicht abgeschätzt werden können. Möglich wären allergische oder toxische Reaktionen, die durch die Aufnahme ausgelöst werden (Kumar *et al.* 2005). Laut ADI-Wert (acceptable daily intake) wäre eine tägliche, lebenslange Aufnahmemenge von 6,2 µg/kg Körpergewicht (KG) Enrofloxacin ohne bedenkliches Gesundheitsrisiko möglich (Boxall *et al.* 2006). Ausgehend von einer Düngung des Bodens mit Faeces von Tieren, die über einen Zeitraum von 5 Tagen mit 5 mg/kg Enrofloxacin behandelt wurden, berechneten Boxall *et al.* (2006) die zu erwartende Enrofloxacin-Konzentration in Salat (< 1,3 µg/kg) und Karotten (3,2 µg/kg). Laut Boxall *et al.* (2006) verzehrt ein Erwachsener durchschnittlich 0,85 kg pflanzliche Lebensmittel (wovon 0,512 kg über der Erde wachsen und 0,333 kg unter der Erde) pro Tag. Ausgehend davon ergibt sich für eine Person mit 60 kg Körpergewicht eine maximale Ausschöpfung des ADI-Wertes für Enrofloxacin von 0,7 %. Daher scheint für den Menschen kein toxikologisches Risiko beim Verzehr der von Boxall *et al.* (2006) berechneten Enrofloxacin-Konzentrationen in Karotten zu bestehen. Jedoch ist die Gefahr der Resistenzentstehung durch die Aufnahme subtherapeutischer Antibiotikakonzentrationen nicht ausreichend untersucht.

2.4 Antibiotikaresistenzen

2.4.1 Allgemeines

Unter einer Resistenz versteht man den natürlichen Schutzmechanismus eines Organismus gegenüber äußeren Einflüssen. Antibiotikaresistenzen beschreiben somit die Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen gegenüber bestimmten Antibiotika. Dies kann im Extremfall zur Folge haben, dass Antibiotika z. B. gegenüber humanpathogenen resistenten Keimen unwirksam werden und keine alternativen Therapiemöglichkeiten mehr zur Verfügung stehen (Wegener *et al.* 1998).

Resistente Bakterien wurden in verschiedenen Tierarten, der Umwelt, Lebensmitteln und im Menschen nachgewiesen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass sie zwischen und innerhalb dieser Gruppen übertragen werden. Durch das Auftreten resistenter Bakterien werden die therapeutischen Möglichkeiten eingeschränkt und es muss gegebenenfalls auf sogenannte

Reserveantibiotika – zu denen auch Fluorchinolone gezählt werden – zurückgegriffen werden, da andere Antibiotika gegen diese Erreger unwirksam geworden sind. Der Anteil an eingesetzten Reserveantibiotika (Abb. 2.3) hat sich in den letzten Jahren mehr als verdreifacht (Schröder 2010). Langfristig führt dies dazu, dass sich auch Resistenten gegen bislang noch wirksame Antibiotika entwickeln können.

Des Weiteren stehen subtherapeutische Antibiotikadosen im Verdacht, das Auftreten von Antibiotikaresistenzen zu fördern, wodurch die Bildung von Einfach-, Kreuz- und im schlimmsten Fall Mehrfachresistenzen induziert werden kann (Al-Ahmad *et al.* 1999; Wegener *et al.* 1998).

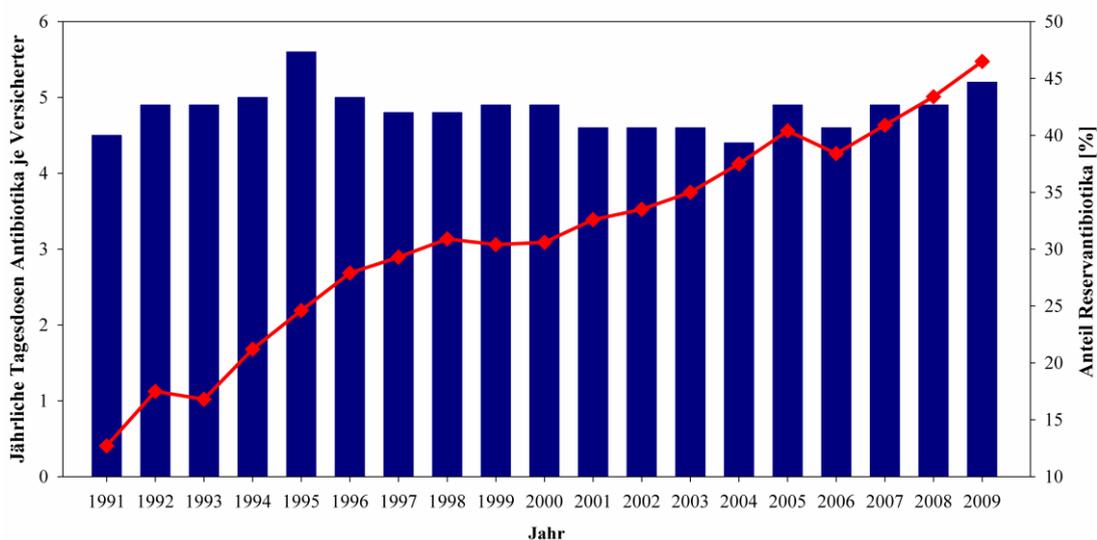


Abb. 2.3: Durchschnittliche jährliche Antibiotikagesdosen pro Versichertem zwischen 1991 und 2009 sowie der Anteil an Reserveantibiotika in der Humanmedizin in Deutschland (Schröder 2010).

In Deutschland sind in der Humanmedizin die Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen (insbesondere Ciprofloxacin) in den letzten Jahren auf Grund des erhöhten Fluorchinolonverbrauchs stark angestiegen. Dafür können zwei wichtige bakterielle Infektionserreger (*Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*) als Indikator (Abb. 2.4) verwendet werden (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2009). Im Fall von *E. coli* sind die Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin zwischen 1990 und 2010 um einen Faktor von ungefähr 160 angestiegen. Im Gegensatz zu *S. aureus* scheint die Tendenz weiter steigend zu sein. Die gegenüber Ciprofloxacin resistenten Stämme von *S. aureus* haben sich im Zeitraum von 1990 bis 2007 mehr als vervierfacht, zeigen jedoch bis 2010 eine sinkende Tendenz.

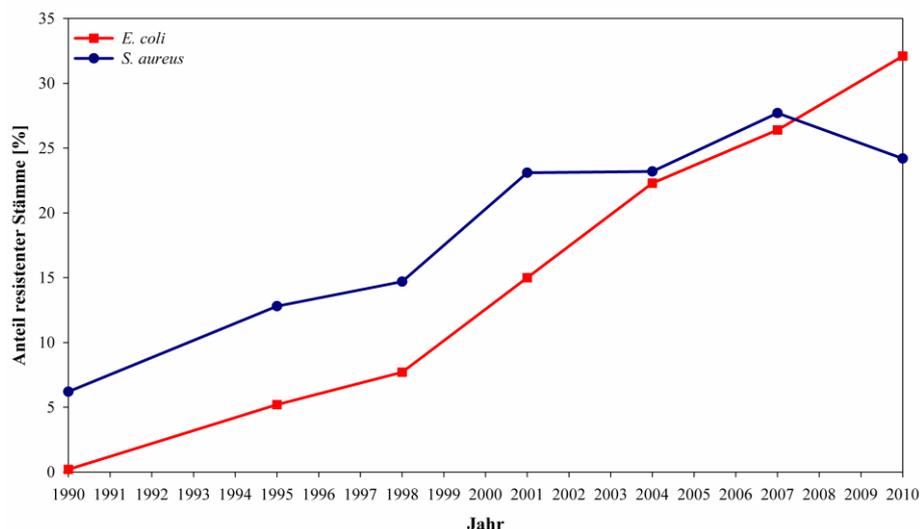


Abb. 2.4: Resistenzentwicklung zwischen 1990 und 2010 von *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* gegenüber Ciprofloxacin in der Humanmedizin in Deutschland (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2009).

Analog zur Humanmedizin steigen die Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen auch in der Veterinärmedizin an (Abb. 2.5). Seit der Zulassung der Fluorchinolone Ende der 1980er Jahre haben sich die Resistenzen von Salmonellen gegenüber Fluorchinolonen in Geflügel bis 1994 fast verzehnfacht (Hensel und Helmuth 2005). Jedoch scheinen die Resistenzen seit dem auf einem konstanten bzw. sinkenden Level zu bleiben. Vergleicht man den Anteil Fluorchinolon-resistenter Isolate verschiedener Spezies, so weisen Geflügelproben mit Abstand den größten Anteil auf, gefolgt von Rinder- und Schweineproben (Käsbohrer 2012).

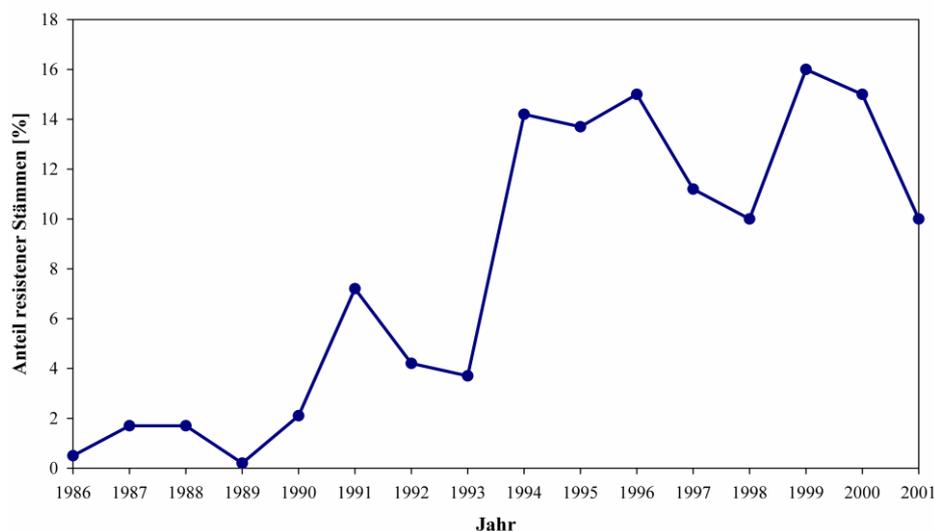


Abb. 2.5: Resistenzentwicklung zwischen 1986 und 2001 von Salmonellen gegenüber Fluorchinolonen in Geflügel und Geflügelfleisch in Deutschland (Hensel und Helmuth 2005).

2.4.1 Resistenzmechanismen

Zwei Mechanismen spielen bei der Entstehung von Chinolonresistenzen eine wesentliche Rolle: die Modifikation der Zielstruktur und die Minimierung der intrazellulären Wirkstoffkonzentration (Wiedemann und Heisig 2001). Durch die Mutation der Zielstruktur - im Fall der Fluorchinolone die beiden Topoisomerasen II (Gyrase) und IV – nimmt die Affinität des Antibiotikums für diese ab. Dies hat zur Folge, dass die DNA-Replikation trotz therapeutischer Antibiotikakonzentrationen andauert. Zusätzlich sind Chinolonresistenzen durch die Mutation der Gene, die Gyrase und Topoisomerase IV codieren, möglich. Durch die Reduktion der intrazellulären Wirkstoffkonzentration können ebenfalls Antibiotikaresistenzen induziert werden, da die daraus resultierenden subtherapeutischen Wirkstoffspiegel einen Risikofaktor darstellen (Blondeau 2004; Scholar 2003). Dabei wird die Membranpermeabilität durch die Herabregulation von Porinen (Transmembranproteine) vermindert, was eine verschlechterte Diffusion der Antibiotika durch die Membran zur Folge hat. Zusätzlich kann die intrazelluläre Antibiotikakonzentration durch die Regulation von intrinsischen MDR (multidrug-resistant)-Effluxpumpen herabgesetzt werden (Martinez *et al.* 2006).

Die Mutation der Zielstruktur ist im Fall der Fluorchinolone ein sehr spezifischer Resistenzmechanismus, wodurch Resistenzen gegenüber anderen Antibiotikaklassen, die sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin eingesetzt werden, unwahrscheinlich sind. Im Gegensatz dazu sind Resistenzen auf Grund minimierter intrazellulärer Wirkstoffkonzentrationen deutlich weniger spezifisch, was die Bildung von Kreuzresistenzen gegenüber mehreren Antibiotikaklassen zur Folge haben kann (Martinez *et al.* 2006).

2.5 Festphasenextraktion (SPE)

In der Bioanalytik ist die Festphasenextraktion die bevorzugte Methode zur Probenvorbereitung von flüssigen Proben sowie zur Aufreinigung von flüssigen Probenextrakten. Im Vergleich zu anderen Probenvorbereitungsmethoden wie Flüssig-Flüssig-Extraktion oder Proteinpräzipitation kombiniert die Festphasenextraktion zwei entscheidende Vorteile: die selektive Minimierung von störenden Matrixbestandteilen sowie die Anreicherung der Analyten.

Die Festphasenextraktion umfasst fünf Schritte: Konditionierung, Äquilibrierung, Probenaufgabe, Waschen und Elution wobei die letzten beiden Schritte die größte Signifikanz besitzen. Ein geeigneter Waschschritt ist erforderlich, um störende Matrixkomponenten selek-

tiv – möglichst ohne Analytverlust - zu entfernen und hierdurch Matrixeffekte zu minimieren. Um eine gute Analytwiederfindung zu erzielen, ist die Wahl des Elutionsmittels von entscheidender Bedeutung. Als Elutionsmittel werden meist polare organische Lösungsmittel wie z. B. Methanol oder Acetonitril unter Zusatz einer Säure oder Base verwendet.

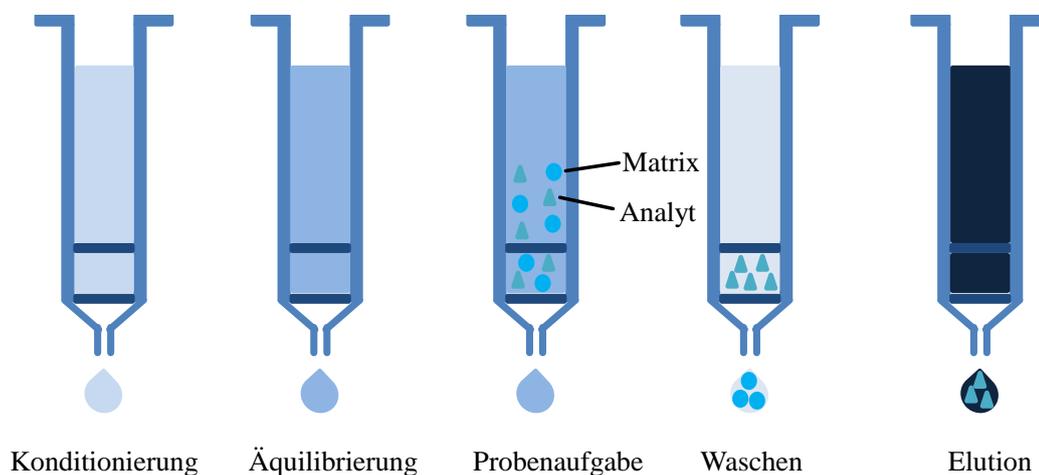


Abb. 2.6: Allgemeines Ablaufschema einer Festphasenextraktion.

SPE-Materialien basieren entweder auf Polymeren, Kieselgel oder graphitisiertem Kohlenstoff. Dabei hängt die Wahl des verwendeten Materials vor allem von der benötigten Bindungskapazität, der Robustheit sowie der Polarität der Analyten ab. Abhängig vom verwendeten SPE-Material sind verschiedene Wechselwirkungsmechanismen möglich: Reversed-Phase (Umkehrphase), Mixed-Mode, Ionenaustausch und Normal-Phase.

Umkehrphasen auf Polymerbasis setzen sich meist aus einem Co-Polymer wie z. B. Divinylbenzol und N-Vinylpyrrolidon (Abb. 2.7) oder Divinylbenzol und Polystyrol, welche an der Oberfläche auch hydroxyliert sein können, um die Hydrophilie zu erhöhen, zusammen. Folgende Interaktionen zwischen Analyt und Sorbent sind dabei möglich: π - π -Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol und hydrophobe Wechselwirkungen (Phenomenex 2010).

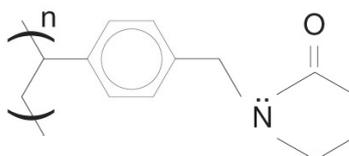


Abb. 2.7: Strukturformel eines Umkehrphasenmaterials auf Polymerbasis (Phenomenex 2010).

Mixed-Mode Materialien bestehen wie Umkehrphasen aus einem Co-Polymer, welches zusätzlich mit ionisierbaren Gruppen substituiert ist. Daher werden die oben genannten Wechselwirkungsmechanismen durch die Integration funktioneller Säure- oder Basengruppen zusätzlich auf ionische Wechselwirkungen erweitert. Mixed-Mode-Anionenaustauscher können z. B. quartäre Ammoniumgruppen (Abb. 2.8) oder Harnstoffgruppen enthalten. Im Gegensatz dazu sind Mixed-Mode-Kationenaustauscher z. B. mit Sulfonatgruppen (Abb. 2.8) substituiert.

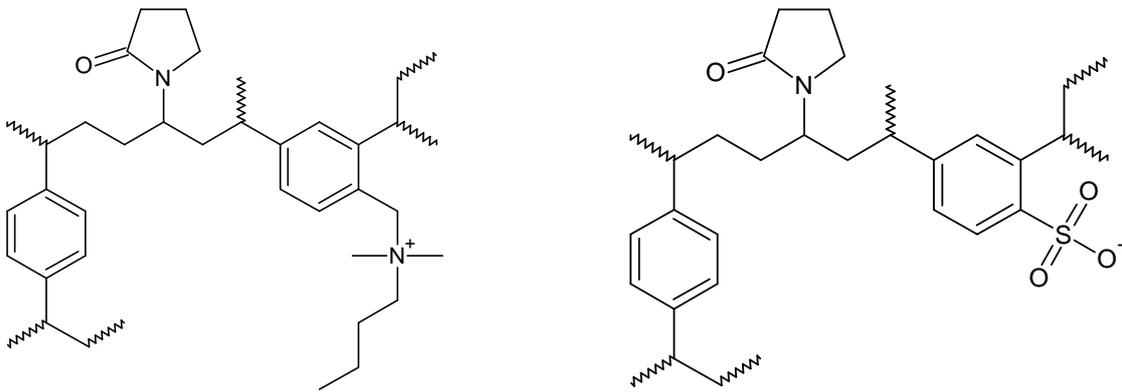


Abb. 2.8: Strukturformel eines Mixed-Mode-Anionenaustauschers (links) und eines Mixed-Mode-Kationenaustauschers (rechts) (Waters 2011).

2.6 Phospholipide

Phospholipide sind beteiligt an vielen biologischen Transportprozessen und zudem wesentliche Bestandteile der Doppellipidschicht von Zellmembranen. Daher sind sie in vielen biologischen Flüssigkeiten wie auch in Plasma vorhanden. Phospholipide weisen amphiphile Eigenschaften auf, da sie aus einer polaren, hydrophilen Kopfgruppe und zwei lipophilen Kohlenwasserstoffketten aufgebaut sind.

Strukturell lassen sich Phospholipide in zwei Gruppen einteilen: Glycerophospholipide (Abb. 2.9) und Sphingomyeline (Abb. 2.10). Das Grundgerüst der Glycerophospholipide bildet Glycerin, das mit drei unterschiedlichen Substituenten verknüpft ist. Substituenten an C-1 können ein Alkylether (plasmanyl), Vinylether (plasmalogen) oder Fettsäureester (phosphatidyl) sein. Das GlycerinGrundgerüst ist an C-2 mit einem langketten Fettsäureester verknüpft. Eine Ausnahme stellen die Lyso Phospholipide dar, bei denen die Hydroxyl-Gruppe des Glycerins nicht verestert ist. Am C-3 befindet sich ein Phosphorsäureester, der mit einer polaren Kopfgruppe verknüpft ist. Anhand der polaren Kopfgruppen werden die Phospholipide in verschiedenen Klassen unterteilt. Mögliche Substituenten können Cholin

(PC), Ethanolamin (PE), Serin (PS), Inositol (PI), Glycerin (PG) und Phosphatidsäure (PA) sein.

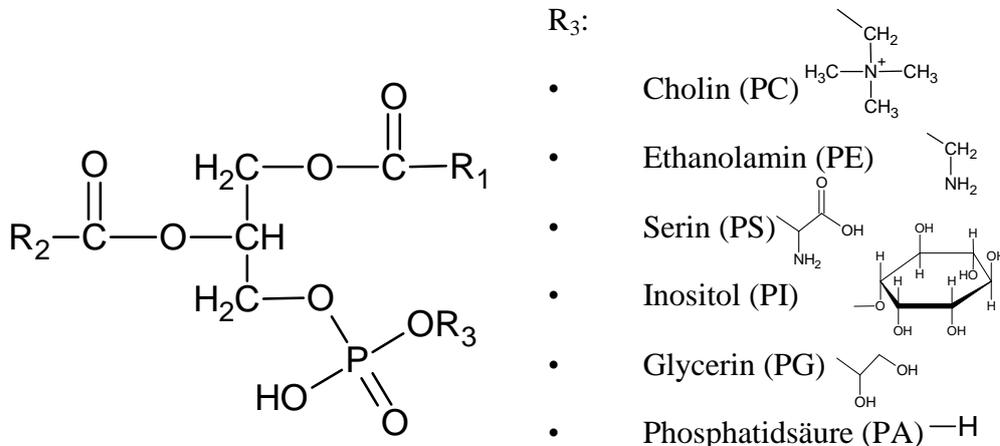


Abb. 2.9: Grundstruktur der Glycerophospholipide und mögliche funktionelle Kopfgruppen.

Das Grundgerüst der Sphingomyeline besteht aus Sphingosin, das an C-2 mit einem Fettsäureamid verknüpft ist. Die Phosphatgruppe an C-3 ist mit Cholin als polarer Gruppe verestert.

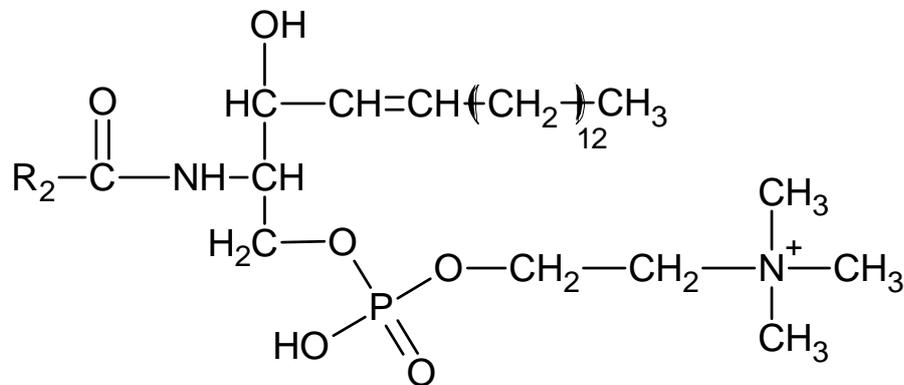


Abb. 2.10: Grundstruktur der Sphingomyeline.

Den größten Anteil von Phospholipiden in Hühnerplasma machen PC (70 %) gefolgt von PE, Lyso PC, SM und PI aus (Christie und Moore 1972). Im Organismus von Menschen als auch Tieren spielen sie eine zentrale Rolle in der Physiologie; d. h. Phospholipide sind beteiligt am Zellwachstum, der Zellwanderung, Wundheilung, Signaltransduktion, dem Überleben der Zelle sowie an morphologischen Veränderungen (Moolenaar *et al.* 2004; Sigal *et al.* 2005). Des Weiteren sind Phospholipide und ihr Metabolismus wichtige Biomarker zur

Diagnose und Prognostik von Krankheiten wie z. B. Nierenversagen (Sasagawa *et al.* 1998), Gebärmutterhalskrebs (Mills und Moolenaar 2003), Eierstockkrebs (Sutphen *et al.* 2004), Alzheimer (Walter *et al.* 2004) sowie diabetischer Nephropathie (Pang *et al.* 2008).

2.7 HPLC-MS/MS

2.7.1 Allgemeines

Auf Grund ihrer Selektivität und Sensitivität hat sich die HPLC-MS/MS (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung) im vergangenen Jahrzehnt zur Methode der Wahl u. a. für die Analytik von Pharmazeutika in biologischen Proben entwickelt. Das HPLC-MS/MS-System umfasst vier wesentliche Bestandteile: den Hochleistungsflüssigkeitschromatographen, das Interface, den Massenanalysator und den Detektor.

Die HPLC wird seit mehreren Jahrzehnten auch zur Analytik von Veterinärantibiotika verwendet, wobei hauptsächlich Trennmaterialien auf Basis von Umkehrphasen eingesetzt werden. Zu beachten ist, dass bei der MS-Kopplung dem wässrigen Eluenten ausschließlich flüchtige Puffer, wie z. B. Ammoniumacetat, zugesetzt werden dürfen. Jedoch sollte, wenn möglich, der Einsatz von Puffern vermieden werden, da u. U. störende Addukte gebildet werden können. In den letzten Jahren ist der Bedarf an schnelleren Analysen, die einen hohen Probendurchsatz ermöglichen vor allem in folgenden Bereichen gestiegen: Pharmazeutische Industrie, Toxikologie, Forensik, klinische Chemie, Doping- sowie Umweltanalysen (Guillarme *et al.* 2010). Hierzu sind jedoch erhöhte Flussraten, Temperaturen oder der Einsatz von kürzeren chromatographischen Trennsäulen mit geringeren Partikeldurchmessern ($< 2 \mu\text{m}$) notwendig. Erhöhte Drücke, für die konventionelle HPLC-Systeme nicht ausgelegt sind, sind die Folge. Daher mussten neue Systeme - die sogenannten Ultra Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Systeme (UHPLC) - entwickelt werden, die Drücken von bis zu 1000 bar standhalten (Guillarme *et al.* 2010; Le Bizec *et al.* 2009).

Der HPLC-Fluss muss, bevor er in das Massenspektrometer geleitet werden kann, zunächst in die Gasphase überführt werden, da ansonsten das anliegende Hochvakuum zusammenbrechen würde. Hierfür werden vorwiegend folgende Interfaces eingesetzt: Elektronenspray-Ionisation (ESI siehe Abb. 2.11), Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) und Photo-Ionisation bei Atmosphärendruck (APPI). Am weitesten verbreitet ist die ESI auf Grund der nahezu universellen Anwendbarkeit. Bei der ESI liegt zwischen einer Metallkapillare, durch

die der HPLC-Fluss geleitet wird, und einer Blende eine Spannung zwischen 2 - 5 kV an. Der HPLC-Fluss wird mit Hilfe eines Gases (i. d. R. Stickstoff) versprüht, wodurch feine geladene Tröpfchen entstehen. Durch den Einsatz eines temperierten Gases (Stickstoff) nimmt der Tröpfchendurchmesser ab und somit die Oberflächenladung zu. Dies führt zur Coulomb-Explosion, wodurch die Analytionen freigesetzt und Richtung Massenanalysator transferiert werden (Ardrey 2004).

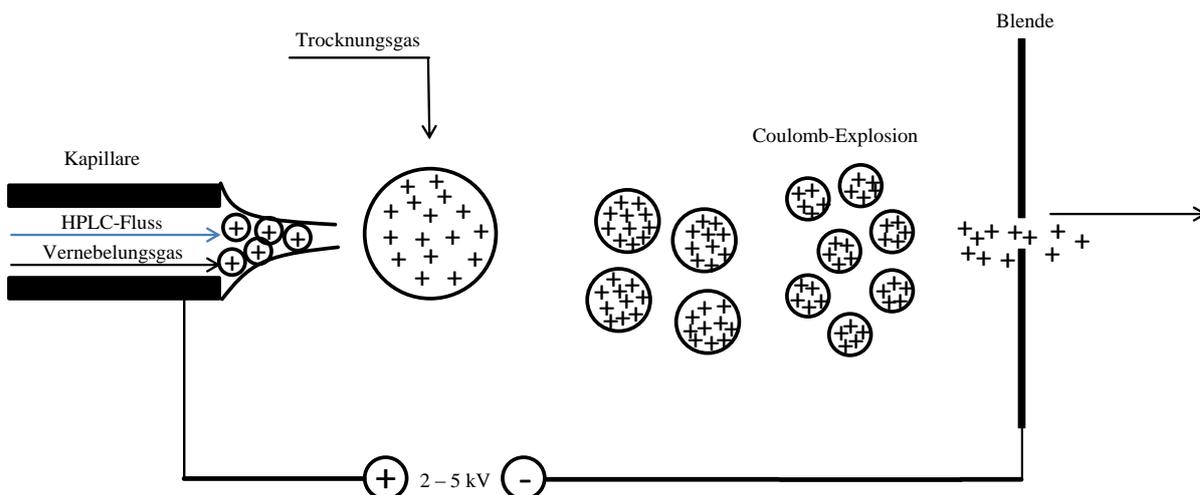


Abb. 2.11: Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisation im Positivmodus.

Auf Grund der verkürzten Analysezeit werden zur Detektion vor allem Massenspektrometer mit schnellen Scanraten benötigt (Guillarme *et al.* 2010). Unter den zur Verfügung stehenden Massenanalysatoren wird der Triple-Quadrupol - wie auch in dieser Arbeit - am häufigsten zur Identifizierung und Quantifizierung von Veterinärantibiotika eingesetzt.

Mit Hilfe von Ionenfallen können Full Scan Massenspektren aufgenommen und MS^n -Experimente, die zusätzlich eine Strukturaufklärung ermöglichen, durchgeführt werden. Durch die Verwendung von Triple-Quadrupol- oder Ionenfallen-Massenspektrometern kann im Vergleich zu Single-Massenspektrometern durch das spezifische Erfassen von Produkten das Signal zu Rausch Verhältnis deutlich erhöht und die Störungen durch Matrixkomponenten im Probenextrakt reduziert werden. Dies hat eine Steigerung der Sensitivität sowie Selektivität zur Folge (Le Bizec *et al.* 2009).

2.7.2 Detektionsmethoden mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie

Das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer besteht, wie der Name bereits sagt, aus drei Quadrupolen. Quadrupol 1 (Q1) sowie Quadrupol 3 (Q3) dienen hierbei zur Massenselektion hingegen wird Quadrupol 2 (Q2) als Kollisionszelle zur (möglichen) Fragmentierung verwendet. Je nach Einstellung der Quadrupole ergeben sich verschiedene Detektionsmethoden.

Selected Reaction Monitoring

Der Selected Reaction Monitoring Modus (Abb. 2.12) wird hauptsächlich für die Targetanalyse verwendet. Hierzu werden im Q1 spezifische Vorläuferionen selektiert, die in der Kollisionszelle (Q2) durch den Einsatz eines Inertgases (meist Stickstoff) fragmentiert werden. Anschließend werden im Q3 spezifische Produktionen selektiert und zur Identifizierung sowie Quantifizierung herangezogen (Ardrey 2004).

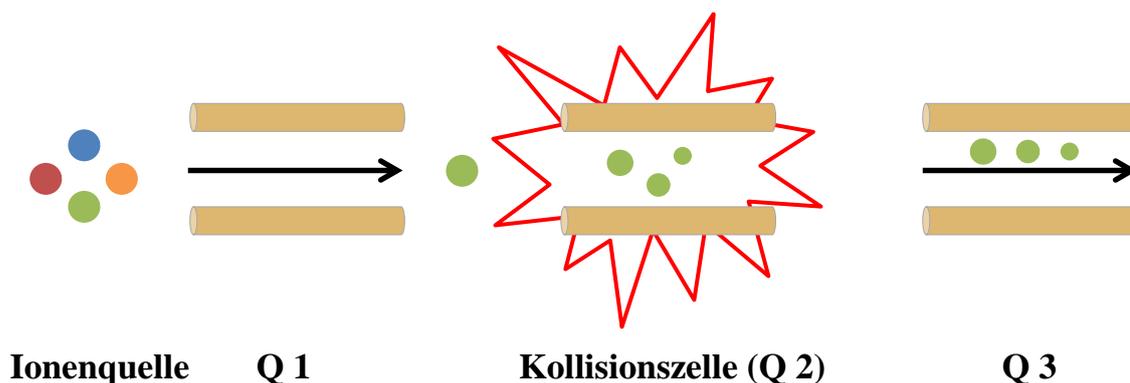


Abb. 2.12: Schematische Darstellung des Selected Reaction Monitorings als MS/MS Detektionsmethode.

Vorläuferionen Scan

Beim Vorläuferionen Scan (Abb. 2.13) werden im Q1 Analytionen eines ausgewählten Massenbereiches selektiert und in der Kollisionszelle fragmentiert. Anschließend werden im Q3 Produktionen einer ausgewählten Masse selektiert, so dass nur Substanzen erfasst werden, die im Q1 selektiert werden und das ausgewählte Produktion generieren. Dadurch können in einer komplexen Probe z. B. Substanzklassen auf Grund der Bildung eines für sie spezifischen Produktions detektiert werden (Ardrey 2004).

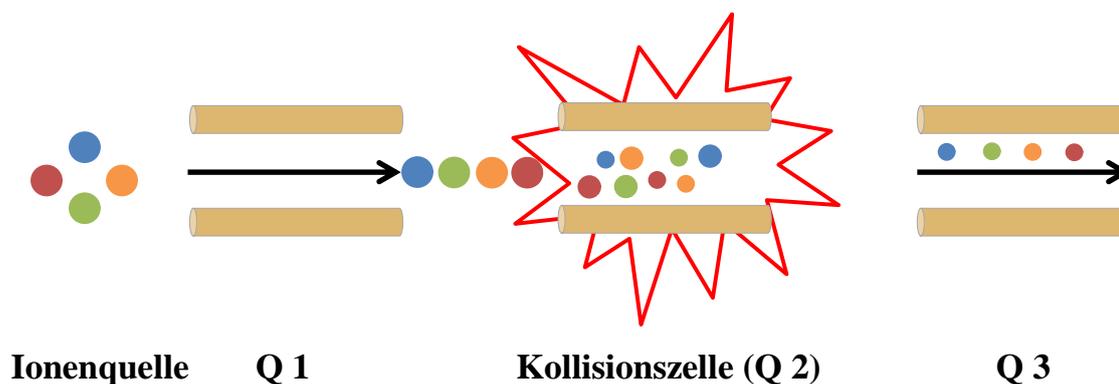


Abb. 2.13: Schematische Darstellung des Vorläuferionen Scans als MS/MS Detektionsmethode.

Neutralverlust Scan

Bei der Methode des Neutralverlust Scans (Abb. 2.14) werden nur Substanzen detektiert, die einen spezifischen Neutralverlust aufweisen. Analog zum Vorläuferionen Scan werden im Q1 Ionen eines definierten Massenbereiches selektiert und in der Kollisionszelle fragmentiert. Jedoch wird im Q3 synchron zum Q1 ein definierter Massenbereich selektiert, der um den Neutralverlust reduziert ist. Daher werden nur Produktionen detektiert deren Vorläuferionen durch die Fragmentierung einen spezifischen Neutralverlust zeigen (Ardrey 2004).

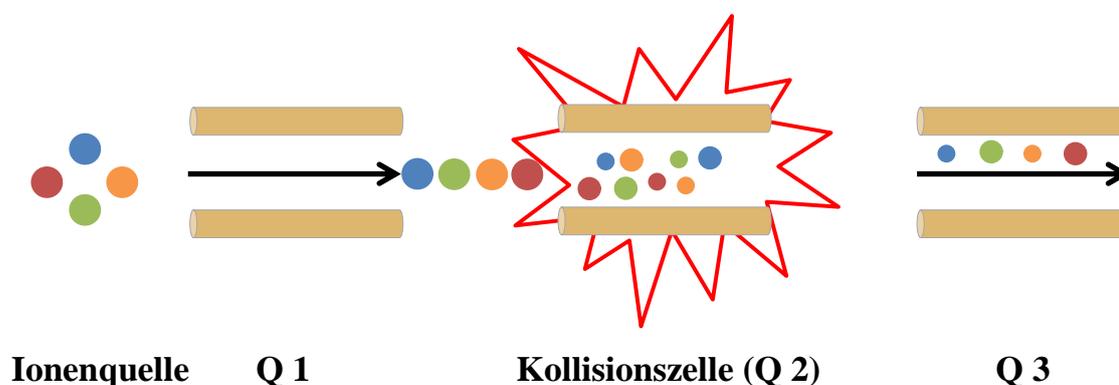


Abb. 2.14: Schematische Darstellung des Neutralverlust Scans als MS/MS Detektionsmethode.

Stoßinduzierte Dissoziation in der Ionenquelle

Wie der Name bereits impliziert, findet bei der stoßinduzierten Dissoziation die Fragmentierung in der Ionenquelle statt (Abb. 2.15), so dass keine weitere Fragmentierung erfolgt und die Kollisionsenergie auf ein Minimum reduziert wird. Im Vergleich zu den anderen MS/MS-Methoden wird bei dieser Methode die Kapillarspannung deutlich erhöht. Die gebildeten

Produktionen werden anschließend in Q1 und Q3 selektiert, welche auf die gleiche, spezifische Produktionenmasse eingestellt sind (Little *et al.* 2006b).

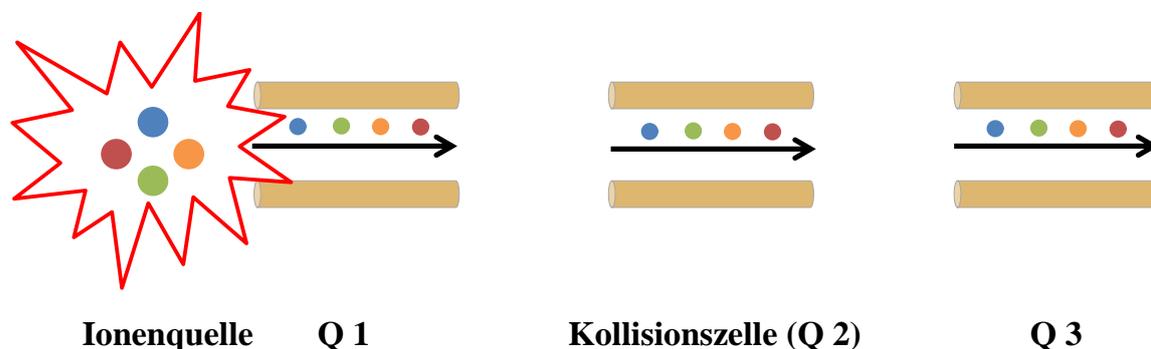


Abb. 2.15: Schematische Darstellung der stoßinduzierten Dissoziation in der Ionenquelle als MS/MS Detektionsmethode.

2.8 Matrixeffekte

Matrixeffekte sind ein häufiges Problem in der LC-MS/MS-Analytik von biologischen Proben. Unter Matrixeffekten versteht man die Beeinflussung des Messsignals durch co-eluierende Matrixkomponenten, die sowohl endogener als auch exogener Natur sein können. Exogene Matrixkomponenten gelangen z. B. während der Probenvorbereitung in das Probenextrakt im Gegensatz zu endogenen Matrixkomponenten, die in der Probe enthalten sind. Zu den endogenen Verbindungen, die Matrixeffekte verursachen können, zählen u. a. Salze, Phenole, Kohlenhydrate, Amine, Lipide, Peptide oder Harnstoff (Gosetti *et al.* 2010; Le Bizec *et al.* 2009). Exogene Substanzen können u. a. Weichmacher, organische Säuren, Polymerrückstände oder Stoffe, die von der SPE sowie HPLC-Säule abgelöst werden, sein (Le Bizec *et al.* 2009).

Man unterscheidet zwei Typen von Matrixeffekten: Signalverstärkung und Signalunterdrückung. Bisher ist ihr Entstehungsmechanismus nicht vollständig aufgeklärt. In der Literatur sind hierzu verschiedene Erklärungsansätze zu finden:

1. Die Abnahme der Verdampfungseffizienz durch die Anwesenheit von co-eluierenden Matrixkomponenten. Dadurch wird die Viskosität sowie Oberflächenspannung der Tröpfchen erhöht und gleichzeitig die Fähigkeit der Analyten die Gasphase zu erreichen vermindert.
2. Die Fällung des Analyten mit z. B. nicht-flüchtigen Makromolekülen kann ebenso den Transfer in die Gasphase einschränken.

3. Die Konkurrenz zwischen Analyt und co-eluierenden Matrixbestandteilen in Bezug auf die maximale Ionisierung.
4. Reduktion der Analytstabilität in der Gasphase durch Neutralisationsprozesse (Annesley 2003).

Durch Matrixeffekte werden analytische Methodenparameter wie z. B. Linearität, Genauigkeit, Präzision sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze beeinflusst, wenn keine entsprechende Kompensation der Matrixeffekte durch die Verwendung eines internen Standards, einer In-Matrix-Kalibrierung oder durch Standardaddition erfolgt (Gosetti *et al.* 2010; Le Bizec *et al.* 2009). Des Weiteren können Matrixeffekte zur Basislinienerhöhung oder zu Retentionszeitenverschiebungen beitragen. Daher sind die Evaluierung und Eliminierung von Matrixeffekten wichtige Bestandteile der Methodenentwicklung.

Prinzipiell können Matrixeffekte quantitativ als auch qualitativ erfasst werden. Bei der quantitativen Bestimmung wird die Signalintensität einer nach der Extraktion dotierten Leermatrixprobe mit der eines Analytstandards in mobiler Phase verglichen. Hieraus kann ermittelt werden, ob das Signal verstärkt oder unterdrückt wird (Matuszewski *et al.* 2003).

Die Post-column-Infusion wird hauptsächlich zur Ermittlung des qualitativen Matrixeffektes eingesetzt. Jedoch ist es mit dieser Methode auch möglich, Matrixeffekte halbquantitativ zu bestimmen. Bei der Post-column-Infusion wird ein Analytstandard mit einem konstanten Fluss kontinuierlich in das Massenspektrometer infundiert während simultan ein Lösungsmittelblank oder ein Leermatrixextrakt mittels HPLC injiziert wird. Mit Hilfe eines Splits wird der HPLC-Fluss ebenfalls in das Massenspektrometer infundiert. Die Post-column-Infusion ermöglicht somit die Identifizierung von Bereichen innerhalb des Chromatogramms, die von Matrixeffekten beeinflusst werden (Bonfiglio *et al.* 1999).

Um Matrixeffekte in der LC-MS/MS Analytik zu minimieren, gibt es vier wesentliche Strategien: Modifikation der massenspektrometrischen sowie chromatographischen Bedingungen, eine adäquate Probenvorbereitung und die Wahl der richtigen Kalibrierung. Massenspektrometrische Bedingungen, die einen Einfluss auf Matrixeffekte haben können sind vor allem die Wahl der Polarität sowie die eingesetzte Ionenquelle. Vergleicht man die beiden Ionisierungstechniken ESI (Elektrospray-Ionisation) und APCI (Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck), so ist die APCI weniger anfällig (bis zu 75 % weniger) gegenüber Matrixeffekten (Ismail *et al.* 2008). Dies wird vor allem darauf zurückgeführt, dass die Ionisierung in der Gasphase stattfindet. Bei der chromatographischen Trennung können

Matrixeffekte minimiert werden, indem die Elutionsbereiche von Analyten und Matrixkomponenten voneinander getrennt sind. Des Weiteren sollte die Methode auf mögliche Verschleppungen über mehrere HPLC-Messungen hinweg durch Matrixkomponenten überprüft werden, da so unspezifische Matrixeffekte zu unterschiedlichen Retentionszeiten auftreten können. Jedoch ist der wichtigste Faktor, um Matrixeffekte zu minimieren, eine geeignete Probenvorbereitung mit der es möglich ist, eine Vielzahl von störenden Matrixkomponenten selektiv zu entfernen.

3. Methodenentwicklung Hühnerplasma

3.1 Allgemeines Vorgehen

Zur Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerplasma wurde als Probenvorbereitungsmethode die Festphasenextraktion gewählt. Hierzu wurden zunächst vier Polymer-RP Säulen (Oasis HLB, Strata X, SDB und Isolute ENV+), eine Kieselgel-RP Säule (HyperSep C18) sowie fünf Mixed-Mode Säulen (HR-XA, Easy, HyperSep Retain PEP, HR-XC und HyperSep Retain CX) bezüglich der Analytwiederfindung, Extraktreinheit und ökonomischen Aspekten miteinander verglichen.

Für Wiederfindungsstudien wurde ein Aliquot von 500 µL Plasma mit einem definierten Volumen eines Mischstandards dotiert. Die resultierende Fluorchinolonzkonzentration der dotierten Plasmaproben betrug 400 µg/L. Die dotierten Plasmaproben wurden homogenisiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Gleichgewichtseinstellung zu erreichen. Anschließend wurde die Plasmaprobe mit 2,5 mL Reinstwasser verdünnt. Leermatrixproben wurden hergestellt, indem 500 µL Plasma mit 2,5 mL Reinstwasser verdünnt wurde. Dotierte Plasmaproben sowie Leermatrixproben wurden mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet.

Es wurden verschiedene SPE Säulen bezüglich der Fluorchinolonzwiederfindung getestet. Um dabei vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde zunächst ein standardisiertes Extraktionsprotokoll verwendet. Dies umfasste einen Konditionierungsschritt bestehend aus einem Säulenvolumen Methanol. Anschließend wurde zur Äquilibrierung ein Säulenvolumen 0,5 M Citratpuffer pH 3,0 verwendet. Danach wurde die verdünnte Plasmaprobe auf die Säule gegeben. Als Waschlösung wurde ein Säulenvolumen Reinstwasser eingesetzt. Die gewählten Elutionsmittel wurden für jede getestete SPE Kartusche separat optimiert, um eine optimale Analytelution zu gewährleisten. Die eingesetzten Elutionsmittel beinhalteten Methanol, Acetonitril, 2 % Ameisensäure in Methanol oder 10 % Ammoniak in Acetonitril. Die Elution der Fluorchinolone erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 5 mL des optimalen Elutionsmittels. Die Eluate wurden anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und in 200 µL 0,5 % Ameisensäure in 1 mM Ammoniumacetat (Eluent A)/Methanol (Eluent B) (1:1, v:v) aufgenommen. Um Schwebstoffe und Partikel zu entfernen, wurde das Probenextrakt bei 13900 g für 10 min bei 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein HPLC-Vial überführt und 2 µL zur HPLC-ESI-MS/MS-Analytik eingesetzt.

Die Wiederfindung (WDF) wurde berechnet, indem ein Mischstandard mit der entsprechenden Konzentration des Probenextraktes in Eluent A/Eluent B (1:1, v:v) angesetzt wurde. Die Berechnung der Wiederfindung erfolgte unter Verwendung folgender Formel:

$$WDF = \frac{A}{B} \times 100 [\%]$$

A: Peakfläche einer vor der Extraktion dotierten Probe

B: Peakfläche eines Mischstandards mit der korrespondierenden Konzentration in Eluent A/Eluent B (1:1, v:v)

3.2 Auswahl geeigneter SPE-Phasen

In der Literatur wird häufig Trifluoressigsäure als Elutionsmittelzusatz für die Elution von Fluorchinolonen verwendet (Bailac *et al.* 2004; Ballesteros *et al.* 2003; Cinquina *et al.* 2003; Clemente *et al.* 2006; Garcés *et al.* 2006; Hassouan *et al.* 2007; Hermo *et al.* 2005; Hoof *et al.* 2005; Jimenez-Lozano *et al.* 2004; Samanidou *et al.* 2005). Trifluoressigsäure weist allerdings zwei entscheidende Nachteile auf: einerseits wirken bereits geringe Mengen im Probenextrakt korrosiv gegenüber Metallen und zum anderen kann Trifluoressigsäure Signalunterdrückung in der LC-MS/MS-Analytik verursachen (Annesley 2003). Daher wurde in dieser Arbeit Trifluoressigsäure durch Ameisensäure ersetzt.

Voruntersuchungen haben zudem gezeigt, dass die Analytwiederfindung durch den Einsatz von zwei Elutionsschritten (2 x 5 mL) im Vergleich zu einem Elutionsschritt (1 x 10 mL) erhöht werden kann. Als Ausschlusskriterium wurde eine Wiederfindung von < 80 % für Ciprofloxacin und Enrofloxacin angesetzt.

Die Analytwiederfindungen sowie die optimalen Elutionsmittel für jede SPE-Säule sind in Tab. 3.1 zusammengefasst. Bei Verwendung der Kieselgel-RP Säule HyperSep C18 liegen die Wiederfindungen für alle Analyten unter 80 %. Die zwei Mixed-Mode-Kationenaustauscher-Säulen HR-XC und HyperSep Retain CX sowie die Polymer-RP Säule Isolute ENV+ weisen Wiederfindungen für Marbofloxacin, Enrofloxacin und Difloxacin über 80 % auf. Jedoch liegen die Ciprofloxacin-Wiederfindungen für alle drei Säulen unter 75 %. Daher wurden diese vier SPE-Säulen für weitere Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt.

Vielversprechende Wiederfindungen > 80 % konnten mit den drei Polymer-RP Säulen Oasis HLB, Strata X und SDB sowie den drei Mixed-Mode Säulen HR-XA, Easy und HyperSep Retain PEP erzielt werden. Folglich wurden weitere Optimierungen für diese SPE-Säulen vorgenommen. Da der Fokus der Methodenentwicklung auf Ciprofloxacin und Enrofloxacin

lag, wurde auch die Polymer-RP Säule SDB einbezogen, obwohl die Wiederfindungen für Marbofloxacin und Difloxacin unter 75 % liegen.

Tab. 3.1: Übersicht über die Wiederfindungen der untersuchten SPE Säulen sowie der optimalen Elutionsmittel für jede SPE Säule (MeOH: Methanol, AS: Ameisensäure, ACN: Acetonitril, MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin, DiFX: Difloxacin).

SPE Säule	Säulentyp	Elutionsmittel	Wiederfindung [%]			
			MFX	CFX	EFX	DiFX
Oasis HLB	Polymer-RP	1. MeOH 2. 2 % AS in MeOH	84,3	95,6	96,5	90,8
HR-XA	Mixed-Mode- Anionenaustauscher	1. MeOH 2. 2 % AS in MeOH	106,1	94,2	107,6	106,8
Strata X	Polymer-RP	1. MeOH 2. 2 % AS in MeOH	93,5	89,9	95,9	94,8
Easy	Mixed-Mode- Anionenaustauscher	1. MeOH 2. 10 % NH ₃ in ACN	97,2	89,0	98,6	79,9
SDB	Polymer-RP	1. 10 % NH ₃ in MeOH 2. 10 % NH ₃ in MeOH	71,5	85,7	83,2	73,4
HyperSep Retain PEP	Mixed-Mode- Anionenaustauscher	1. MeOH 2. 2 % AS in MeOH	89,0	80,3	94,8	104,0
HR-XC	Mixed-Mode- Kationenaustauscher	1. 10 % NH ₃ in ACN 2. 10 % NH ₃ in ACN	97,1	74,4	98,5	87,4
HyperSep C18	Kieselgel-RP	1. 10 % NH ₃ in ACN 2. 10 % NH ₃ in ACN	75,5	61,1	75,6	76,2
Isolute ENV+	Polymer-RP	1. 10 % NH ₃ in ACN 2. 10 % NH ₃ in ACN	96,6	57,0	97,9	82,4
HyperSep Retain CX	Mixed-Mode- Kationenaustauscher	1. 10 % NH ₃ in ACN 2. 10 % NH ₃ in ACN	89,0	56,0	87,3	93,1

3.3 Optimierung einzelner Extraktionsschritte

3.3.1 Waschschrift

Die Wahl einer geeigneten Waschlösung ist entscheidend, wenn es um die Minimierung von Matrixbestandteilen im Probenextrakt und damit verbundene Matrixeffekte in der LC-MS/MS-Analytik geht. Von Vorteil ist es, wenn neben dem Waschschrift mit Wasser noch ein

zusätzlicher Waschschrift mit einem (verdünnten) organischen Lösungsmittel in die Methode integriert werden kann. Um das beurteilen zu können, eignet sich die sequentielle Elution, da mit Hilfe dieser der organische Anteil der Waschlösung graduell gesteigert werden kann und somit der maximale Gehalt an organischem Lösungsmittel in der Waschlösung ermittelbar ist, bei dem noch kein Analytverlust auftritt.

Bei der sequentiellen Elution wurden methanolische Lösungen von 0 - 100 % eingesetzt, wobei der methanolische Anteil für jeden Elutionsschritt um 10 % erhöht wurde. Das Volumen betrug dabei jeweils 3 mL. Jeder Elutionsschritt wurde separat aufgefangen und die Fluorchinolonwiederfindung ermittelt. Dadurch lässt sich bestimmen, ob und in welcher Zusammensetzung ein zusätzlicher Waschschrift ohne Analytverlust in die SPE-Methode integriert werden kann.

Die sequentielle Elution (Abb. 3.1) zeigt, dass der maximale Gehalt an Methanol in der Waschlösung, bei der noch kein Analytverlust feststellbar ist, abhängig von der jeweiligen SPE-Säule ist. Als Beispiel wurde die sequentielle Elution von Ciprofloxacin gewählt. Bei den beiden Mixed-Mode Säulen HR-XA und Easy ist kein weiterer Waschschrift neben der Verwendung von Wasser möglich, da bereits mit 10 % Methanol mehr als 5 % Ciprofloxacin eluiert wird. In die SPE-Methoden für Oasis HLB sowie HyperSep Retain PEP kann ein weiterer Waschschrift mit einem geringen Gehalt von 20 % Methanol integriert werden. Ohne Analytverlust lässt sich in die SPE-Methode der Polymer-RP Säule Strata X ein zusätzlicher Waschschrift mit 50 % Methanol einfügen. Ein hoher methanolischer Anteil von 90 % in der Waschlösung kann für die SDB Säule angewandt werden.

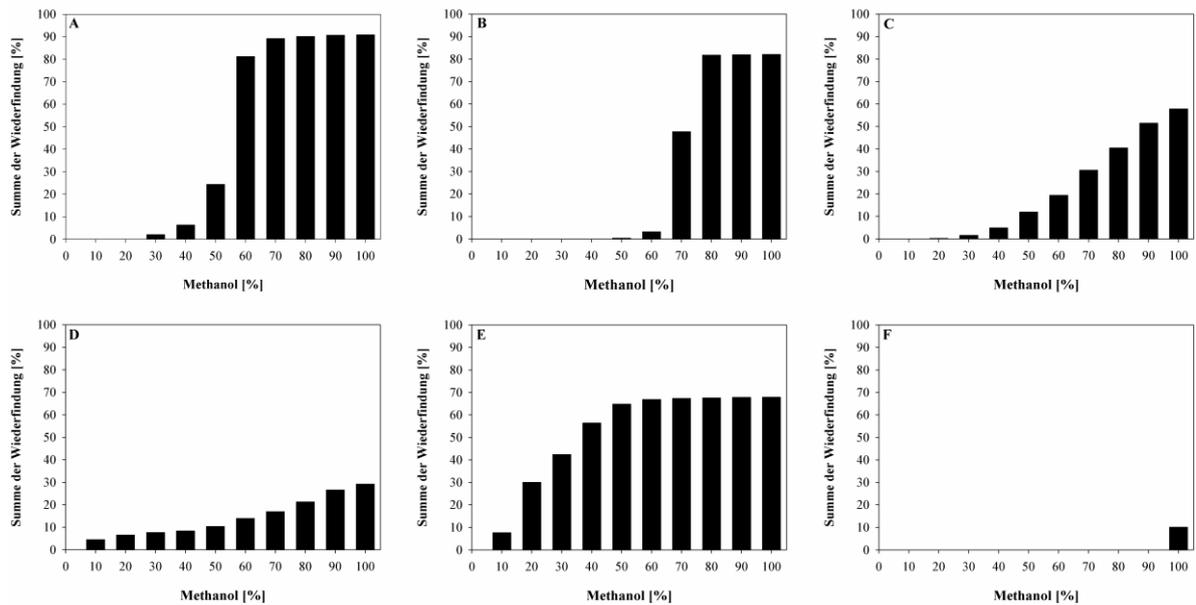


Abb. 3.1: Sequentielle Elution am Beispiel von Ciprofloxacin für die SPE Säulen Oasis HLB (A), Strata X (B), HyperSep Retain PEP (C), Easy (D), HR-XA (E) und SDB (F).

Es ist anzunehmen, dass ein höherer Methanolgehalt in der Waschlösung zu weniger störenden Matrixbestandteilen im Probenextrakt führt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die UV-Chromatogramme (Abb. 3.2) der Probenextrakte unter Verwendung des optimalen Waschschrtes miteinander verglichen.

Die UV-Chromatogramme der Probenextrakte, die mittels HR-XA und Easy extrahiert wurden, zeigen im Elutionsbereich der Analyten eine Vielzahl von Peaks sowie eine Basislinienerhöhung im Vergleich zu den SPE-Methoden, in die ein zusätzlicher Waschschrte integriert werden konnte. Jedoch sind kleinere Peaks ebenso in den UV-Chromatogrammen der Probenextrakte, die mittels Oasis HLB, HyperSep Retain PEP und SDB extrahiert wurden, erkennbar. Daher ist davon auszugehen, dass trotz eines zusätzlichen Waschschrtes nicht alle störenden Matrixbestandteile eliminiert werden konnten. Vor allem für die SDB Methode, in die ein Waschschrte mit 90 % Methanol integriert werden konnte, wären weniger Störsignale zu erwarten gewesen. Dies deutet auf eine starke Wechselwirkung zwischen SPE-Sorbents und Matrixbestandteilen sowie Analyten hin. Im UV-Chromatogramm der mittels Strata X aufgearbeiteten Probenextrakte sind außer den Analytsignalen keine zusätzlichen Peaks zu erkennen. Demzufolge kann angenommen werden, dass Störungen durch Matrixbestandteile minimiert wurden.

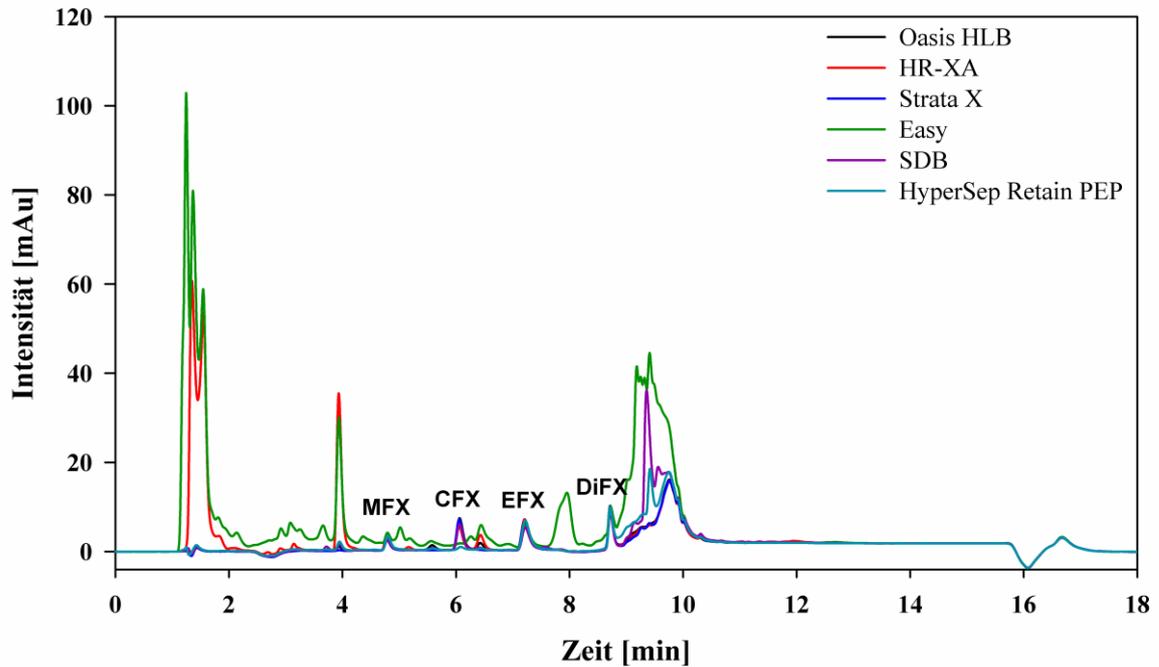


Abb. 3.2: UV-Chromatogramme (280 nm) der Probenextrakte von den SPE Säulen Oasis HLB, Strata X, HyperSep Retain PEP, Easy, HR-XA und SDB unter Verwendung eines zusätzlichen Waschschrittes (MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin, DiFX: Difloxacin).

3.3.2 Elution

Eine mögliche Minimierung des Lösungsmittelverbrauches sowie der Probenvorbereitungszeit wurde durch Reduktion der Elutionsvolumina von 2 x 5 mL auf 2 x 3 mL getestet. Als Beispiel für den Einfluss reduzierter Elutionsvolumina eignet sich Ciprofloxacin (Tab. 3.2). So sind die Wiederfindungen der HR-XA, Easy, SDB und HyperSep Retain PEP Säulen bei Anwendung der reduzierten Elutionsvolumina deutlich niedriger für Ciprofloxacin. Die Wiederfindungen der anderen Analyten nehmen ebenso ab, allerdings nicht so stark wie für Ciprofloxacin. Gravierend ist die Abnahme der Ciprofloxacin-Wiederfindung vor allem für die Säulen Easy (von 89,0 % auf 3,7 %) sowie HyperSep Retain PEP (von 80,3 % auf 8,6 %). Für diese vier Säulen kann das Elutionsvolumen nicht reduziert werden. Daher wurden diese Säulen für weitere Untersuchungen nicht mehr verwendet.

Trotz Minimierung des Elutionsvolumens, konnten ähnliche Analytwiederfindungen mit den Polymer-RP Säulen Oasis HLB und Strata X erzielt werden. Daher wurden weitere Methodenoptimierungen (siehe 4.) mit diesen beiden Säulen durchgeführt, um letztendlich die Säule, die am besten zur Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerplasma geeignet ist, zu ermitteln.

Tab. 3.2: Analytwiederfindung unter Verwendung reduzierter Elutionsvolumina (MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin, DiFX: Difloxacin).

SPE Säule	Wiederfindung[%]			
	MFX	CFX	EFX	DiFX
Oasis HLB	84,3	85,9	92,4	104,2
HR-XA	82,4	70,0	96,5	93,8
Strata X	82,5	86,7	91,1	93,5
Easy	60,3	3,7	72,4	49,5
SDB	63,6	70,0	68,4	72,5
HyperSep Retain PEP	79,5	8,6	90,9	85,7

4. Evaluierung und Minimierung von Matrixeffekten in der Analytik von Hühnerplasma

4.1 Allgemeines

Matrixeffekte sind in der massenspektrometrischen Analyse biologischer Proben von großer Bedeutung, da sie erhebliche Auswirkungen auf die Genauigkeit und Präzision einer analytischen Methode, wie z. B. divergente Kalibrierfunktionen, haben können. Substanzen, die in der LC-MS/MS-Analytik Matrixeffekte verursachen können, sind in der Analyse von Blutplasma vor allem Phospholipide. Daher wurde der Einfluss von Phospholipiden auf die massenspektrometrische Analyse von Fluorchinolonen in Hühnerplasma untersucht. Des Weiteren können Phospholipide als Marker für Matrixeffekte verwendet werden, da davon auszugehen ist, dass ihre Minimierung im Probenextrakt ebenso die Minimierung weiterer Matrixbestandteile beinhaltet.

Für die sensitive und selektive Bestimmung der Phospholipide wurden verschiedene massenspektrometrische Detektionsmethoden (Vorläuferionen Scan, Neutralverlust Scan, stoßinduzierte Dissoziation in der Ionenquelle und Selected Reaction Monitoring) getestet. Die Probenvorbereitung erfolgte mittels Festphasenextraktion (SPE). Zum Einsatz kamen dabei sowohl konventionelle Umkehrphasenmaterialien auf Polymerbasis (Strata X, Oasis HLB) als auch Kombinationen aus Mixed-Mode-Anionen- und -Kationenaustauschern (Oasis MAX bzw. Oasis MCX), die bezüglich der Fluorchinolon-Anreicherung, Phospholipidelution und den damit in Verbindung stehenden Matrixeffekten verglichen wurden.

4.2 MS/MS-Methoden zur Bestimmung von Phospholipiden in Hühnerplasma

4.2.2 Vorläuferionen Scan

Abb. 4.1 zeigt den Vorläuferionen Scan von m/z 184,1 mit dem simultan PC, Lyso PC und SM erfasst werden können. Jedoch ist eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Phospholipidklassen nicht möglich. Auf Grund der verwendeten Phenyl-Hexyl HPLC-Säule ist allerdings davon auszugehen, dass die polareren Lyso PC früher eluieren und dem Peak bei 10,5 min entsprechen und PC sowie SM zwischen 11,0 und 15 min eluieren.

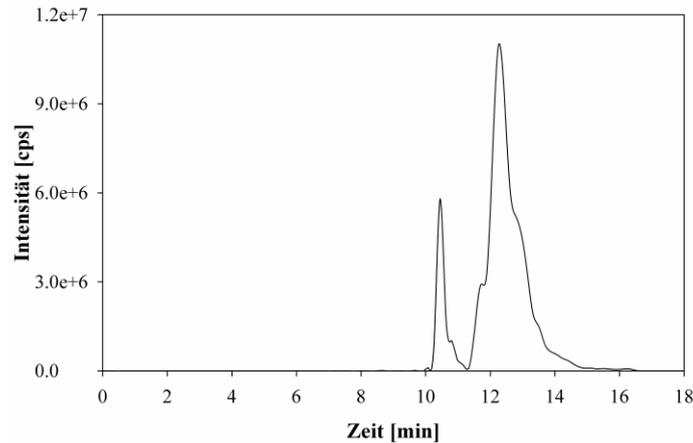


Abb. 4.1: Vorläuferionen Scan von m/z 184,1 zur Erfassung von Phosphatidylcholinen, Lyso Phosphatidylcholinen und Sphingomyelinen unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

Der Vorläuferionen Scan von m/z 153,1 (Abb. 4.2) kann zur simultanen Erfassung von PA, PI, PS, PG, PC und Lyso PC eingesetzt werden. Analog zum Vorläuferionen Scan von m/z 184,1 ist keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Phospholipidklassen möglich. So kann lediglich eine Aussage über die Gesamtsumme an Phospholipiden getroffen werden. Zudem ist das Rauschen im Vergleich zum Signal hoch ($S/N \sim 2,5$), so dass nur ein Peak bei 10,5 min identifiziert werden konnte. Daher ist der Vorläuferionen Scan von m/z 153,1 nicht für die selektive und sensitive Bestimmung von Phospholipiden mit dem zur Verfügung stehenden Massenspektrometer geeignet. Hingegen ermöglicht der Vorläuferionen Scan von m/z 184,1 eine sensitive jedoch keine selektive Erfassung von PC, Lyso PC und SM ohne *a priori* Informationen.

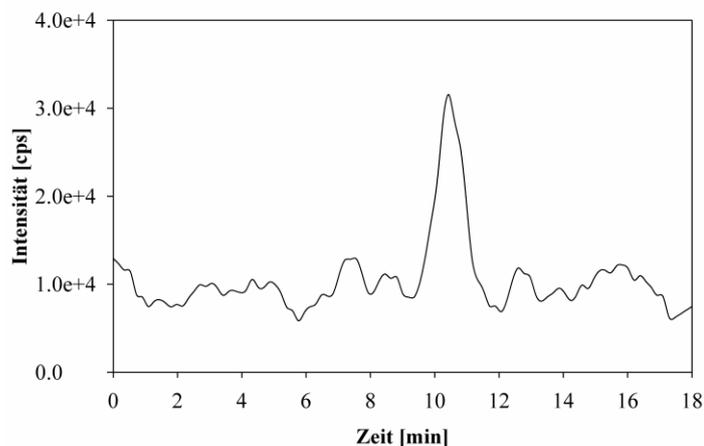


Abb. 4.2: Vorläuferionen Scan von m/z 153,1 zur Erfassung von Phosphatidylsäuren, Phosphatidylinositolen, Phosphatidylserinen, Phosphatidylglycerinen, Phosphatidylcholinen und Lyso Phosphatidylcholinen unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

4.2.3 Stoßinduzierte Dissoziation in der Ionenquelle

Bei der stoßinduzierten Dissoziation in der Ionenquelle (In-Source CID) wird ebenfalls das für PC, Lyso PC und SM charakteristische Produktion von m/z 184,1 (Trimethylammoniumethylphosphat) für deren simultane Detektion eingesetzt (Abb. 4.3). Jedoch findet im Vergleich zum Vorläuferionen Scan die Fragmentierung bereits in der ESI-Quelle statt. Analog zum Vorläuferionen Scan von m/z 184,1 ist keine Unterscheidung zwischen PC, Lyso PC und SM möglich, aber es ist dennoch davon auszugehen, dass der Peak bei 10,5 min Lyso PC entspricht und der Peak bei 13,5 min PC sowie SM zuzuordnen ist (vgl. 4.2.2). Im Vergleich zum Vorläuferionen Scan von m/z 184,1 ist die Intensität des In-Source CID von m/z 184,1 jedoch um den Faktor 25-30 geringer für PC und SM. Berücksichtigt man den In-Source CID von m/z 104,1 (Abb. 4.3) mit dem Lyso PC alleiniger erfasst werden kann, so ist die Intensität im Vergleich zum Vorläuferionen Scan von m/z 184,1 sogar um einen Faktor 80 geringer sowie um den Faktor 3 - 6 für den In-Source CID von m/z 184,1. Dies zeigt, dass die Produktion von m/z 184,1 am intensivsten ist und daher zur sensitiven Erfassung von PC, Lyso PC und SM verwendet werden sollte.

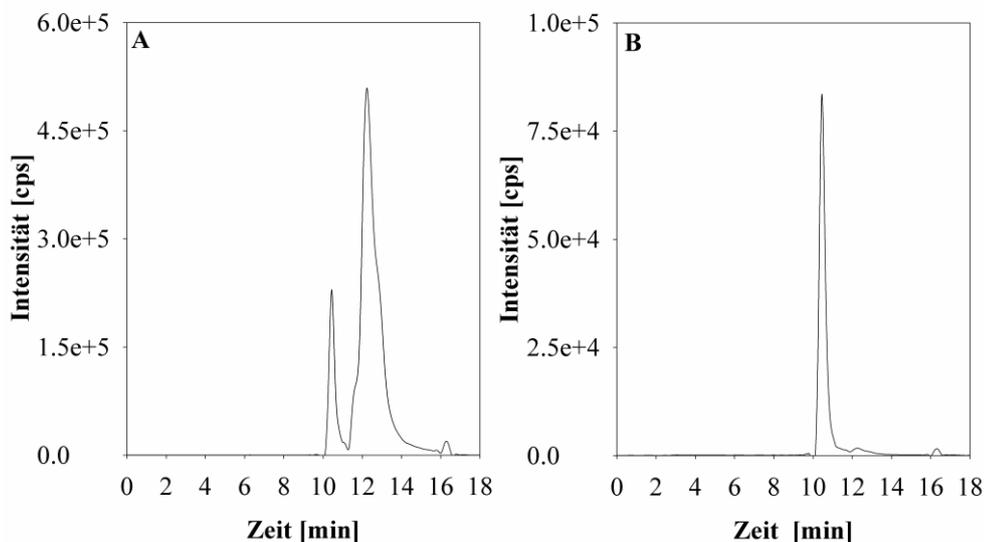


Abb. 4.3: Stoßinduzierte Dissoziation in der Ionenquelle von m/z 184,1 (A) zur Erfassung von Phosphatidylcholinen, Lyso Phosphatidylcholinen und Sphingomyelinen sowie m/z 104,1 (B) zur alleinigen Erfassung von Lyso Phosphatidylcholinen unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

4.2.4 Neutralverlust Scan

Der Neutralverlust Scan von 141 Da (Abb. 4.4) eignet sich zur Erfassung von PE und Lyso PE. Jedoch ist wie bei den bereits zuvor genannten Methoden keine Unterscheidung zwischen

PE und Lyso PE ohne zusätzliche Informationen möglich. Daher ist auf Grund der verwendeten RP-Säule davon auszugehen, dass die polareren Lyso PE zuerst eluieren (10,8 min) und der Peak bei 12,5 min den PE entspricht. Zu beachten ist zudem, dass das Rauschen im Verhältnis zum Signal – wie bereits für den Vorläuferionen Scan von m/z 153,1 beschrieben – hoch ist ($S/N \sim 7$).

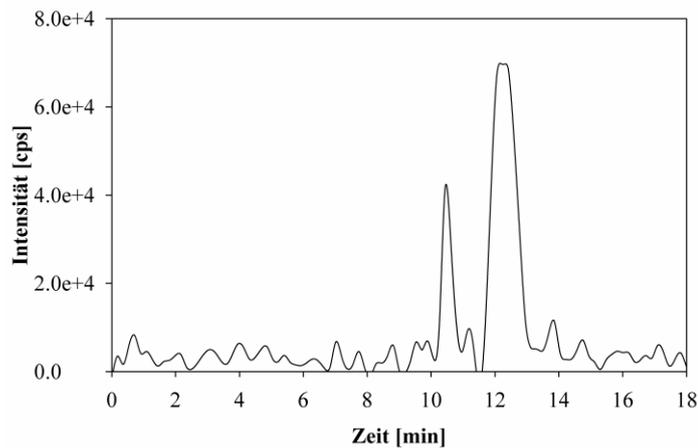


Abb. 4.4: Neutralverlust Scan von 141 Da zur Erfassung von Phosphatidylethanolaminen und Lyso Phosphatidylethanolaminen unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

4.2.5 Selected Reaction Monitoring (SRM)

Um die Sensitivität und Selektivität im Vergleich zu den bereits genannten Methoden zu erhöhen, wurden spezifische Massenübergänge, die sowohl auf Literaturdaten (Pang *et al.* 2008; Pulfer und Murphy 2003; Uran *et al.* 2001; Xia und Jemal 2009; Zemski Berry und Murphy 2004) als auch auf eigenen Überlegungen basieren, jeder Phospholipidklasse mittels Selected Reaction Monitorings erfasst. Die Signale der einzelnen Phospholipid-Massenübergänge, die relativen Intensitäten jedes Massenüberganges sowie die Retentionszeiten unter Verwendung des ursprünglichen und modifizierten Gradienten (siehe 4.6.1) sind nachfolgend für jede Phospholipidklasse separat aufgeführt. Folgende Phospholipidklassen wurden auf Grund ihres geringen Gehaltes nicht weiter in der Methodenoptimierung, d. h. unter Verwendung des modifizierten Gradienten, berücksichtigt: Phosphatidylserine, Phosphatidylglycerine, Phosphatidylinositol und Phosphatidsäuren.

Phosphatidylcholine

Zum Gesamtsignal der Phosphatidylcholine tragen vier Massenübergänge (m/z 758 \rightarrow 184, m/z 760 \rightarrow 184, m/z 786 \rightarrow 184 und m/z 810 \rightarrow 184) entscheidend bei (Tab. 4.1). Obwohl die relativen Intensitäten für die anderen Massenübergänge $< 10\%$ betragen, wurden diese

Massenübergänge in die SRM-Methode integriert, da diese auf Grund ihrer absoluten Intensität im Vergleich zu den anderen Phospholipidklassen von Bedeutung für den Gesamtphospholipidgehalt sind.

Tab. 4.1: Relative Intensität der einzelnen Phosphatidylcholin Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit unter Verwendung des ursprünglichen und modifizierten Gradienten.

	Vorläuferion	Produktion	Relative	Retentionszeit	Retentionszeit
	[m/z]	[m/z]	Intensität	ursprünglicher Gradient	modifizierter Gradient
			[%]	[min]	[min]
Phosphatidylcholine	706,5		1,0	11,74	8,38
	734,5		2,1	12,09	8,45
	756,5		6,2	11,81	8,38
	758,6		62,5	12,07	8,52
	760,5		100,0	12,31	8,59
	772,6		1,4	12,31	8,59
	774,5	184,1	1,8	12,57	8,93
	784,5		5,5	12,26	8,52
	786,5		26,9	12,55	8,65
	790,5		3,8	12,89	8,74
	806,5		4,8	12,12	8,52
	810,5		12,9	12,66	8,72
	834,5		2,3	12,66	8,65

Die intensivsten Massenübergänge unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten sind in Abb. 4.5 graphisch dargestellt. Dabei wird ersichtlich, dass der Elutionsbereich der Phosphatidylcholine auf Grund starken Tailings zwischen 12,5 und 15,0 min liegt.

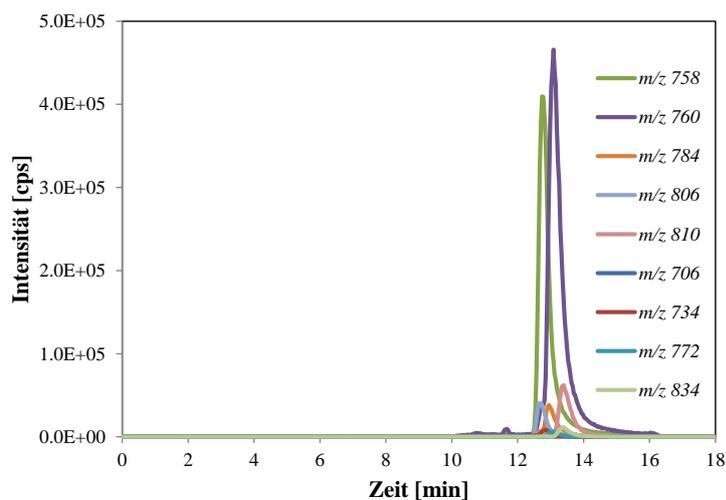


Abb. 4.5: Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Phosphatidylcholin Massenübergänge unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

Lyso Phosphatidylcholine

Mit Ausnahme des Massenübergangs von m/z 508 \rightarrow 184 tragen alle erfassten Lyso Phosphatidylcholin Massenübergänge mit relativen Intensitäten $> 10\%$ entscheidend zum Gesamtgehalt dieser Phospholipidklasse bei (Tab. 4.2). Der Massenübergang m/z 508 \rightarrow 184 wurde dennoch in die endgültige SRM-Methode aufgenommen, da auf Grund der absoluten Intensität ihr Beitrag zum Gesamtphospholipidgehalt im Vergleich zu den anderen Phospholipidklassen hoch ist.

Tab. 4.2: Relative Intensität der einzelnen Lyso Phosphatidylcholin Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit unter Verwendung des ursprünglichen und modifizierten Gradienten.

	Vorläuferion	Produktion	Relative	Retentionszeit	
	[m/z]	[m/z]	Intensität	ursprünglicher Gradient	modifizierter Gradient
			[%]	[min]	[min]
Lyso Phosphatidylcholine	496,1		100,0	10,37	7,90
	508,3		0,5	10,37	7,83
	520,3	184,1	28,2	10,37	7,90
	522,3		48,4	10,44	7,90
	524,4		14,5	10,51	7,90
	544,3		10,1	10,37	7,90

Die Massenübergänge unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten sind in Abb. 4.6 graphisch dargestellt. Lyso Phosphatidylcholine eluieren überwiegend zwischen 10,0 und 12,0 min.

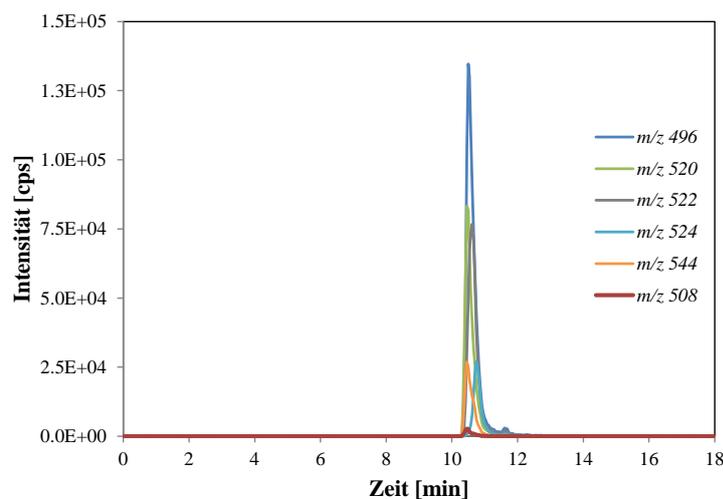


Abb. 4.6: Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Lyso Phosphatidylcholin Massenübergänge unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

Sphingomyeline

Lediglich zwei Massen (m/z 703 und 807) tragen mit einer relativen Intensität $> 10\%$ zum Sphingomyelingehalt bei (Tab. 4.3). Die Massen mit relativen Intensitäten $< 1\%$ (m/z 749, 765, 779, 847 und 877) wurden nicht in die SRM-Methode integriert, da ihr Beitrag sowohl zum Sphingomyelingehalt als auch zum Gesamtphospholipidgehalt vernachlässigbar gering ist.

Tab. 4.3: Relative Intensität der einzelnen Sphingomyelin Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit unter Verwendung des ursprünglichen und modifizierten Gradienten.

	Vorläuferion	Produktion	Relative	Retentionszeit	
	[m/z]	[m/z]	Intensität	ursprünglicher Gradient	modifizierter Gradient
			[%]	[min]	[min]
Sphingomyeline	703,5		100,0	11,49	8,28
	731,6		6,0	11,78	8,43
	735,6		4,5	12,12	8,55
	747,7		2,1	12,12	8,55
	749,7		0,4	11,58	8,38
	763,7		8,0	12,32	8,65
	765,7	184,1	0,3	11,91	8,46
	775,7		4,0	12,60	9,00
	777,7		1,0	12,40	8,30
	779,7		0,6	11,75	8,38
	803,7		1,3	13,41	8,39
	807,7		12,6	12,11	8,55
	847,7		0,2	12,12	8,55
	877,7		0,1	13,28	8,37

Die einzelnen Sphingomyelin Massenübergänge unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten sind in Abb. 4.7 graphisch dargestellt. Sphingomyeline eluieren hauptsächlich zwischen 12,0 und 14,5 min.

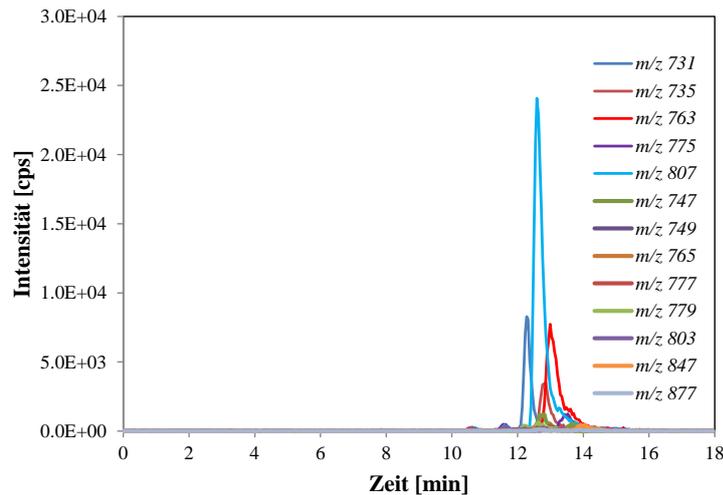


Abb. 4.7: Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Sphingomyelin Massenübergänge unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

Phosphatidylethanolamine

Insgesamt sind neun Phosphatidylethanolamin Massen (m/z 454, 718, 740, 742, 744, 746, 764, 766 und 768) mit relativen Intensitäten $> 15\%$ von Relevanz für den Gesamtgehalt dieser Phospholipidklasse (Tab. 4.4). Bis auf den Massenübergang m/z 776 \rightarrow 635,4 wurden alle in die SRM-Methode integriert.

Tab. 4.4: Relative Intensität der einzelnen Phosphatidylethanolamin Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit unter Verwendung des ursprünglichen und modifizierten Gradienten.

	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Relative Intensität [%]	Retentionszeit ursprünglicher Gradient [min]	Retentionszeit modifizierter Gradient [min]
Phosphatidylethanolamine	454,3	313,3	47,8	10,33	7,84
	718,5	577,5	100,0	12,11	8,54
	740,5	599,5	30,5	11,94	8,46
	742,5	601,5	15,8	12,11	8,49
	744,5	603,5	64,7	12,33	8,58
	746,5	605,5	77,1	12,64	8,72
	748,5	607,5	7,4	12,65	8,73
	752,5	611,5	2,3	12,47	8,65
	764,5	623,5	33,8	11,94	8,46
	766,5	625,5	24,8	12,20	8,55
	768,5	627,5	71,0	12,46	8,65
776,5	635,5	0,7	12,48	8,65	

Abb. 4.8 zeigt die untersuchten Phosphatidylethanolamin Massenübergänge. Der Elutionsbereich dieser Phospholipide liegt vorwiegend zwischen 11,8 und 13,0 min. Das Signal bei 10,5 min ist auf das polare Lyso Phosphatidylethanolamin (m/z 454) zurückzuführen.

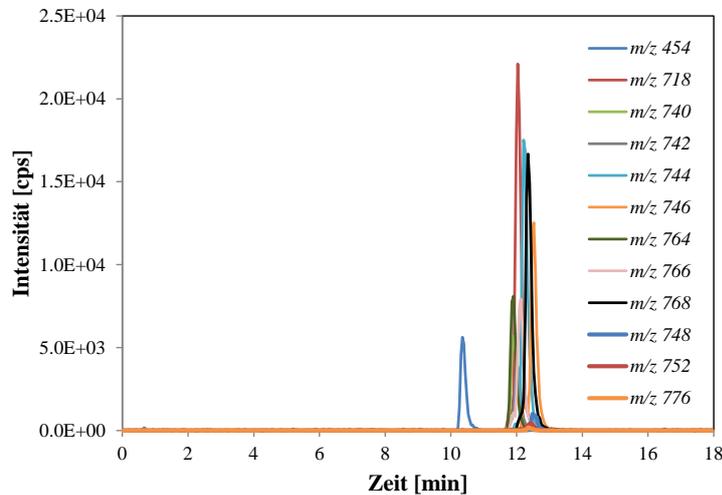


Abb. 4.8: Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Phosphatidylethanolamin Massenübergänge unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

Phosphatidylserine

Von den untersuchten Phosphatidylserin Massen konnten nur drei (m/z 810, 812 und 834) in Hühnerplasma detektiert und in eine SRM-Methode integriert werden (Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Relative Intensität der einzelnen Phosphatidylserin (PS) Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit unter Verwendung des ursprünglichen und modifizierten Gradienten.

	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Relative Intensität [%]	Retentionszeit ursprünglicher Gradient [min]	Retentionszeit modifizierter Gradient [min]
PS	810,5	626,5	100,0	13,53	
	812,5	628,5	53,2	14,13	-
	834,5	650,5	43,7	13,50	

In Abb. 4.9 sind die untersuchten Phosphatidylserin Massenübergänge graphisch dargestellt. Das MS/MS-Chromatogramm ist von starkem Rauschen geprägt. Dennoch wird ersichtlich, dass die Phosphatidylserine zwischen 13,0 und 15,0 min eluieren.

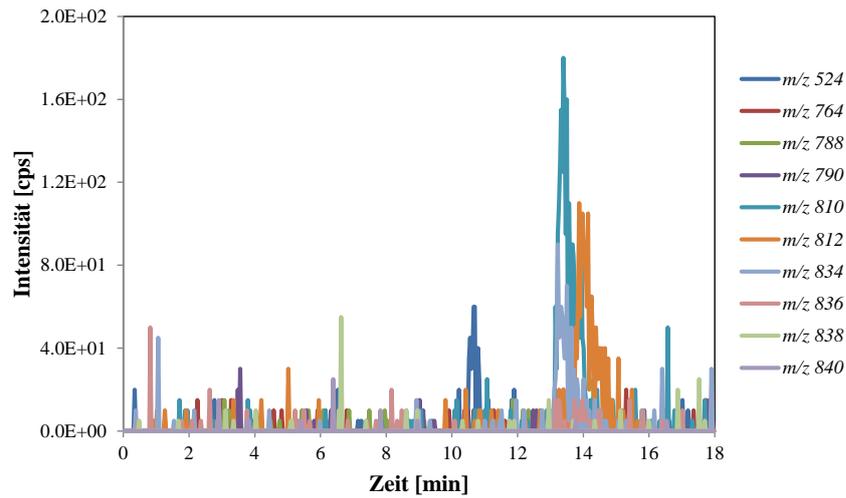


Abb. 4.9: Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Phosphatidylserin Massenübergänge unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

Phosphatidylglycerine

Insgesamt konnten in Hühnerplasma zwei Phosphatidylglycerin Massen (m/z 771 und 799) detektiert und in eine SRM-Methode aufgenommen werden (Tab. 4.6). Jedoch ist die Intensität dieser Massenübergänge sehr gering (Abb. 4.10).

Tab. 4.6: Relative Intensität der einzelnen Phosphatidylglycerin (PG) Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit unter Verwendung des ursprünglichen und modifizierten Gradienten.

	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Relative Intensität [%]	Retentionszeit ursprünglicher Gradient [min]	Retentionszeit modifizierter Gradient [min]
PG	771,5	600,5	47,8	13,12	
	799,5	628,5	100,0	12,11	-

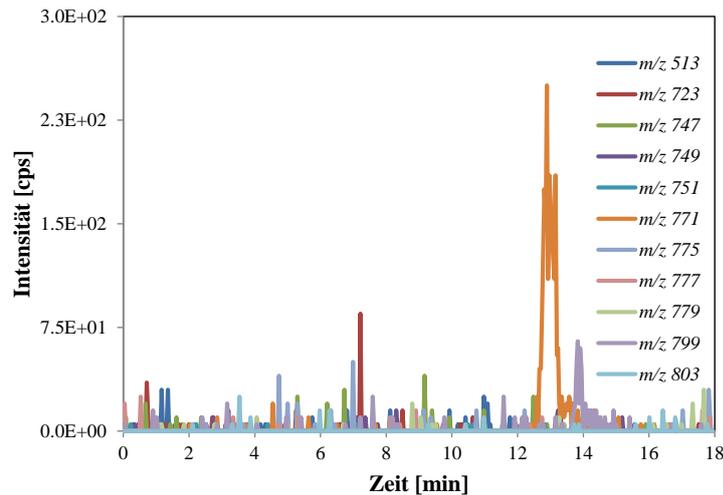


Abb. 4.10: Selected Reaction Monitoring (Positivmodus) ausgewählter Phosphatidylglycerin Massenübergänge unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

Phosphatidylinositole

Es konnten fünf Phosphatidylinositol Massen (m/z 833, 857, 861, 885 und 887) mit relativen Intensitäten $> 10\%$ in der untersuchten Plasmaprobe detektiert werden (Tab. 4.7). Dennoch wurden bis auf den Massenübergang m/z 913 \rightarrow 241,2 (nicht nachweisbar) zusätzlich die Massenübergänge mit relativen Intensitäten $< 10\%$ in die SRM-Methode integriert, da diese Phospholipidklasse ein sehr inhomogenes Elutionsschema aufweist (Abb. 4.11). Phosphatidylinositole eluieren zwischen 10,0 und 16,0 min. Die Intensitäten sind mit Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerin vergleichbar gering.

Tab. 4.7: Relative Intensität der einzelnen Phosphatidylinositol Massenübergänge sowie jeweilige Retentionszeit unter Verwendung des ursprünglichen und modifizierten Gradienten.

	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Relative Intensität [%]	Retentionszeit ursprünglicher Gradient [min]	Retentionszeit modifizierter Gradient [min]
Phosphatidylinositole	833,5		11,0	13,48	
	857,5		11,9	13,82	
	859,5		8,9	14,61	
	861,6		38,6	15,55	
	863,5	241,2	9,1	15,76	-
	883,5		3,3	14,93	
	885,5		100,0	15,94	
	887,5		27,9	16,01	
	913,5		0,0	-	

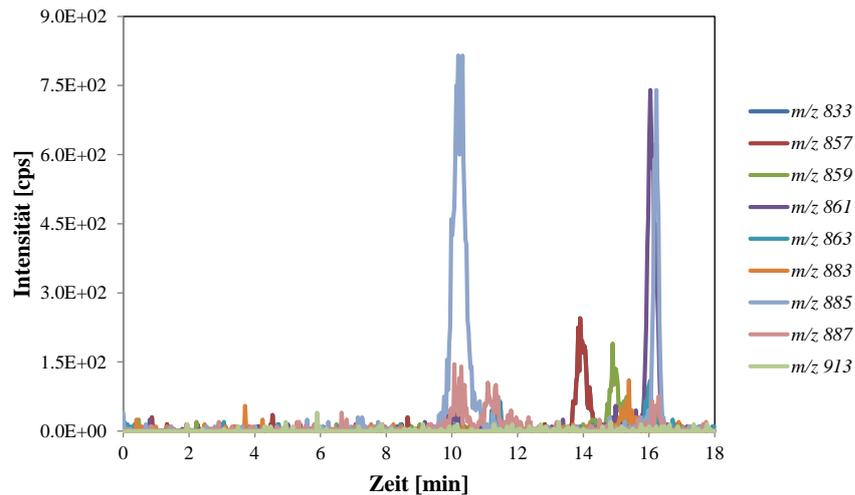


Abb. 4.11: Selected Reaction Monitoring (Negativmodus) ausgewählter Phosphatidylinositol Massenübergänge unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

Phosphatidsäuren

In der untersuchten Plasmaprobe konnten keine der drei untersuchten Phosphatidsäure Massenübergänge nachgewiesen werden (Abb. 4.12).

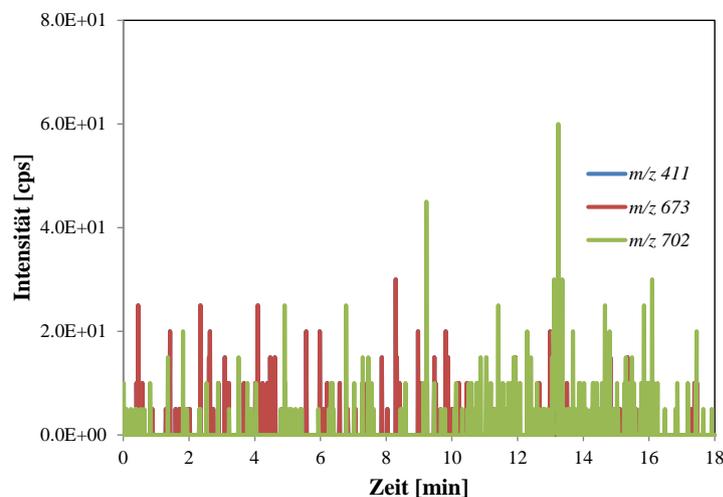


Abb. 4.12: Selected Reaction Monitoring (Negativmodus) ausgewählter Phosphatidylsäuren Massenübergänge unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.

Für die selektive sowie sensitive Detektion der Phospholipide ist die Methode des Selected Reaction Monitorings am besten geeignet. Dazu wurden die Massenübergänge mit der höchsten Intensität jeder Klasse ausgewählt und mit Massenübergängen anderer Klassen gleicher Polarität (Negativ- oder Positivmodus) sowie ähnlicher Intensität in eine SRM-Methode integriert. Dies resultierte in insgesamt vier Methoden womit pro Injektion simultan

zwei Phospholipidklassen (Lyso PC und PC; SM und PE; PS und PG; PI und PA) erfasst und gleichzeitig der Probendurchsatz erhöht werden konnte.

4.3 Phospholipidzusammensetzung und -gehalt in Probenextrakten

Für die beiden SPE-Säulen Strata X und Oasis HLB wurden bereits Methodenoptimierungsschritte durchgeführt (siehe 3.3). Jedoch konnte anhand dieser Ergebnisse keine endgültige Entscheidung darüber getroffen werden, welche Säule zur Extraktion von Hühnerplasma am besten geeignet ist. Daher sollte die Bestimmung von Matrixeffekten sowie des Phospholipidgehaltes im Probenextrakt als weitere Entscheidungskriterien herangezogen werden.

4.3.1 Phospholipidzusammensetzung

Sowohl in mit Strata X als auch mit Oasis HLB extrahierten Hühnerplasmaproben sind Phosphatidylcholine (ca. 75 %) gefolgt von Lyso Phosphatidylcholinen (ca. 15 %), Sphingomyelinen (ca. 3 - 7 %) und Phosphatidylethanolaminen (ca. 4 - 5 %) die dominierenden Phospholipidklassen (Abb. 4.13). Die weiteren Phospholipidklassen (PI, PS, PG und PA) tragen mit einem Anteil von weniger als 1 % nicht entscheidend zum Gesamtphospholipidgehalt bei und wurden daher in nachfolgenden Methodenoptimierungsschritten nicht mehr bestimmt, um die Analysezeit zu verkürzen und somit den Probendurchsatz zu erhöhen.

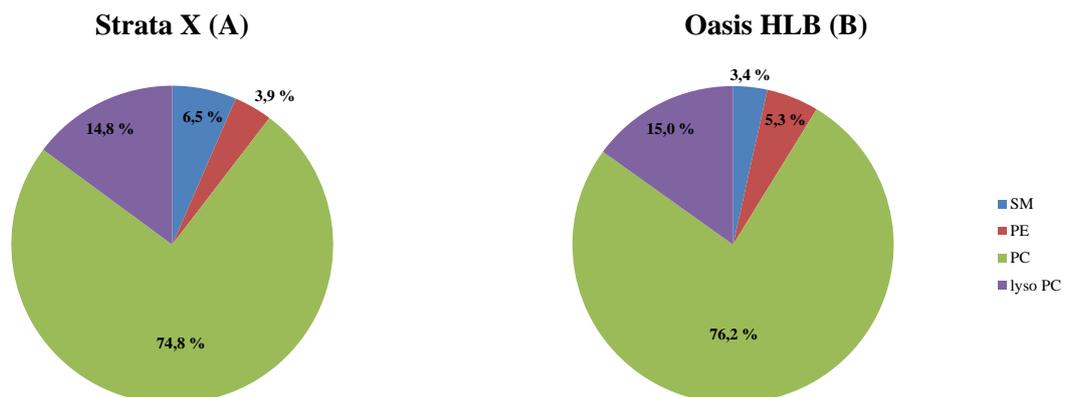


Abb. 4.13: Prozentuale Phospholipidzusammensetzung mit Strata X (A) und Oasis HLB (B) extrahierter Hühnerplasmaproben (SM: Sphingomyeline, PE: Phosphatidylethanolamine, PC: Phosphatidylcholine und Lyso PC: Lyso Phosphatidylcholine).

4.3.2 Phospholipidgehalt

Durch Summieren der Peakflächen jedes Massenüberganges einer Phospholipidklasse wurde deren Gesamtpeakfläche sowohl für mit Strata X als auch mit Oasis HLB extrahierter Hühnerplasmaproben ermittelt (Abb. 4.14). Dabei wird ersichtlich, dass die Peakflächen und somit der Phospholipidgehalt von PE, PC und Lyso PC für Oasis HLB Probenextrakte im Vergleich zu Strata X Probenextrakten nahezu doppelt so hoch sind. Lediglich der Gehalt an SM ist für beide Probenextrakte ähnlich. Des Weiteren verdeutlicht das Diagramm, dass die Peakflächen und Konzentrationen von PI, PS sowie PG im Vergleich zu den anderen Phospholipidklassen vernachlässigbar gering sind.

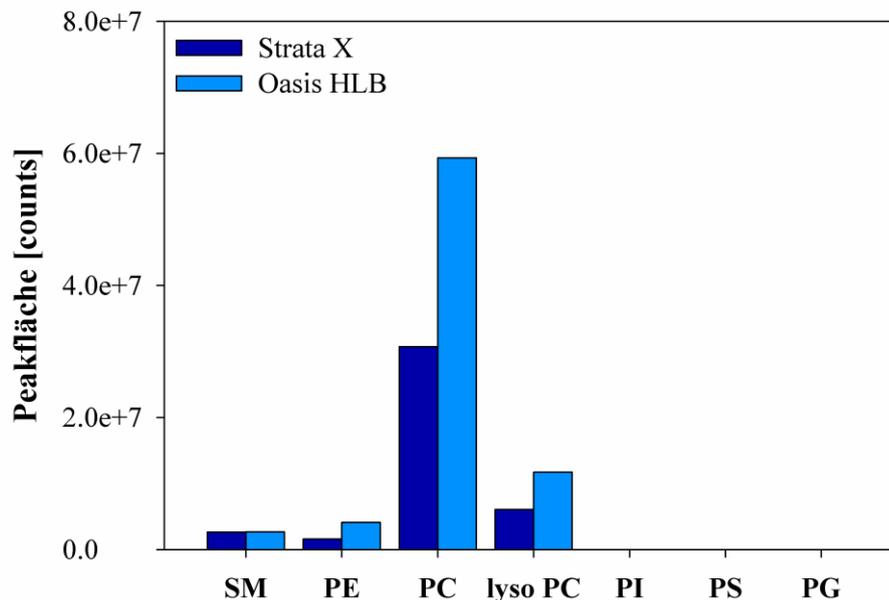


Abb. 4.14: Absolute Peakfläche der einzelnen Phospholipidklassen in mit Strata X und Oasis HLB extrahierten Hühnerplasmaproben (SM: Sphingomyeline, PE: Phosphatidylethanolamine, PC: Phosphatidylcholin, Lyso PC: Lyso Phosphatidylcholine, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserine und PG: Phosphatidylglycerine).

4.4 Bestimmung des quantitativen Matrixeffektes

Auf Grund des annähernd doppelt so hohen Gehaltes an Phospholipiden im Oasis HLB Probenextrakt ist zu vermuten, dass die Analytik der Fluorchinolone unter Verwendung dieser SPE-Säule stärker von Matrixeffekten beeinflusst wird. Diese Hypothese wurde durch die Bestimmung des quantitativen Matrixeffektes für zwei Analytkonzentrationen (0,01 ng/μL und 1 ng/μL) überprüft. Die Ergebnisse (Tab. 4.8) zeigen, dass die ermittelten Matrixeffekte für eine Konzentration von 0,01 ng/μL für Marbofloxacin und Ciprofloxacin ungefähr doppelt

so hoch sind unter Verwendung von Oasis HLB. Hingegen zeigt sich für Difloxacin eine Signalunterdrückung von ca. 10 % unter Verwendung von Strata X während mit Oasis HLB keine Matrixeffekte für diesen Analyten bestimmt wurden. Der Matrixeffekt für Enrofloxacin ist für beide SPE-Säulen ähnlich. Matrixeffekte, die für eine Konzentration von 1 ng/μL ermittelt wurden, sind für beide SPE-Säulen für Marbofloxacin, Ciprofloxacin und Enrofloxacin vernachlässigbar gering. Analog zu den Ergebnissen für 0,01 ng/μL weisen Oasis HLB Probenextrakte keine Matrixeffekte für Difloxacin auf, Strata X Extrakte jedoch eine Signalunterdrückung von ungefähr 7 %.

Tab. 4.8: Bestimmung des quantitativen Matrixeffektes (0,01 ng/μL und 1 ng/μL) für Oasis HLB und Strata X (MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

	Matrixeffekt 0,01 ng/μL [%]				Matrixeffekt 1 ng/μL [%]			
	MFX	CFX	EFX	DiFX	MFX	CFX	EFX	DiFX
Strata X	8,4	7,0	14,1	-7,8	0,0	-3,3	0,5	-7,3
Oasis HLB	14,3	20,1	17,2	0,2	0,0	0,6	1,6	-0,7

4.5 Post-column-Infusion

Auf Grund des geringeren Gesamtphospholipidgehaltes in mit Strata X extrahieren Leermatrixproben, wurde diese SPE-Phase für die weiteren Arbeiten verwendet. Mit Hilfe der Post-column-Infusion sollten die Bereiche im Chromatogramm identifiziert werden, die von Matrixeffekten betroffen sind. Des Weiteren sollten damit die Ergebnisse der Bestimmung des quantitativen Matrixeffektes überprüft werden.

Die Post-column-Infusionsprofile für Marbofloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin sowie Difloxacin für eine infundierte Analytkonzentration von 1 ng/μL sind in Abb. 4.15 dargestellt. Um die Bereiche im Chromatogramm zu identifizieren, die von Matrixeffekten betroffen sind, wurden die Signale von injiziertem Lösungsmittelblank (Methanol) und Leermatrix überlagert. Zusätzlich wurde in die Graphik ein Fluorchinolon-Chromatogramm (1 ng/μL) integriert, um beurteilen zu können, ob und welcher Analyt von Matrixeffekten beeinflusst wird. Für alle vier Analyten ist bei etwa 1,6 min ein Bereich der Signalunterdrückung vorhanden, der wahrscheinlich auf die Elution von polaren Verbindungen oder ionischen Verbindungen direkt nach der Injektion zurückzuführen ist. Im Elutionsbereich von Marbofloxacin, Ciprofloxacin und Enrofloxacin sind für die infundierte Konzentration – wie auch für weitere untersuchte Konzentrationen – keine Matrixeffekte zu erkennen. Jedoch wird die Bestimmung von Difloxacin von einem Bereich der Signalverstärkung beeinflusst. Es ist

davon auszugehen, dass die Signalverstärkung für Difloxacin nicht auf co-eluierende Phospholipide zurückzuführen ist, da diese vorwiegend zwischen 10,5 und 15 min eluieren (siehe 4.2.5). Dennoch sind im Elutionsbereich der Phospholipide Matrixeffekte in Form einer Signalverstärkung vorhanden.

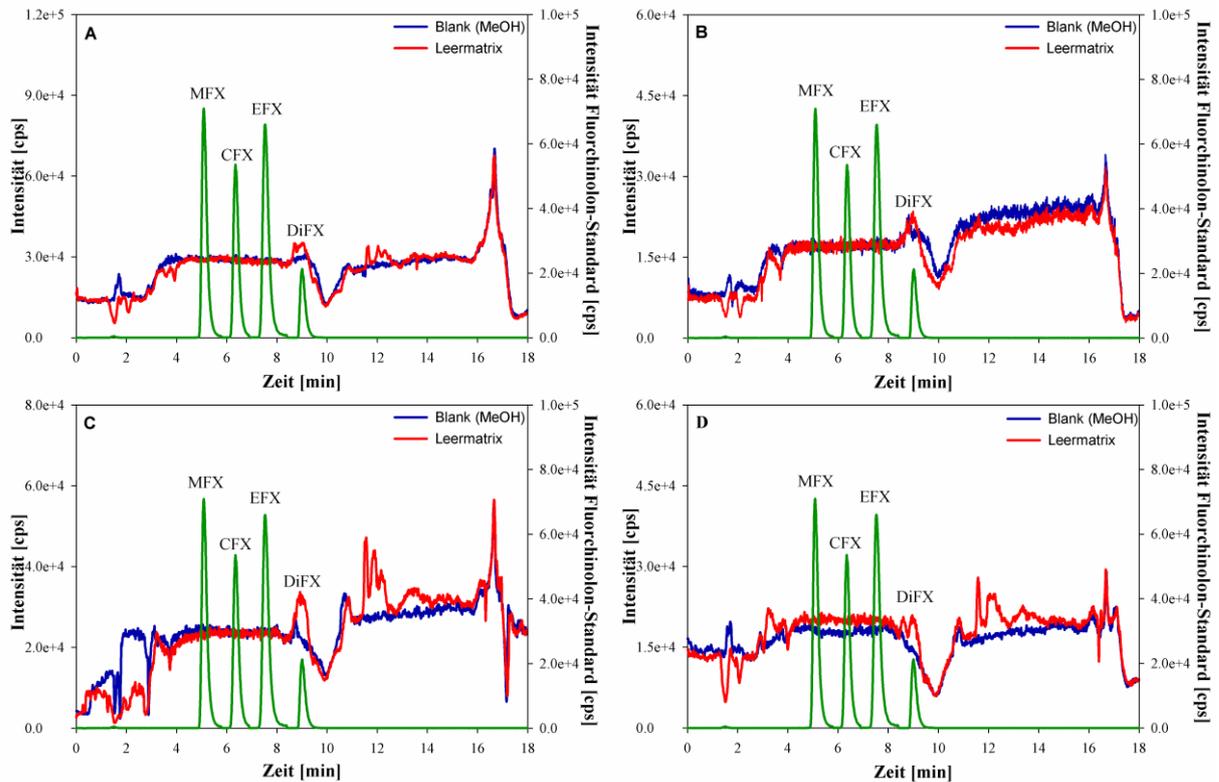


Abb. 4.15: Post-column-Infusionsprofile für Marbofloxacin (A), Ciprofloxacin (B), Enrofloxacin (C) und Difloxacin (D) bei Injektion einer mittels Strata X aufgearbeiteten Leermatrixprobe unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten (infundierte Analytkonzentration 1 ng/ μ L).

4.6 Methodenoptimierung

Die Analytik der Fluorchinolone wird zwar nicht durch co-eluierende Phospholipide beeinflusst, dennoch ist die Bestimmung von Difloxacin durch Matrixeffekte gestört. Daher sind weitere Methodenoptimierungen sowohl der chromatographischen Bedingungen als auch des SPE-Protokolls notwendig, um eine zuverlässige Analytik von Difloxacin ohne Matrixeffekte zu gewährleisten.

4.6.1 Chromatographische Bedingungen

Um Matrixeffekte zu verhindern ist die Trennung von Analyt und co-eluierenden Matrixkomponenten erforderlich. Für die Fluorchinolone und Phospholipide ist dieses Ziel erreicht.

Dennoch scheinen andere störende Matrixbestandteile die Analytik von Difloxacin zu beeinflussen. Daher wurde der HPLC-Gradient modifiziert sowie ein Säulenspülschritt mit einer erhöhten Flussrate in die HPLC-Methode integriert. Des Weiteren wurde die Verschleppung von Phospholipiden in nachfolgende HPLC-Messungen untersucht, da hierdurch unspezifische Matrixeffekte auftreten können.

Die Erhöhung des organischen Anteils (Methanol) auf 95 % nach der Analyttrennung ist geeignet, um unpolare Substanzen von der Säule zu eluieren. Wie erwartet haben isokratische Untersuchungen mit 95 % Methanol gezeigt, dass die Phospholipidelution um den Faktor drei beschleunigt werden kann, wenn die Flussrate des Spülschrittes von 0,2 ml/min auf 0,6 mL erhöht wird. Daher wurde in die HPLC-Methode ein dreiminütiger Spülschritt mit 95 % Methanol und einer Flussrate von 0,6 mL/min integriert, bevor die Säule auf die Anfangsbedingungen äquilibriert wird.

Die Verschleppung von Phospholipiden unter Verwendung des modifizierten Gradienten beträgt für die erste Injektion eines Lösungsmittelblanks im Vergleich zu den zuvor gemessenen Leermatrixproben: 2,6 % für PC, 1,2 % für Lyso PC, 0,4 % für SM und 0,0 % für PE (Abb. 4.16). Mit steigender Anzahl an Lösungsmittelblanks nimmt die Verschleppung ab und beträgt für alle Phospholipidklassen ab der zweiten Injektion weniger als 1 % und ist somit vernachlässigbar.

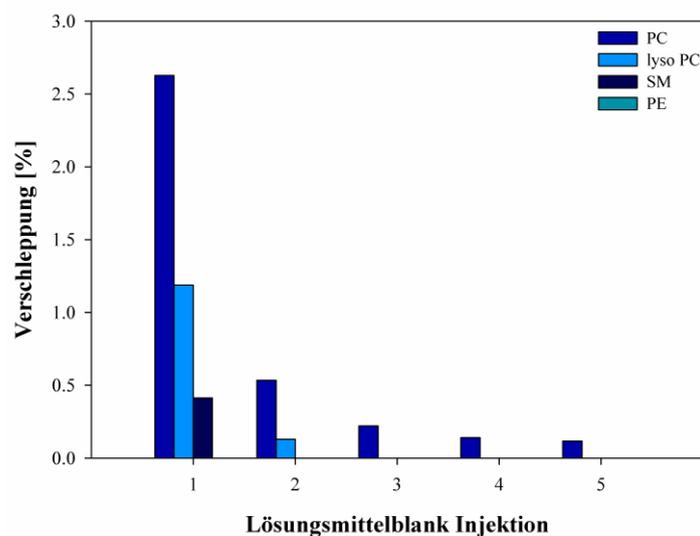


Abb. 4.16: Prozentuale Verschleppung von Phospholipiden in nachfolgende HPLC-Messungen (PC: Phosphatidylcholin, Lyso PC: Lyso Phosphatidylcholine SM: Sphingomyeline, PE: Phosphatidylethanolamine).

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine unspezifische Verschleppung der Phospholipide stattfindet, indem die Retentionszeiten der einzelnen Phospholipide sowohl in den Leermatrixmessungen als auch in den Lösungsmittelblanks (falls Massenübergänge detektierbar) miteinander verglichen wurden. Dabei konnten keine Retentionszeitverschiebungen festgestellt werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine unspezifische Verschleppung der Phospholipide in nachfolgende Messungen stattfindet. Somit ist die Injektion eines Lösungsmittelblanks (Methanol) ausreichend, um die Verschleppung und Akkumulation von Phospholipiden zu vermeiden. Fünf nacheinander analysierte extrahierte Leermatrixproben wiesen nahezu konstante Peakflächen für alle bestimmten Phospholipidklassen auf (Abb. 4.17). Somit kann auch eine Akkumulation dieser Substanzen ausgeschlossen werden.

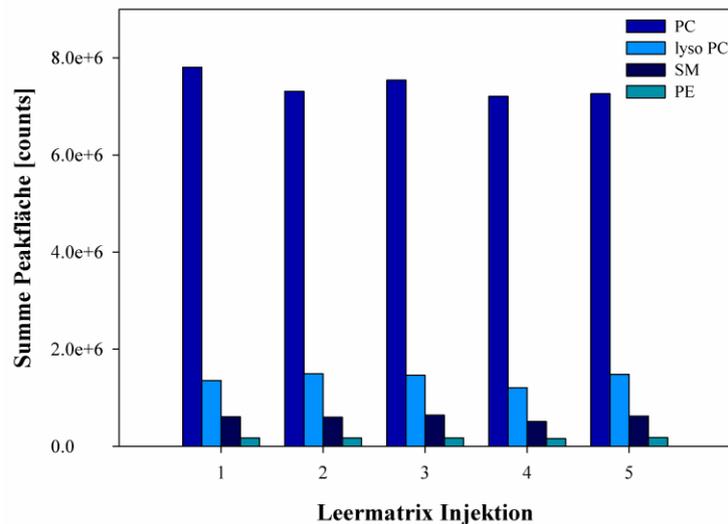


Abb. 4.17: Peakflächen für Phosphatidylcholine (PC), Lyso Phosphatidylcholine (Lyso PC), Sphingomyeline (SM) Phosphatidylethanolamine (PE) von fünf nacheinander folgenden Leermatrixinjektionen (angegeben als Summe der Massenübergänge jeder Phospholipidklasse).

4.6.2 Festphasenextraktion

Im Rahmen der Methodenoptimierung des SPE-Protokolls wurde zum einem überprüft, ob Phospholipide im Probenextrakt durch die Integration eines geeigneten Waschschrittes minimiert werden können und zum anderen wurde der Einfluss es Elutionsmittels auf den Phospholipidgehalt im Probenextrakt untersucht.

Sequentielle Elution

Neben der Auswahl des Eluenten mit der geringsten Elutionskraft für Phospholipide wurde versucht, deren Gehalt im Probenextrakt durch die Integration eines geeigneten Waschschrittes in die Methode zu minimieren. Die sequentielle Elution wurde wie in 3.3.1 beschrieben durchgeführt. Neben den Fluorchinolonen wurde zusätzlich der Phospholipidgehalt in jedem Waschschritt bestimmt (Abb. 4.18). Der Hauptanteil der PC, Lyso PC, SM und PE eluiert unter Verwendung von 80 % Methanol. Jedoch eluiert bereits ein kleiner Anteil an PC, SM und PE mit 10 % Methanol. Durch die Anwendung eines Waschschrittes mit 40 % Methanol können somit 27 % PC, 27 % SM und 34 % PE ohne Analytverlust entfernt werden. Lyso PC können im Probenextrakt mit diesem Waschschritt nicht minimiert werden, da diese erst mit einem Methanolanteil von 80 % eluieren.

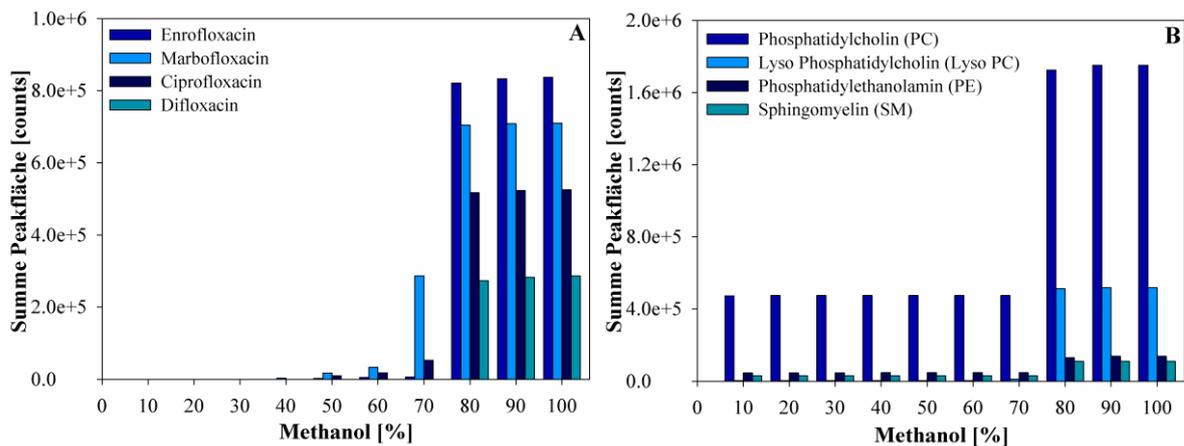


Abb. 4.18: Sequentielle Elution für Fluorchinolone (A) und Phospholipide (B) für Strata X.

Elutionsmittel

Verschiedene Elutionsmittel wurden hinsichtlich eines minimalen Phospholipidgehaltes im Probenextrakt untersucht (Tab. 4.9). Unter Verwendung von Acetonitril sowie angesäuerten Elutionsmitteln erhöht sich die Phospholipidelution im Vergleich zu Methanol. So ist bei Verwendung von Acetonitril der Phospholipidgehalt um den Faktor vier erhöht und bei angesäuertem Acetonitril bzw. Methanol um den Faktor 12,7 sowie 11,4. Daher wurde für weitere Untersuchungen Methanol als Elutionsmittel verwendet.

Tab. 4.9: Phospholipidgehalt im Probenextrakt unter Verwendung verschiedener Elutionsmittel
 (Die Peakfläche jeder Phospholipidklasse ist als Summe der einzelnen Massenübergänge angegeben. ACN: Acetonitril, AS: Ameisensäure, MeOH: Methanol, PC: Phosphatidylcholine, Lyso PC: Lyso Phosphatidylcholine, SM: Sphingomyeline, PE: Phosphatidylethanolamine)

Eluent	Peakfläche [counts]					Relativer Phospholipidgehalt [%]
	PC	Lyso PC	SM	PE	Summe	
ACN	749766	516153	54306	10039	1330265	29,0
2 % AS in ACN	3595441	565053	234294	187973	4582762	100,0
MeOH	24150	322644	11346	2487	360628	7,9
2 % AS in MeOH	3284785	398741	276320	170428	4130274	90,0

4.7 Konzentrationsabhängigkeit von Matrixeffekten

Die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit von Matrixeffekten ist wichtig, da ansonsten u. a. die Linearität einer analytischen Methode beeinflusst werden kann. Wie in 4.5 beschrieben wurde für Difloxacin ein Matrixeffekt mittels Post-column-Infusionsexperimenten ermittelt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass im Elutionsbereich der Phospholipide (10,5 - 15 min) Matrixeffekte auftreten. Daher kann dieser Bereich anhand von Difloxacin als Beispielsubstanz zur Demonstration der Konzentrationsabhängigkeit von Matrixeffekten verwendet werden. Dazu wurden Post-column-Infusionsprofile von drei unterschiedlichen Difloxacin-Konzentrationen (0,1 ng/μL, 1 ng/μL und 10 ng/μL) für die Injektion einer mittels der ursprünglichen Strata X-Methode extrahierten Leematrixprobe aufgenommen. Die Signalverstärkung im Elutionsbereich der Phospholipide nimmt mit steigender Analytkonzentration ab (Abb. 4.19). Das bedeutet, dass niedrige Analytkonzentrationen stärker von Matrixeffekten betroffen sind als hohe Analytkonzentrationen. So nimmt z. B. die Signalverstärkung bei 11,6 min mit steigender Analytkonzentration von 102 % auf 10 % ab. Würde Difloxacin in diesem Bereich eluieren, so wäre die Bestimmung von Konzentrationen zwischen 0,1 - 1 ng/μL deutlich von Matrixeffekten beeinflusst.

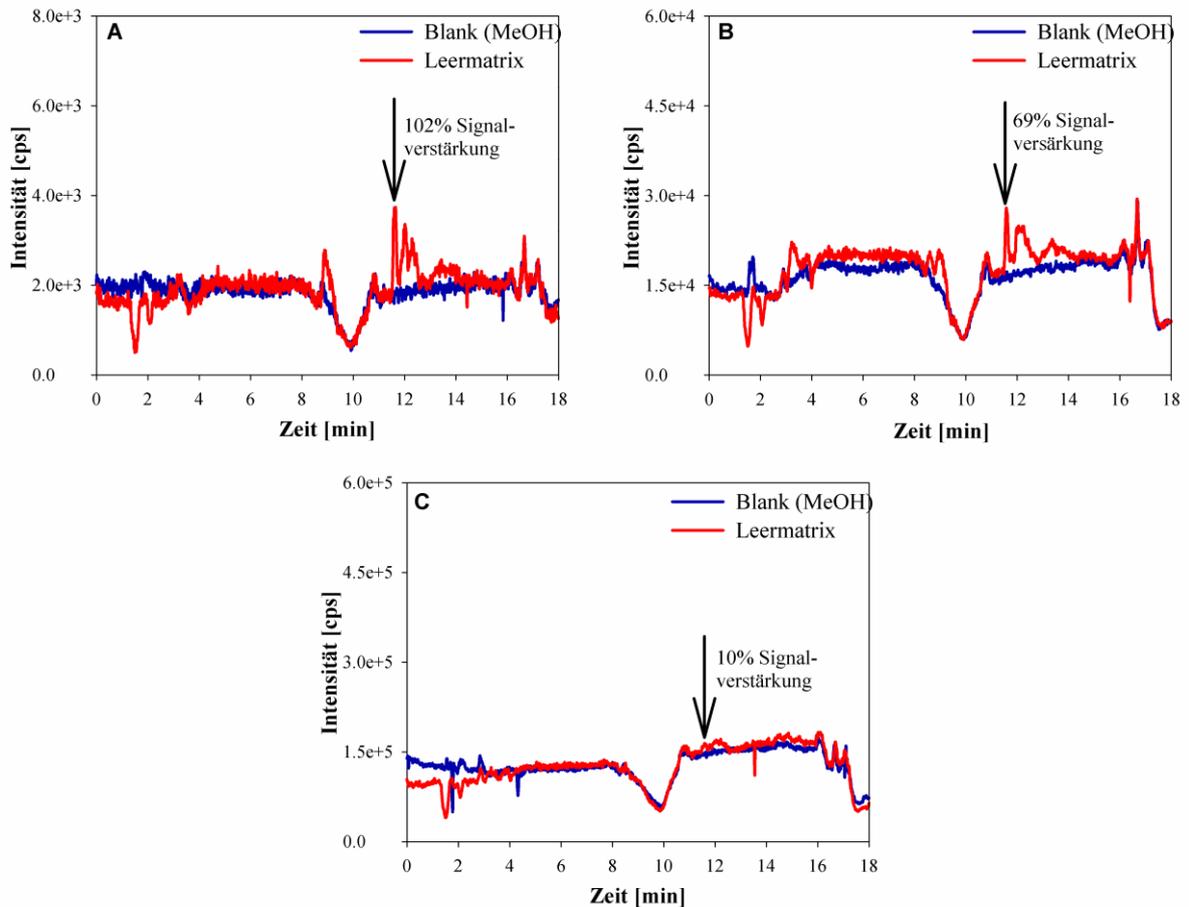


Abb. 4.19: Konzentrationsabhängigkeit von Matrixeffekten am Beispiel von Post-column-Infusionsprofilen für infundierte Difloxacin-Konzentrationen von 0,1 ng/μL (A), 1 ng/μL (B) sowie 10 ng/μL (C) bei Injektion einer mittels der ursprünglichen Strata X-Methode aufbereiteten Leermatrixprobe (Elutionsbereich der Phospholipide zwischen 10,5 und 13 min).

4.8 Vergleich der SPE-Phasen Strata X und Oasis MAX/MCX

Auf Grund der nicht zufriedenstellenden Ergebnisse hinsichtlich der Matrixeffekte, die mit der Strata X SPE-Säule erzielt wurden, wurde parallel zur Methodenoptimierung dieser Säule nach weiteren Möglichkeiten gesucht, Phospholipide im Probenextrakt und damit verbundene Matrixeffekte zu minimieren. Eine Alternative scheint dabei die Kombination aus einem Mixed-Mode-Anionenaustauscher (Oasis MAX) und Mixed-Mode-Kationenaustauscher (Oasis MCX) zu sein. Im Folgenden werden beide SPE-Methoden bezüglich der Analytwiederfindung, dem Phospholipidgehalt im Probenextrakt sowie Matrixeffekten miteinander verglichen.

4.8.1 Phospholipidgehalt und Analytwiederfindung

Die Analytwiederfindungen sowie der Gesamtphospholipidgehalt für beide SPE-Methoden sind in Tab. 4.10 zusammengefasst. Bis auf Ciprofloxacin sind die Wiederfindungen für alle Analyten unter Verwendung der Kombination aus Oasis MAX/MCX im Vergleich zu Strata X deutlich höher (~ 6 - 13 %). Durch die Verwendung der Kombination aus Mixed-Mode-Ionenaustauschern kann zudem der Phospholipidgehalt im Probenextrakt um einen Faktor > 30 minimiert werden.

Tab. 4.10: Vergleich von Strata X mit der Kombination aus Ionenaustauschern bezüglich der Analytwiederfindung und dem Phospholipidgehalt in Probenextrakt.

SPE-Kartusche	Wiederfindung [%]				Summe Phospholipid-Peakfläche [counts]	Relativer Phospholipidgehalt [%]
	MFX	CFX	EFX	DiFX		
Strata X	82,1	80,8	90,0	74,5	360628	100,0
MAX/MCX	88,0	73,9	97,1	87,8	11399	3,2

4.8.2 Post-column-Infusion

Die Post-column-Infusionsprofile für Marbofloxacin und Difloxacin für eine mittels Strata X nach der Methodenoptimierung extrahierten Leermatrixprobe sind in Abb. 4.20 dargestellt. Durch die Methodenoptimierung konnten die Matrixeffekte im Elutionsbereich von Difloxacin eliminiert werden. Jedoch wird nun die Analytik von Marbofloxacin durch eine starke Signalunterdrückung beeinflusst. Daher kann diese Methode ohne Kompensation der Matrixeffekte nicht für eine zuverlässige Bestimmung von Marbofloxacin verwendet werden. Wie bereits für die ursprüngliche Methode beschrieben, wird die Signalunterdrückung von Marbofloxacin nicht durch co-eluierende Phospholipide verursacht, da diese erst zwischen 7,9 und 9,0 eluieren (auf Grund der Optimierung der chromatographischen Bedingungen). Dennoch sind in diesem Bereich analog zur ursprünglichen Methode Matrixeffekte vorhanden.

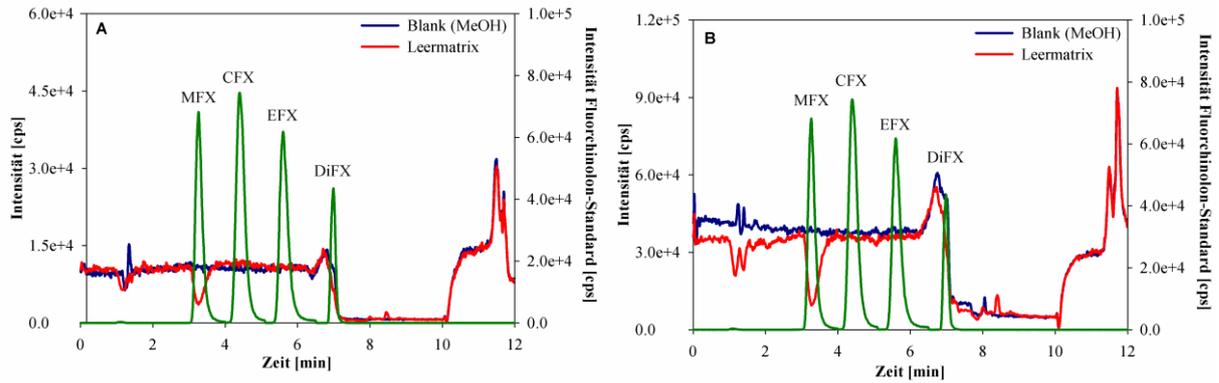


Abb. 4.20: Post-column-Infusionsprofile für Marbofloxacin (A) und Difloxacin (B) nach Injektion einer mittels der optimierten Strata X Methode aufgearbeiteten Leermatrixprobe unter Verwendung des modifizierten HPLC-Gradienten (infundierte Analytkonzentration 1 ng/ μ L).

Analog zur Strata X wurden für die Kombination aus Oasis MAX/Oasis MCX ebenfalls die Post-column-Infusionsprofile für Marbofloxacin und Difloxacin verwendet, um zu demonstrieren, ob ihre Analytik von Matrixeffekten beeinflusst wird. Für beide Analyten zeigen die Post-column-Infusionsprofile (Abb. 4.21) nach Injektion einer mittels Oasis MAX/Oasis MCX extrahierten Leermatrixprobe lediglich eine Signalunterdrückung bei Minute eins, die auf die Elution von nicht-retardierten polaren Verbindungen oder ionischen Verbindungen zurückzuführen sein könnte. Andere Bereich im Chromatogramm werden durch Matrixeffekte nicht beeinflusst. Ebenso sind im Bereich der Phospholipide (7,9 - 9,0 min) keine Matrixeffekte vorhanden. Daher ist davon auszugehen, dass die Kombination aus Oasis MAX/Oasis MCX eine zuverlässige Bestimmung aller Fluorchinolone im untersuchten Konzentrationsbereich ermöglicht.

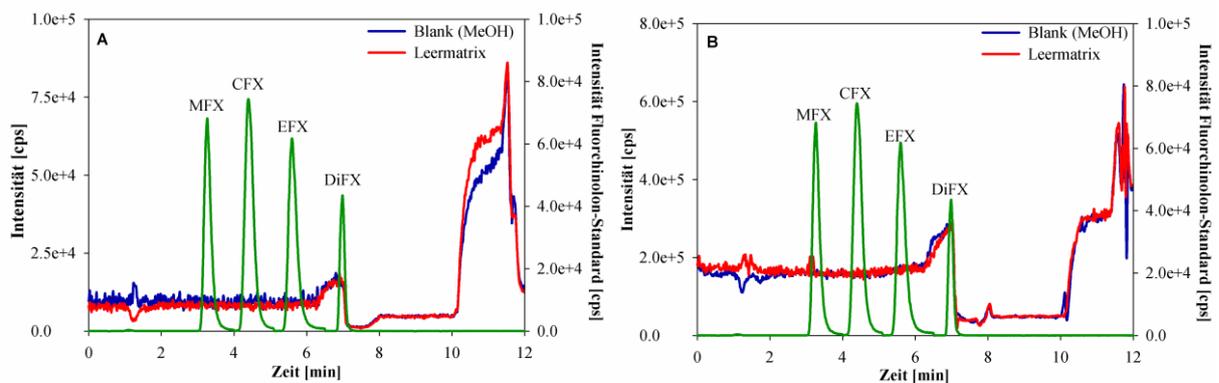


Abb. 4.21: Post-column-Infusionsprofile für Marbofloxacin (A) und Difloxacin (B) nach Injektion einer mittels der Kombination aus Oasis MAX/Oasis MCX aufgearbeiteten Leermatrixprobe unter Verwendung des modifizierten HPLC-Gradienten (infundierte Analytkonzentration 1 ng/ μ L).

5. Methodenentwicklung Hühnerfaeces

5.1 Allgemeines

Zwei verschiedene Probenvorbereitungsmethoden zur Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces wurden getestet: die Flüssig-Flüssig-Extraktion sowie die Mikrowellenextraktion. Das Ziel hierbei war zunächst eine möglichst hohe Analytwiederfindung zu erreichen, um eine quantitative Extraktion gewährleisten zu können

5.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

5.2.1 Allgemeines Vorgehen

Für die Methodenentwicklung einer Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces wurden verschiedene Methodenparameter wie Lösungsmittel, Puffer, Komplexbildner, pH-Wert, Lösungsmittelvolumen, Anzahl der Extraktionszyklen, Extraktionszeit, Extraktionstemperatur und Probemenge getestet sowie optimiert.

5.2.2 Einfluss verschiedener Lösungsmittel

Für die Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden folgende Lösungsmittel mit unterschiedlicher Polarität getestet: Aceton, Acetonitril, Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, Ethylacetat, Isopropanol, Methanol und Methyl-*tert*-butylether (MTBE). Diese Lösungsmittel wurden zunächst ohne pH-Werteinstellung bezüglich einer effizienten Fluorchinolonextraktion getestet (Abb. 5.1). Die Ergebnisse für die einzelnen Lösungsmittel können in drei Gruppen eingeteilt werden. Mit Diethylether, Ethylacetat und Methyl-*tert*-butylether werden die niedrigsten Wiederfindungen (< 5 %) für Marbofloxacin, Ciprofloxacin und Enrofloxacin erzielt. Die Wiederfindung für Difloxacin (~ 10 - 15 %) ist vergleichbar mit der zweiten Lösungsmittelgruppe zu der Aceton, Acetonitril, Isopropanol und Methanol zählen. Für Marbofloxacin, Ciprofloxacin und Enrofloxacin konnten die Wiederfindungen unter Verwendung dieser Lösungsmittel gesteigert werden, liegen jedoch immer noch in einem Bereich, der für eine quantitative Extraktion nicht zufriedenstellend ist (< 30 %). Hingegen konnten mit Dichlormethan und Chloroform als Extraktionsmittel für alle Analyten die besten Wiederfindungen erreicht werden. Die Wiederfindung für Ciprofloxacin ist mit < 15 % sehr gering. Daher wurde durch die Verwendung von Puffern, Komplexbildnern und durch eine

pH-Werteinstellung versucht, die Wiederfindung zu steigern. Für die weiteren Optimierungsschritte wurde Dichlormethan als Extraktionsmittel eingesetzt.

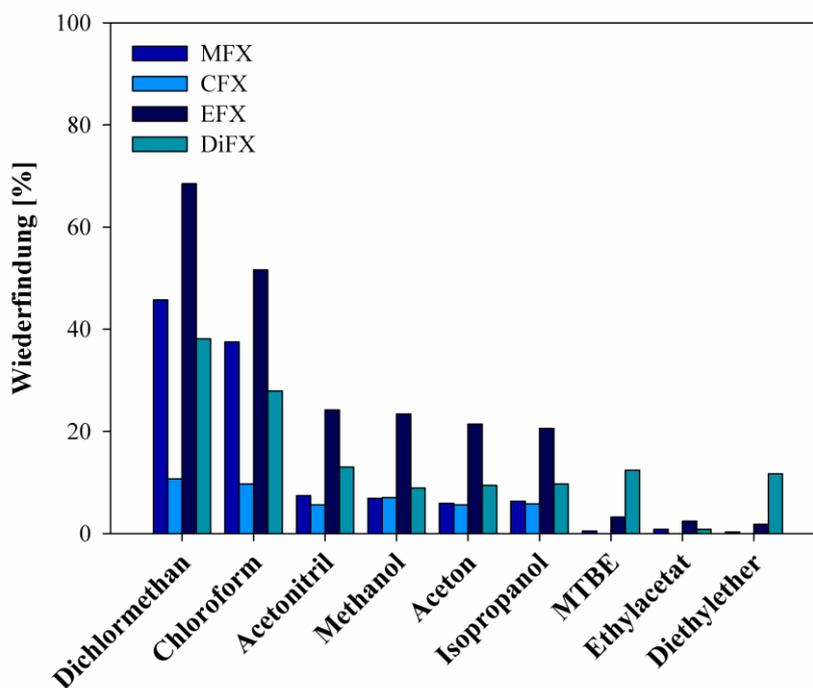


Abb. 5.1: Vergleich verschiedener Lösungsmittel zur Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces (MTBE: Methyl-*tert*-butyleter, MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

5.2.3 Einfluss von Puffern, Komplexbildnern und pH-Werteinstellung

Auf Grund der Amphoterie der Fluorchinolone sowie der starken Sorption an Matrixbestandteile sind die Verwendung von Puffern, Komplexbildnern und eine pH-Werteinstellung für die Extraktion notwendig. Hierzu wurden Ammoniumacetat-Puffer, Citratpuffer, Mc-Ilvaine-Puffer und EDTA getestet. Der pH-Wert der Pufferlösungen variierte von stark sauer bis stark alkalisch. Zusätzlich wurden verschiedene Pufferkonzentrationen überprüft.

Hierbei konnten unter Verwendung von Mc-Ilvaine-Puffer pH 7,0 oder 0,1 M EDTA pH 7,0 die besten Analytwiederfindungen erzielt werden (Abb. 5.2). Des Weiteren wurden Ameisensäure, Phosphorsäure sowie Ammoniak als Extraktionsmittelzusatz getestet. Jedoch konnte dadurch die Analytwiederfindung nicht gesteigert werden und es wurden deutlich mehr störende Matrixkomponenten extrahiert (dunkle Farbe des Probenextrakts sowie erhöhte Anzahl an Matrixpeaks in den UV-Chromatogrammen).

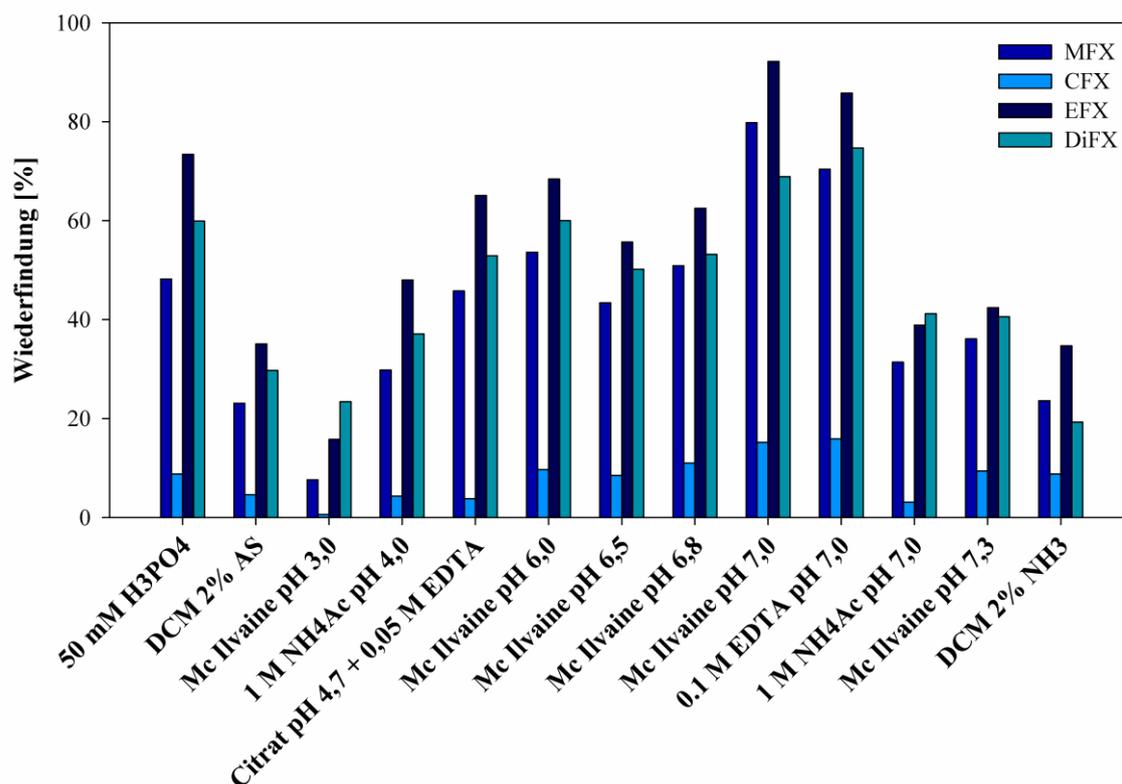


Abb. 5.2: Vergleich verschiedener Puffer, pH-Werte, Komplexbildner sowie Säure-/Basenzusätze zur Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces (AS: Ameisensäure, DCM: Dichlormethan, NH₄Ac: Ammoniumacetat, MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

Jedoch ist die Wiederfindung für Ciprofloxacin mit ca. 15 % immer noch viel zu niedrig. Daher wurden verschiedene EDTA-Konzentrationen (0,1 M; 0,5 M und 1,0 M) und pH-Werte mit dem Ziel, die Analytwiederfindung – insbesondere für Ciprofloxacin – zu steigern, getestet (Abb. 5.3). Die Ciprofloxacinwiederfindung kann mit zunehmender EDTA-Konzentration nahezu verdreifacht werden. Jedoch sinken die Wiederfindungen von Marbofloxacin, Enrofloxacin und Difloxacin. Als Kompromiss wurde die Verwendung von 2 mL 0,5 M EDTA pH 7,0 gewählt und somit die Wiederfindung für Ciprofloxacin immerhin verdoppelt. Durch die Modifikation weiterer Methodenparameter sollte die Ciprofloxacinwiederfindung weiter verbessert werden.

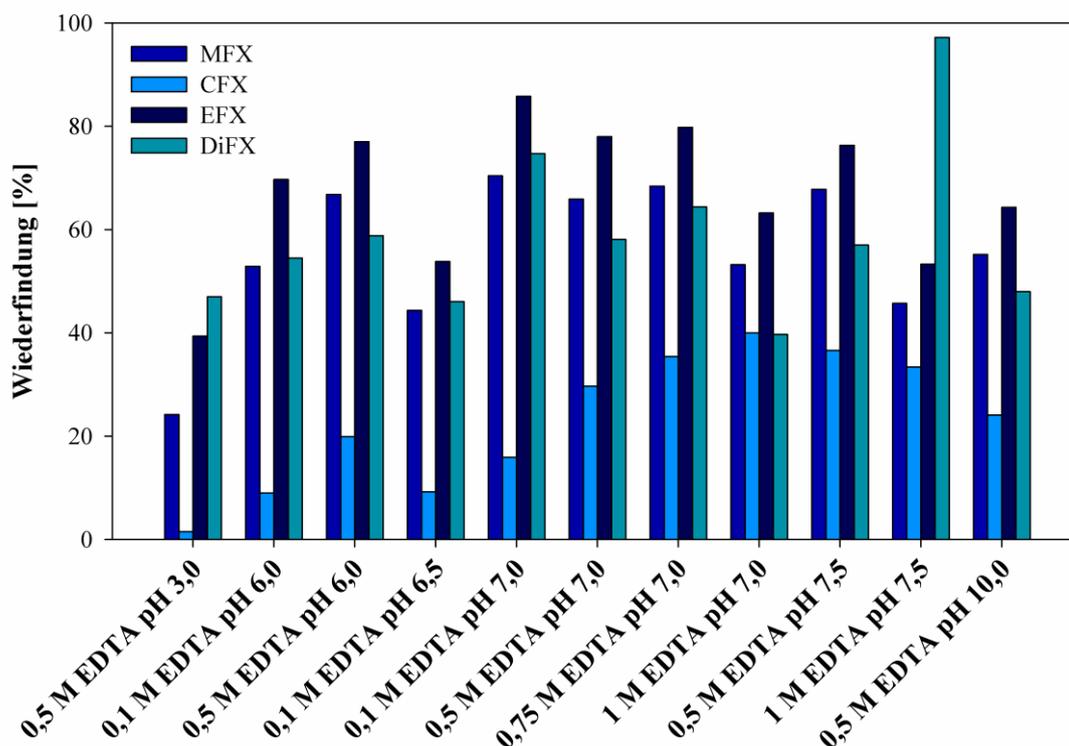


Abb. 5.3: Vergleich verschiedener EDTA-Konzentrationen sowie pH-Werte zur Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces (MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

5.2.4 Einfluss von Lösungsmittelvolumen und Anzahl der Extraktionszyklen

Zu Beginn der Methodenentwicklung wurde ein Extraktionsvolumen von 5 mL mit drei Extraktionszyklen verwendet. Jedoch war die Wiederfindung für Ciprofloxacin (< 40 %) immer noch nicht ausreichend. Daher wurde versucht, durch die Erhöhung der Zahl an Extraktionszyklen die Wiederfindung für Ciprofloxacin zu steigern. Dafür wurden verschiedene Lösungsmittelvolumina (5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL und 40 mL) in Kombination mit einer unterschiedlichen Anzahl an Extraktionszyklen (eins bis sechs) untersucht. Durch die Anwendung von sechs Extraktionszyklen konnte die Wiederfindung um 16 % (im Vergleich zu drei Extraktionszyklen) erhöht werden (Abb. 5.4). Jedoch scheint die Extraktion noch nicht beendet zu sein, da die kumulierte Wiederfindung mit jedem Extraktionsschritt ansteigt. Die Wiederfindungen für Marbofloxacin, Enrofloxacin und Difloxacin können durch die Verwendung von drei zusätzlichen Extraktionszyklen nicht weiter gesteigert werden. Zudem ist die Verwendung von sechs Extraktionszyklen sehr zeitaufwändig und daher nicht praktikabel. Jedoch nehmen die Wiederfindungen aller Analyten deutlich von 3 x 7 mL, 3 x 10 mL bis 3 x 15 mL zu (Abb. 5.5). Daher wurde versucht, die Anzahl der Extraktions-

zyklen durch die Erhöhung des Extraktionsvolumens zu minimieren. Analytwiederfindungen konnten durch die Verwendung eines Extraktionszyklus mit 20 mL bzw. 40 mL nicht gesteigert werden. Daher wurde ein Kompromiss zwischen akzeptabler Analytwiederfindung und hohem Probendurchsatz unter Verwendung von 15 mL Dichlormethan als Extraktionsvolumen sowie drei Extraktionszyklen gefunden.

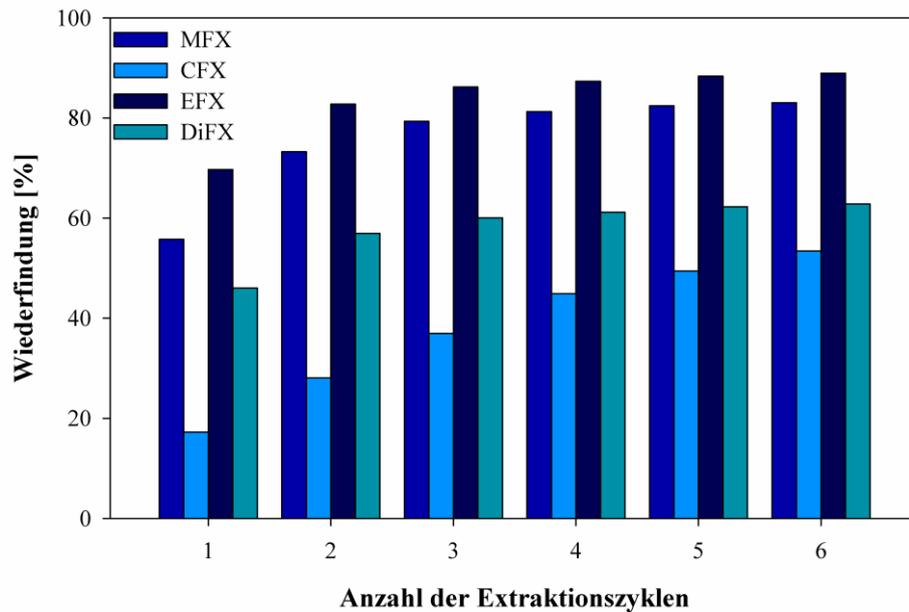


Abb. 5.4: Untersuchungen zur Anzahl der Extraktionszyklen für die Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces (dargestellt als kumulierte Wiederfindung, MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

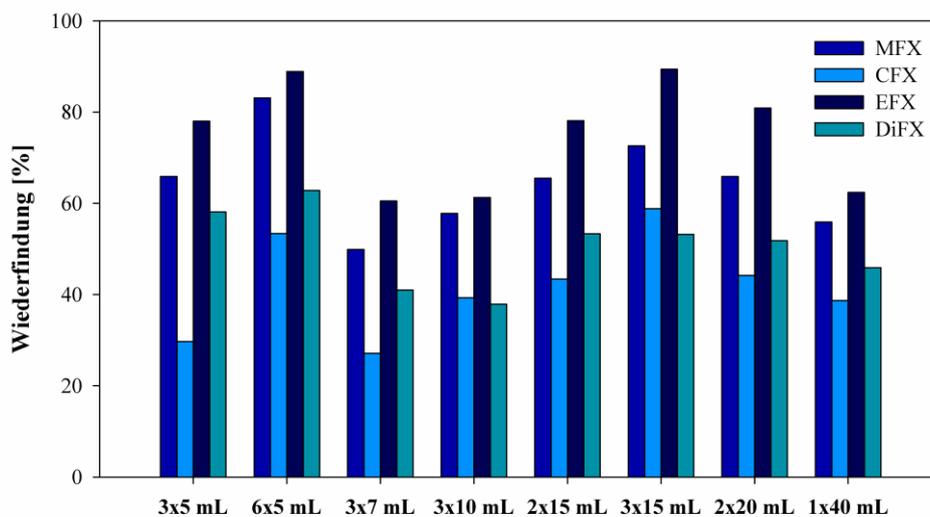


Abb. 5.5: Einfluss des Extraktionsvolumens sowie Anzahl der Extraktionszyklen auf die Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces (MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

5.2.5 Einfluss der Extraktionszeit

Der Einfluss der Extraktionszeit wurde anhand eines Extraktionszyklus für 5 min, 10 min, 15 min, 30 min sowie 60 min untersucht. Die optimale Extraktionszeit für alle Analyten liegt zwischen 10 und 15 min (Abb. 5.6). Anschließend nimmt die Analytwiederfindung mit erhöhter Extraktionszeit – bis zu 50 % für Ciprofloxacin – ab. Um den Probendurchsatz zu steigern wurde daher eine Extraktionszeit von 10 min pro Zyklus gewählt.

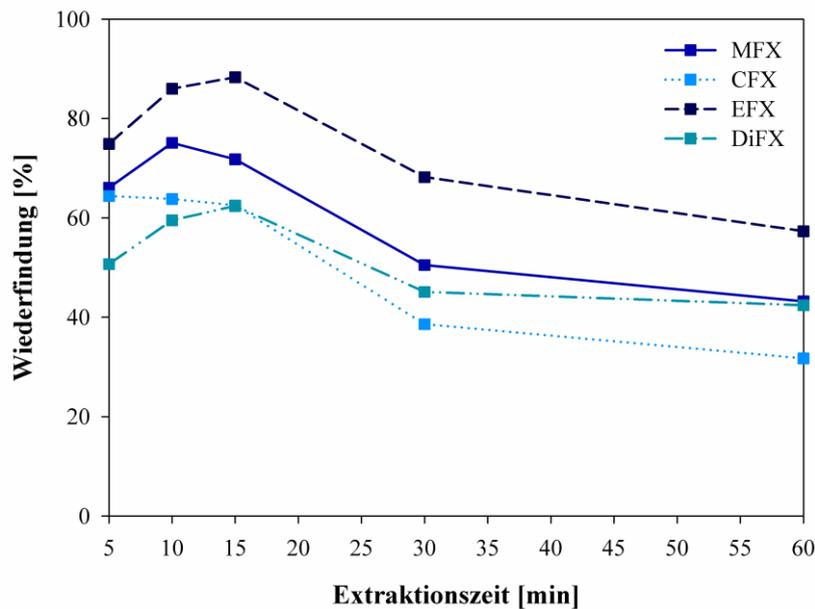


Abb. 5.6: Einfluss der Extraktionszeit auf die Analytwiederfindung bei der Extraktion von Fluorochinolonen in Hühnerfaeces (MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

5.2.6 Einfluss der Probemenge

Anhand verschiedener Probemengen (100, 350, 500, 700, 800, 900 und 1000 mg) wurde überprüft, ob die Extraktion abhängig von der eingesetzten Probemenge ist. Bis zu einer Probemenge von 700 mg nehmen die Analytwiederfindungen zu (Abb. 5.7). Unter Verwendung höherer Probemengen nimmt die Wiederfindung – mit Ausnahme von Marbofloxacin – leicht ab. Dennoch wurde auf Grund einer möglichen Inhomogenität des Probenmaterials (Wirkstoffverteilung in Hühnerfaeces) eine Probemenge von 1000 mg eingesetzt.

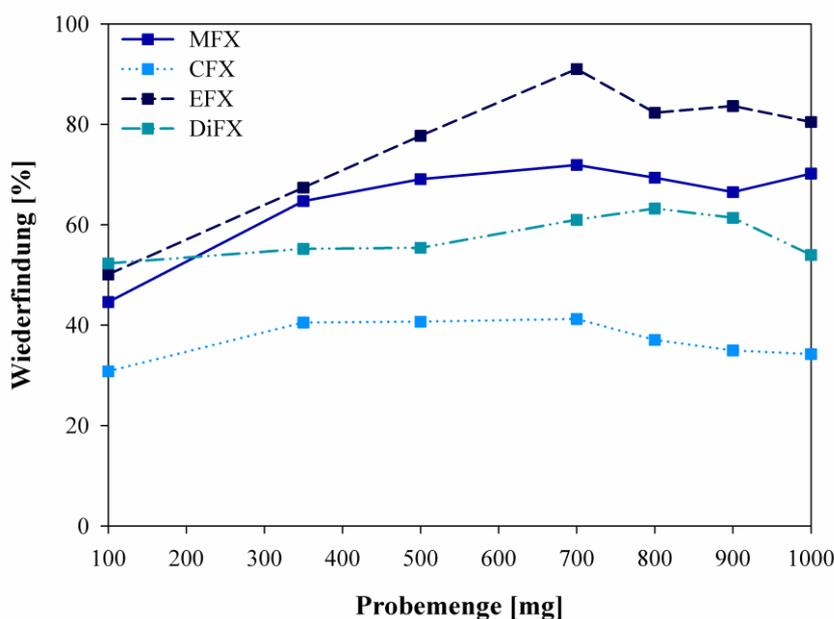


Abb. 5.7: Einfluss der Probemenge auf die Analytwiederfindung bei der Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces (MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

Für die Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion hat sich ein Extraktionsvolumen von 3 x 15 mL Dichlormethan, die Verwendung von 0,5 M EDTA pH 7,0, eine Extraktionszeit von 10 min sowie eine eingesetzte Probemenge von 1 g als optimal erwiesen.

5.3 Mikrowellenextraktion

5.3.1 Allgemeines Vorgehen

Die mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion erzielten Wiederfindungen sind für Ciprofloxacin sowie Difloxacin (< 60 %) nicht zufriedenstellend. Daher wurde versucht, ihre Wiederfindungen durch den Einsatz einer Mikrowellenextraktion zu erhöhen. Im Vergleich zur Flüssig-Flüssig-Extraktion ist durch die erhöhte Extraktionstemperatur eine bessere Extraktionskinetik zu erwarten. Somit könnte die Extraktionszeit verkürzt werden und der Probendurchsatz gesteigert werden, da nur noch ein Extraktionszyklus benötigt werden würde. Zusätzlich wäre dadurch eine Reduktion des Lösungsmittelverbrauches möglich.

Im Rahmen der Methodenentwicklung für Hühnerfaeces wurde eine Mikrowellenextraktion sowohl mit organischen Lösungsmitteln als auch mit wässrigen Lösungen getestet. Hierzu wurde 1 g Hühnerfaeces in ein Mikrowellenaufschlussgefäß eingewogen, die Probe mit 50 µL

eines Mischstandards (10 ng/ μ L) dotiert (\pm 500 μ g/kg) und 10 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde das Extraktionsmittel hinzugefügt und die Mikrowellenextraktion gestartet.

5.3.2 Organische Lösungsmittel

Als organische Extraktionsmittel wurden Acetonitril und 2 % Ameisensäure in Acetonitril verwendet. Des Weiteren wurde der Zusatz von Mc-Ilvaine-Puffer (pH 7,0) untersucht. Das Mikrowellenprogramm umfasste folgende Schritte:

- Aufheizen auf 60 °C innerhalb von 5 min
- 60 °C für 10 min halten
- 10 min abkühlen

Nach der Extraktion wurden die Extrakte am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und anschließend in 500 μ L 0,5 % Ameisensäure in 1 mM Ammoniumacetat (Eluent A)/Methanol (Eluent B) (1:1, v:v) aufgenommen. Um Schwebstoffe und Partikel zu entfernen, wurde das Probenextrakt bei 13900 g für 10 min bei 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein HPLC-Vial überführt und 2 μ L zur HPLC-ESI-MS/MS-Analytik eingesetzt.

Die besten Wiederfindungen wurden unter Verwendung von ACN mit 2 % Ameisensäure erzielt (Abb. 5.8). Jedoch liegen diese für alle Analyten deutlich unter 50 %, so dass mindestens ein weiterer Extraktionszyklus notwendig wäre, um Wiederfindungen > 50 % zu erreichen. Dies würde aber im Vergleich zur Flüssig-Flüssig-Extraktion keine Vorteile bringen. Ein weiterer Nachteil ist, wie bereits für den Zusatz von Säuren bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion beschrieben, die erhöhte Extraktion von störenden Matrixkomponenten. Eine Erhöhung des Extraktionsvolumens > 20 mL ist wegen der beschränkten Kapazität der verwendeten Aufschlussgefäße nicht möglich. Des Weiteren können auf Grund der Spezifikation des eingesetzten Temperatursensors keine weiteren organischen Lösungsmittel sowie die Erhöhung der Extraktionstemperatur in Betracht gezogen werden.

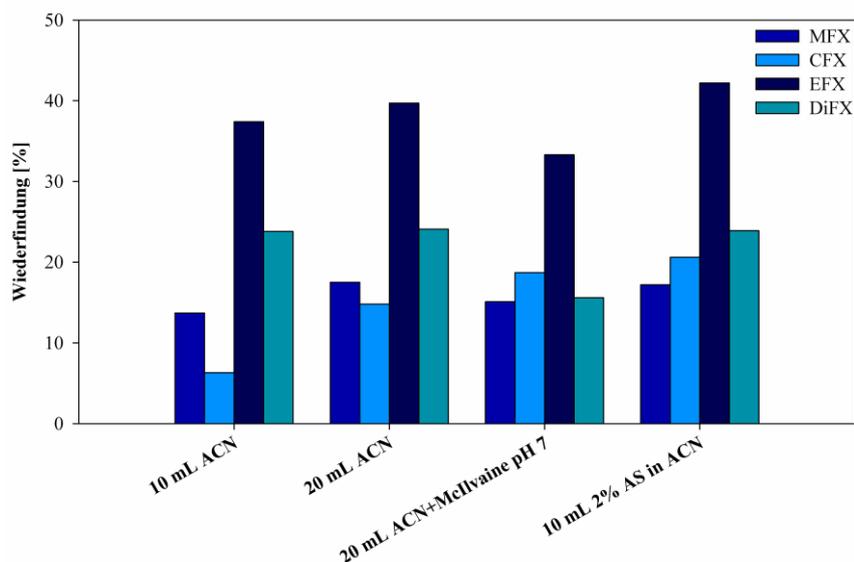


Abb. 5.8: Wiederfindungen unter Einsatz verschiedener organischer Lösungsmittel, Lösungsmittelvolumina sowie pH-Werte für die Mikrowellenextraktion (ACN: Acetonitril, AS: Ameisensäure, MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

5.3.3 Wässrige Lösungen

Auf Grund der beschriebenen, limitierenden Faktoren für organische Lösungsmittel wurde versucht, durch den Einsatz von wässrigen Lösungen sowie Puffern in Kombination mit erhöhten Extraktionstemperaturen die Analytwiederfindung zu steigern. Mc-Ilvaine-Puffer (pH 3,0 und pH 7,0), 0,1 M EDTA (pH 3,0 und pH 7,0), 0,1 M EDTA in Mc-Ilvaine-Puffer (pH 4,0) sowie 0,5 % Ameisensäure wurden als wässrige Extraktionsmittel getestet. Folgendes Mikrowellenprogramm wurde hierzu verwendet:

- Aufheizen auf 80 °C innerhalb von 5 min
- Aufheizen von 80 C auf 120 °C innerhalb von 5 min
- 120 °C für 10 min
- 30 min abkühlen

Es wurden zwei Extraktionszyklen mit jeweils 10 mL durchgeführt. Anschließend wurden die wässrigen Extrakte mittels Festphasenextraktion (Strata X, 13.6.1) weiter aufgearbeitet. Obwohl sogar zwei Extraktionszyklen verwendet wurden, liegen die Analytwiederfindungen unter 40 % (Abb. 5.9). Daher ist die Mikrowellenextraktion mit wässrigen Extraktionsmitteln auf Grund des hohen Zeitaufwandes sowie der niedrigen Wiederfindungen nicht geeignet für die Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces.

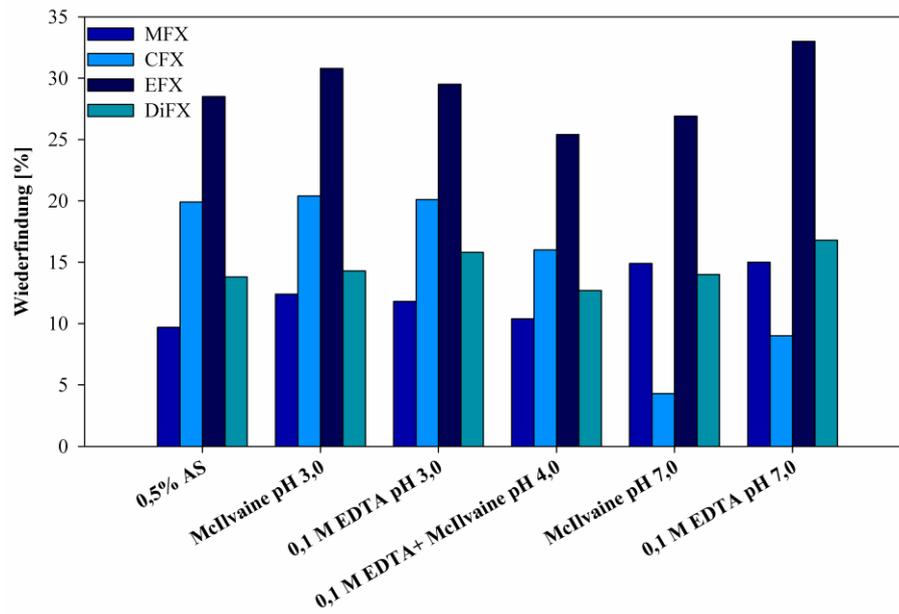


Abb. 5.9: Wiederfindungen für diverse wässrige Extraktionslösungen mittels Mikrowellenextraktion und anschließender Festphasenextraktion (AS: Ameisensäure, MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

6. Methodenentwicklung Stallstaub

Die Methodenoptimierung für die Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub erfolgte in Anlehnung an die entwickelte Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode für Hühnerfaeces. Dabei wurden das Lösungsmittelvolumen (5 mL, 10 mL und 15 mL), die Extraktionszeit (10 min und 15 min) sowie die Probemenge (50 mg und 100 mg) optimiert.

6.1 Optimierung des Lösungsmittelvolumens

Durch die Erhöhung des Extraktionsvolumens von 3 x 5 mL auf 3 x 10 mL konnten die Wiederfindungen für alle Analyten deutlich gesteigert werden (Abb. 6.1). Insbesondere für Ciprofloxacin konnte die Wiederfindung nahezu verdoppelt werden. Jedoch ist durch eine weitere Erhöhung des Extraktionsvolumens auf 3 x 15 mL keine weitere Steigerung der Wiederfindung möglich. Daher wurde für die Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub ein Lösungsmittelvolumen von 3 x 10 mL Dichlormethan eingesetzt.

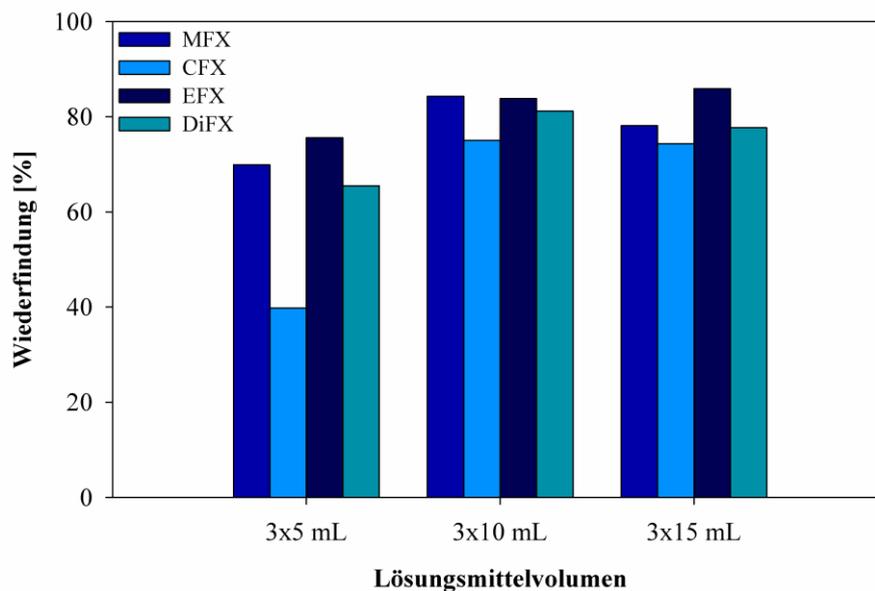


Abb. 6.1: Analytwiederfindungen für verschiedene Lösungsmittelvolumina bei der Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub (MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

6.2 Optimierung der Extraktionszeit

Der Einfluss der Extraktionszeit auf die Analytwiederfindung ist in Abb. 6.2 dargestellt. Die Wiederfindung kann für alle Analyten durch die Erhöhung der Extraktionszeit von 10 min

auf 15 min um bis zu 20 % (Difloxacin) gesteigert werden. Daher wurde für die Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub eine Extraktionszeit von 15 min verwendet.

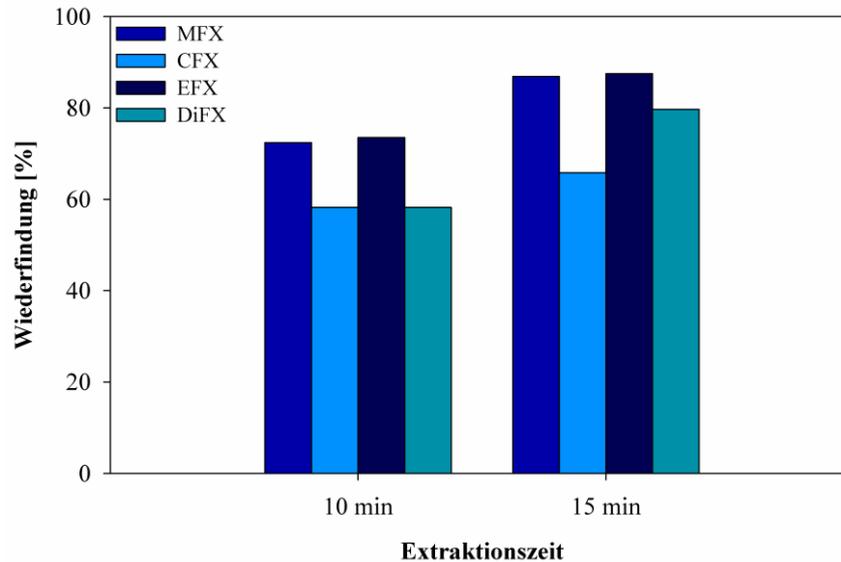


Abb. 6.2: Analytwiederfindungen für verschiedene Extraktionszeiten bei der Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub (MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

6.3 Optimierung der Probemenge

Die eingesetzte Probemenge sollte auf Grund der beschränkten Menge an Probenmaterial sowie Leerproben auf 50 mg reduziert werden. Jedoch ist die Wiederfindung für Difloxacin durch Minimierung der Probenmenge von 100 mg auf 50 mg um fast 25 % gesunken (Abb. 6.3). Dies ist aber zu vernachlässigen, da die Wiederfindungen für die im Fokus der Arbeit stehenden Fluorchinolone Ciprofloxacin und Enrofloxacin wie auch für Marbofloxacin nahezu identisch sind. Daher wurde für die Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub eine Probemenge von 50 mg eingesetzt. Um die Nachweisgrenze zu erhalten, wurde das Injektionsvolumen von 2 μL auf 4 μL verdoppelt.

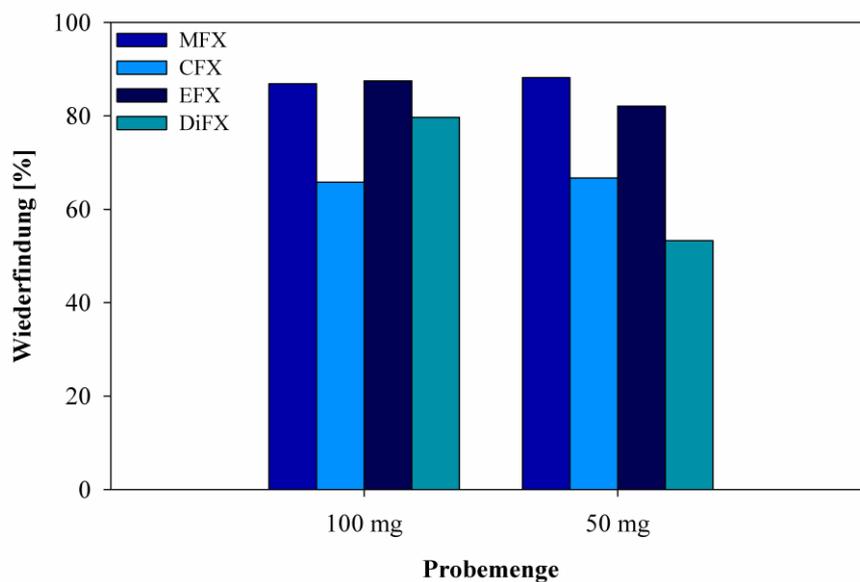


Abb. 6.3: Analytwiederfindungen für verschiedene Probenmengen bei der Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub (MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

Für die Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion hat sich ein Extraktionsvolumen von 3 x 10 mL Dichlormethan, einer Extraktionszeit von 15 min sowie eine eingesetzte Probemenge von 50 mg als optimal erwiesen. Daher wurden diese Parameter in der Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces für die Extraktion von Stallstaub adaptiert.

7. Methodenvalidierung

7.1 Hühnerplasma

Die Ergebnisse der Methodenvalidierung zur Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerplasma sind in Tab. 7.1 aufgeführt. In-Matrix-Kalibrierfunktionen wurden erstellt indem das Verhältnis Peakfläche Analyt/Peakfläche interner Standard gegen die Analytkonzentration aufgetragen wurde. Die Quantifizierung aller Analyten in Hühnerplasma erfolgte unter Verwendung des internen Standards (Ciprofloxacin d8). Der lineare Bereich reicht für alle Analyten mit Determinationskoeffizienten $> 0,996$ von der Bestimmungsgrenze (0,08 - 0,16 $\mu\text{g/L}$) bis 2000 $\mu\text{g/L}$. Zusätzlich wurde die Linearität durch Auftragung des Verhältnisses von (Peakfläche Analyt/Peakfläche interner Standard)/Analytkonzentration gegen die Analytkonzentration verifiziert. Dieses Verhältnis sollte im linearen Messbereich konstant sein. Wie von der FDA (Food and Drug Administration) für die Methodenvalidierung von Analysemethoden biologischer Proben gefordert, liegt die Intra-Day-Präzision sowie die Inter-Day-Präzision für alle Analyten unter 15 % (Food and Drug Administration 2001). Die Nachweis- sowie Bestimmungsgrenzen wurden durch die Dotierung einer Leermatrixprobe mit diesen Konzentrationen sowie die Einhaltung des erlaubten Toleranzbereiches für das Verhältnis der beiden Massenübergänge pro Analyt (Tab 7.2) verifiziert (Kommission der Europäischen Gemeinschaften 2002). Für die im Rahmen der Methodenvalidierung untersuchten Konzentrationen treten keine Matrixeffekte auf. Im Vergleich zu 2000 $\mu\text{g/L}$ und 40 $\mu\text{g/L}$ ist der berechnete Matrixeffekt für eine Enrofloxacin- und Difloxacin-Konzentration von 2 $\mu\text{g/L}$ leicht erhöht. Er liegt jedoch innerhalb der Standardabweichung für die entsprechende Konzentration. Daher kann man davon ausgehen, dass die Erhöhung des Analytsignales nicht auf Matrixeffekte zurückzuführen ist. Zusätzlich zu gepooltem Plasma wurden Matrixeffekte für Plasmaproben von drei Einzeltieren ermittelt. Die Ergebnisse hierfür liegen innerhalb der Standardabweichung für den jeweiligen Analyten und entsprechender Konzentration (nicht dargestellt). Somit kann ein Einfluss auf die Analytik durch unterschiedliche Plasmaquellen nahezu ausgeschlossen werden. Stabilitätsuntersuchungen von Probenextrakten haben gezeigt, dass für Marbofloxacin, Ciprofloxacin und Enrofloxacin innerhalb der ersten 7 Tage bei einer Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ keine Elimination auftritt. Im Gegensatz dazu beträgt die Elimination von Difloxacin nach 7 Tagen bereits 25 %. Bei einer Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ beträgt die Elimination aller Analyten knapp 30 %. Jedoch wurden alle Probenextrakte am Tag der Extraktion analysiert. Dennoch wäre es

möglich, Probenextrakte bei - 20 °C in 2 mL Kunststoffreaktionsgefäßen zu lagern, wenn sie innerhalb von 7 Tagen untersucht werden.

Tab. 7.1: Ergebnisse der Methodenvalidierung zur Extraktion von Hühnerplasma (RSD: relative Standardabweichung, SD: Standardabweichung, NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze, MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

		MFX	CFX	EFX	DiFX
Inter-day Präzision (RSD %, n=54)	2 µg/L	9,1	8,9	11,3	7,1
	40 µg/L	10,7	10,5	13,9	10,8
	2000 µg/L	7,8	10,8	11,6	6,5
Intra-day Präzision (RSD %, n=18)	2 µg/L	3,2 - 9,1	7,2 - 9,0	9,2 - 11,3	5,2 - 6,6
	40 µg/L	5,9 - 10,6	6,4 - 10,7	7,0 - 11,4	7,7 - 8,8
	2000 µg/L	3,3 - 8,0	2,8 - 10,4	3,5 - 12,9	2,7 - 5,7
Wiederfindung (% , ± SD)	2 µg/L	84,8 ± 7,9	73,1 ± 6,5	83,4 ± 9,4	84,0 ± 6,0
	40 µg/L	75,9 ± 8,1	61,9 ± 6,5	73,2 ± 10,2	75,9 ± 8,2
	2000 µg/L	80,0 ± 6,3	64,7 ± 7,0	76,4 ± 8,8	80,5 ± 5,2
Linearitätsbereich (µg/L)		BG - 2000			
Determinationskoeffizient (R²)		1,0000	0,9999	1,0000	0,9964
Matrixeffekt (%)	2 µg/L	3,7	3,4	12,2	12,0
	40 µg/L	-1,9	0,0	-0,5	-0,4
	2000 µg/L	-0,5	-5,5	-6,7	-5,3
NWG (µg/L)		0,04	0,05	0,03	0,05
BG (µg/L)		0,13	0,16	0,08	0,13

Tab. 7.2: Erlaubter Toleranzbereich des Verhältnisses der beiden Massenübergänge für jeden Analyten.

	Relative Intensität (% des Basispeaks)	Maximale Variation [% relativ]
Marbofloxacin	44,2	± 25
Ciprofloxacin	97,1	± 20
Enrofloxacin	42,4	± 25
Difloxacin	80,8	± 20

7.2 Hühnerfaeces

Die Ergebnisse der Methodenvalidierung für die Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces sind in Tab. 7.3 zusammengefasst. Die In-Matrix-Kalibrierfunktion für Ciprofloxacin wurde durch Auftragen von Peakfläche Analyt/Peakfläche interner Standard gegen die Analytkonzentration erstellt. Die In-Matrix-Kalibrierfunktionen für Marbofloxacin, Enrofloxacin sowie Difloxacin wurden ohne Verwendung des internen Standards erstellt, da

die Residuenanalyse nur eine schwache Linearität aufwies. Daher wurde der interne Standard lediglich zur Quantifizierung von Ciprofloxacin sowie als Kontrolle des Extraktionsprozesses eingesetzt. Die drei weiteren Analyten wurden mit Hilfe einer In-Matrix-Kalibrierung quantifiziert. Für Marbofloxacin sowie Difloxacin ist die Inter-Day Präzision wie von der FDA für bioanalytische Methoden gefordert < 15 %. Jedoch ist die Inter-Day Präzision für Ciprofloxacin (2,5 und 50 µg/kg) sowie Enrofloxacin (50 µg/kg) etwas größer als 15 %, aber noch akzeptabel wenn man die Komplexität der Probenmatrix in Betracht zieht. Die Matrixeffekte (Signalverstärkung) für Marbofloxacin und Ciprofloxacin nehmen mit sinkender Analytkonzentration zu. Die leichte Signalverstärkung für Enrofloxacin sowie die Signalunterdrückung für Difloxacin scheinen nicht konzentrationsabhängig zu sein. Alle Proben wurden am Tag der Extraktion analysiert. Stabilitätsuntersuchungen zeigten keine Elimination der Analyten innerhalb von 7 Tagen, wenn die Probenextrakte bei - 20 °C in 2 mL Kunststoffreaktionsgefäßen gelagert wurden.

Tab. 7.3: Ergebnisse der Methodenvalidierung zur Extraktion von Hühnerfaeces (RSD: relative Standardabweichung, SD: Standardabweichung, NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze, MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

		MFX	CFX	EFX	DiFX
Inter-day Präzision (% RSD, n=54)	2.5 µg/kg	14,7	15,5	14,6	13,6
	50 µg/kg	14,4	17,0	17,3	12,9
	2500 µg/kg	10,4	12,3	11,5	8,1
Intra-day Präzision (% RSD, n=18)	2.5 µg/kg	8,1 - 13,0	6,5 - 12,3	6,2 - 12,3	9,0 - 13,9
	50 µg/kg	6,6 - 7,3	6,1 - 11,5	4,3 - 13,8	4,1 - 13,0
	2500 µg/kg	5,7 - 7,1	4,0 - 7,0	4,3 - 8,3	2,2 - 6,7
Wiederfindung (% , ± SD)	2.5 µg/kg	83,5 ± 12,3	59,0 ± 9,2	80,9 ± 11,8	51,0 ± 6,9
	50 µg/kg	79,5 ± 11,4	59,2 ± 10,0	83,3 ± 14,4	53,1 ± 6,9
	2500 µg/kg	75,6 ± 7,9	61,1 ± 7,5	76,9 ± 8,8	54,9 ± 4,5
Linearitätsbereich (µg/kg)		BG - 5000			
Determinationskoeffizient (R²)		0,9995	0,9995	0,9987	0,9988
Matrixeffekt (%)	2.5 µg/kg	26,7	44,4	14,7	-14,8
	50 µg/kg	7,2	16,4	16,1	-9,9
	2500 µg/kg	-1,7	4,7	10,8	-22,8
NWG (µg/kg)		0,03	0,36	0,05	0,18
BG (µg/kg)		0,10	1,09	0,16	0,54

7.3 Stallstaub

Die Ergebnisse der Methodenvalidierung für die Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Stallstaub sind in Tab. 7.4 dargestellt. Die Erstellung der In-Matrix-

Kalibrierung sowie die Quantifizierung erfolgte analog wie in 7.1 beschrieben. Der lineare Bereich für Marbofloxacin und Ciprofloxacin reicht von 0,005 µg/g bis 1 µg/g. Jedoch hat die Residuenanalyse gezeigt, dass der lineare Bereich für Enrofloxacin sowie Difloxacin auf 0,005 µg/g bis 0,1 µg/g begrenzt ist. Dies ist dennoch akzeptabel, da die Antibiotikakonzentrationen in realen Stallstaubproben in diesem Bereich erwartet werden. Alternativ wäre die Verdünnung der Probenextrakte möglich, um eine Analyse im linearen Messbereich zu gewährleisten. Die Inter-Day-Präzision sowie Intra-Day Präzision – bis auf zwei Ausnahmen (Ciprofloxacin 1 µg/g und Difloxacin 1 µg/g) – liegen für alle Analyten und untersuchten Konzentrationen unter 15 %. Da die mittels Kalibrierfunktionsverfahren ermittelten Nachweis- sowie Bestimmungsgrenze nicht durch die Messung einer mit diesen Konzentrationen dotierten Leermatrixprobe verifiziert werden konnten, wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das Signal-Rausch-Verhältnis von > 3 bzw. > 10 definiert. Diese sind für alle Analyten einheitlich, betragen 0,005 µg/g (Nachweisgrenze) sowie 0,015 µg/g (Bestimmungsgrenze) und konnten durch die Messung einer mit dieser Konzentration dotierten Leermatrixprobe sowie der Einhaltung des Toleranzbereiches für das Verhältnis der beiden Massenübergänge pro Analyt (Tab 7.2) verifiziert werden. Die ermittelten Matrixeffekte (Signalverstärkung) sind für eine Konzentration von 0,05 µg/g für alle Analyten mit bis zu 60 % (Marbofloxacin) beträchtlich. Mit zunehmender Analytkonzentration nehmen die Matrixeffekte für Ciprofloxacin sowie Difloxacin wieder ab und befinden sich im Bereich der Standardabweichung. Jedoch sind die ermittelten Matrixeffekte für eine Konzentration von 1 µg/g für Marbofloxacin und Enrofloxacin zu hoch, so dass eine Kompensation dieser durch die Verwendung des internen Standards und einer In-Matrix-Kalibrierung notwendig ist. Alle Proben wurden am Tag der Extraktion analysiert. Die Probenextrakte können bis zu 7 Tage bei -20 °C in 2 mL Kunststoffreaktionsgefäßen ohne Analytelimination aufbewahrt werden.

Tab. 7.4: Ergebnisse der Methodenvalidierung zur Extraktion von Stallstaub (RSD: relative Standardabweichung, SD: Standardabweichung, NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze, MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin und DiFX: Difloxacin).

		MFX	CFX	EFX	DiFX
Inter-day Präzision (% RSD, n=30)	0,05 µg/g	5,7	6,4	7,8	7,1
	1 µg/g	8,3	10,5	9,9	11,6
Intra-day Präzision (% RSD, n=10)	0,05 µg/g	3,9 - 6,3	3,2 - 10,4	5,7 - 10,9	3,4 - 5,7
	1 µg/g	5,3 - 10,7	3,5 - 17,5	6,5 - 9,4	6,0 - 15,6
Wiederfindung (% , ± SD)	0,05 µg/g	98,2 ± 5,6	73,7 ± 4,7	86,8 ± 6,8	78,4 ± 5,6
	1 µg/g	91,8 ± 7,6	75,5 ± 7,9	87,6 ± 9,9	78,6 ± 11,6
Linearitätsbereich (µg/g)		0,005 - 1		0,005 - 0,1	
Determinationskoeffizient (R²)		0,9981	0,9992	0,9947	0,9921
Matrixeffekt (%)	0,05 µg/g	60,3	48,0	45,7	28,5
	1 µg/g	26,6	13,9	14,8	7,8
NWG (µg/g)		0,005			
BG (µg/g)		0,015			

8. Tierstudien

8.1 Allgemeines

Das Ziel der Tierstudien war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Resistenzentwicklung und der Aufnahme subtherapeutischer Enrofloxacinosen experimentell zu beschreiben. Hierzu wurden Hühner mit subtherapeutischen Dosen, welche die Verschleppung von Antibiotika z. B. über Stallstaub simulieren sollten, sowie mit der bestimmungsgemäßen Enrofloxacinosis unter definierten Bedingungen behandelt und die Konzentration des Wirkstoffes und seines Hauptmetaboliten u. a. in Plasma und Faeces bestimmt. Die Applikation erfolgte für die Verschleppungsdosen über das Tränkwasser und für die bestimmungsgemäße Dosis über das Futter.

8.2. Hühnerplasma

Die detaillierten Plasmaverlaufskurven von Tieren, die mit der empfohlenen Enrofloxacinosis (10 mg/kg KG Enrofloxacin) und Verschleppungsdosen (0,3; 1 und 3 mg/kg KG Enrofloxacin) behandelt wurden, sind in der Dissertation von Frau Dr. G. Scherz (2013) aufgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus dieser Versuchsreihe ausgewählte Plasmaproben von Tieren, die mit Verschleppungsdosen von 1 mg/kg KG Enrofloxacin sowie 3 mg/kg KG Enrofloxacin behandelt wurden, analysiert. Damit sollte einerseits die Anwendbarkeit der entwickelten SPE-Methode zur Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerplasma demonstriert werden und andererseits ein Vergleich mit der von Frau Dr. G. Scherz verwendeten Extraktionsmethode durchgeführt werden.

8.2.1 Verschleppungsdosen

1 mg/kg KG Enrofloxacin

Insgesamt wurde für 15 Plasmaproben an sechs Probenahmezeitpunkten die Enrofloxacin- und Ciprofloxacin-Konzentration bestimmt. Die Plasmaverlaufskurven für Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin zeigen bereits zwei Stunden nach Behandlungsbeginn Konzentrationen von 8,2 µg/L Enrofloxacin und 1,4 µg/L Ciprofloxacin (Abb. 8.1). Nach 24 Stunden sind die Plasmakonzentrationen für Enrofloxacin und Ciprofloxacin bereits auf 15,8 µg/L und 2,6 µg/L angestiegen. Die Plasmakonzentration von Enrofloxacin hat sich nach 50 Stunden mehr als verdoppelt (34,5 µg/L), steigt jedoch im weiteren Behandlungsverlauf nur noch

geringfügig an (38,8 µg/L nach 96 Stunden). Für Ciprofloxacin steigen die Plasmakonzentrationen mit zunehmender Behandlungsdauer nur noch schwach von 2,7 µg/L nach 50 Stunden auf 3,3 µg/L nach 96 Stunden an.

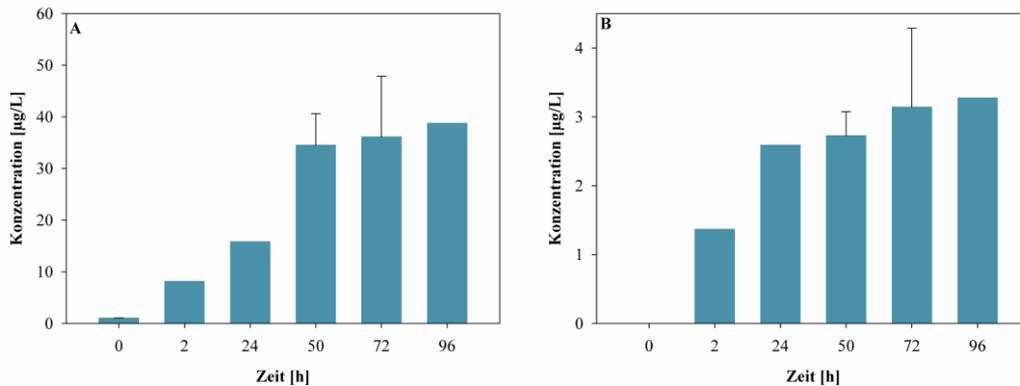


Abb. 8.1: Plasmakonzentrationsprofil für Enrofloxacin (A) sowie Ciprofloxacin (B) nach der Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 1 mg/kg KG Enrofloxacin (Mittelwert + Standardabweichung für n = 3, für n = 2 Mittelwert angegeben).

3 mg/kg KG Enrofloxacin

Insgesamt wurde für 14 Plasmaproben an fünf Probenahmezeitpunkten die Enrofloxacin- und Ciprofloxacin-Konzentration bestimmt. Die Plasmaverlaufskurve für Enrofloxacin steigt analog zur Behandlung mit 1 mg/kg KG Enrofloxacin innerhalb von 50 Stunden stetig von 61,9 µg/L nach 4 Stunden auf 140,3 µg/L an und bleibt danach nahezu konstant (139,9 µg/L nach 100 Stunden; Abb. 8.2). Ebenso ist die Plasmaverlaufskurve von Ciprofloxacin mit der von 1 mg/kg KG Enrofloxacin vergleichbar d. h. die Plasmakonzentration steigt innerhalb der ersten 24 Stunden von 3,3 µg/L (nach 4 Stunden) auf 6,5 µg/L an und steigt im weiteren Verlauf der Behandlung nur noch leicht an (7,2 µg/L nach 100 Stunden).

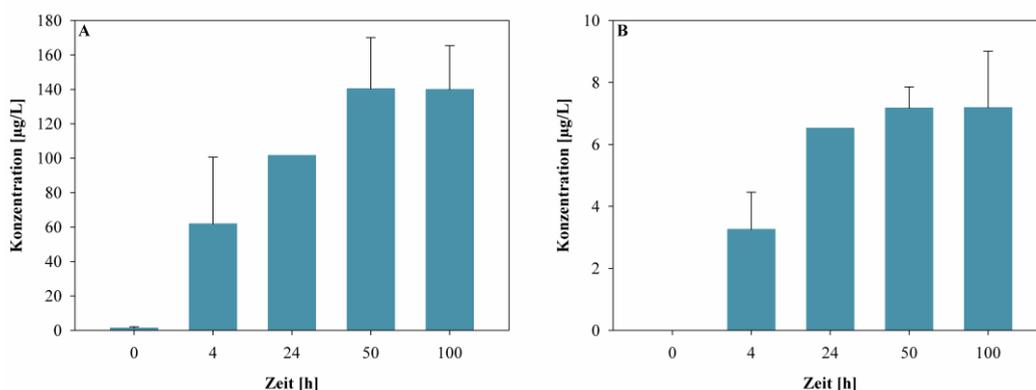


Abb. 8.2: Plasmakonzentrationsprofil für Enrofloxacin (A) sowie Ciprofloxacin (B) nach der Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 3 mg/kg KG Enrofloxacin (Mittelwert + Standardabweichung für n = 3, für n = 2 Mittelwert angegeben).

8.2.3 Metabolisierungsprofil

Die durchschnittliche Metabolisierung (Abb. 8.3) wurde berechnet, indem die Konzentrationen von Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin zum entsprechenden Behandlungszeitpunkt addiert wurden und die Konzentration des jeweiligen Fluorchinolons auf den Gesamtgehalt bezogen wurde. Für eine Verschleppungsdosis von 1 mg/kg KG Enrofloxacin beträgt der Anteil von Ciprofloxacin innerhalb der ersten 24 Stunden ca. 14 % und sinkt danach im weiteren Behandlungsverlauf auf einen konstant bleibenden Anteil von ca. 8 % ab. Im Vergleich dazu ist die Metabolisierung für eine Verschleppungsdosis von 3 mg/kg KG Enrofloxacin mit ca. 5 % Ciprofloxacin über den ganzen Behandlungszeitraum nahezu konstant.

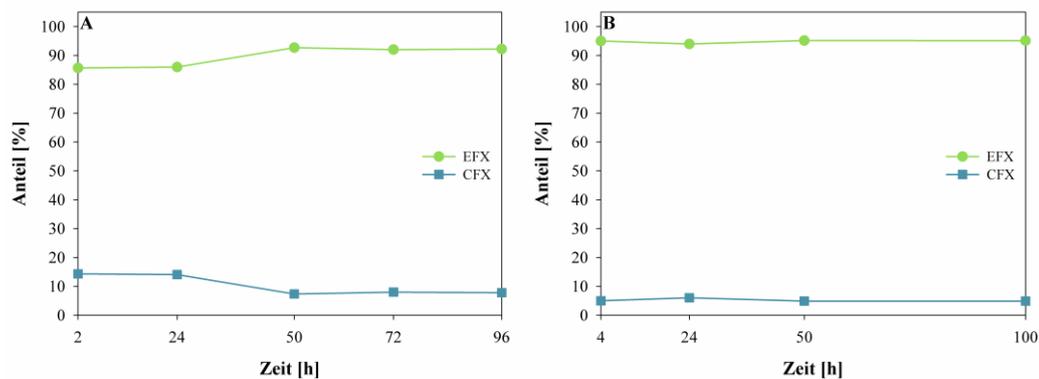


Abb. 8.3: Metabolisierungsprofil für die Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 1 mg/kg KG Enrofloxacin (A) sowie 3 mg/kg KG Enrofloxacin (EFX: Enrofloxacin, CFX: Ciprofloxacin).

8.3 Hühnerfaeces

8.3.1 Verschleppungsdosen

0,3 mg/kg KG Enrofloxacin

Die detektierten Konzentrationen von Enrofloxacin und Ciprofloxacin in Hühnerfaeces von Tieren, die mit einer Verschleppungsdosis von 0,3 mg/kg KG Enrofloxacin (\cong 0,3 % Verschleppung) behandelt wurden (Abb. 8.4) steigen nach der ersten Applikation innerhalb der ersten 6 Stunden stark an. Für Enrofloxacin sinkt die Konzentration anschließend leicht ab und bleibt bis zur nächsten Applikation konstant. Im Gegensatz dazu steigt die Konzentration für Ciprofloxacin bis Stunde 8 weiterhin leicht an. Nach der zweiten Applikation steigen die Konzentrationen innerhalb der ersten beiden Stunden für Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin an, sinken anschließend ab und steigen bis zur nächsten Applikation wieder an. Für die dritte Applikation ergibt sich das zuvor genannte Konzentrationsprofil für beide Analyten. Jedoch

sind die gemessenen Konzentrationen sowohl für Enrofloxacin als auch für Ciprofloxacin höher als nach der ersten und zweiten Applikation, d. h., dass die Faeceskonzentrationen während des Behandlungszeitraumes ansteigen. Die Konzentrationen sinken ab 24 Stunden nach der letzten Applikation auf 0,16 mg/kg Enrofloxacin ($\cong 9,7$ % der maximalen Konzentration) sowie 0,01 mg/kg Ciprofloxacin ($\cong 15,1$ % der maximalen Konzentration) stark ab.

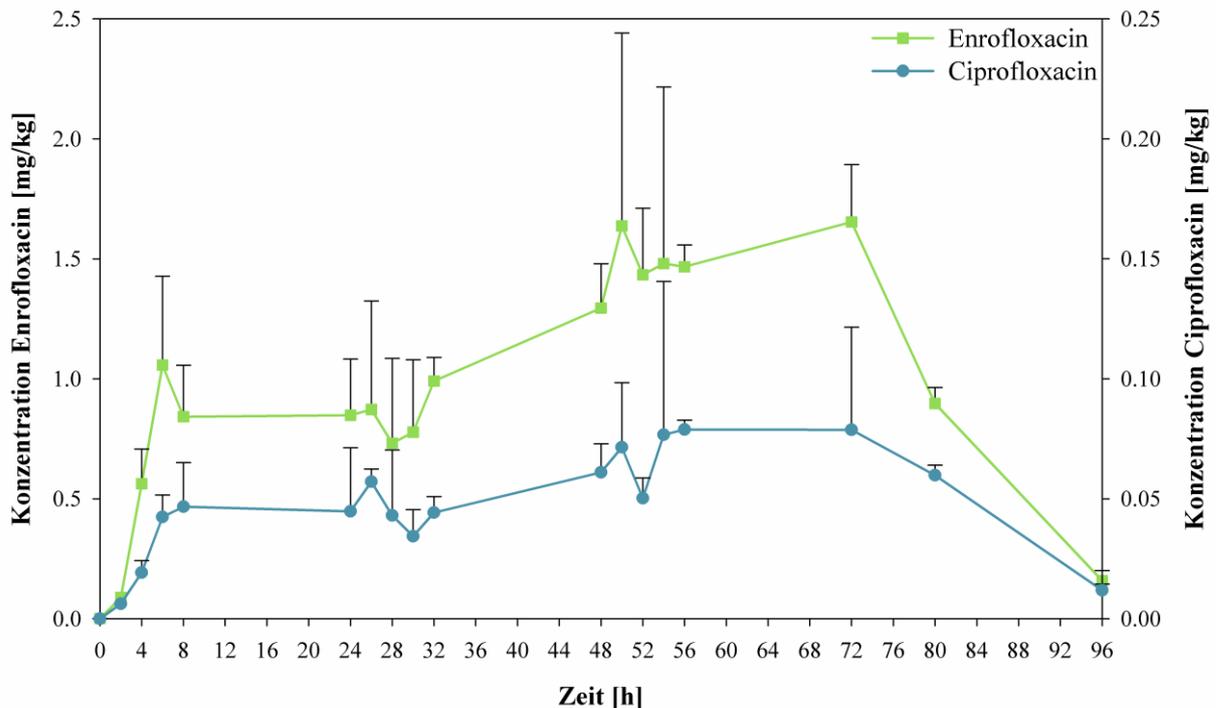


Abb. 8.4: Faeceskonzentrationsprofil für Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin nach Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 0,3 mg/kg KG Enrofloxacin (n = 3, Mittelwert + Standardabweichung).

1 mg/kg KG Enrofloxacin

Die nach der Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 1 mg/kg KG Enrofloxacin ($\cong 1$ % Verschleppung) gemessenen Faeceskonzentrationen an Enrofloxacin steigen nach allen drei Applikationen rapide innerhalb der ersten 6 (Tag 3) bzw. 8 Stunden (Tag 1 und Tag 2) an (Abb. 8.5). Wie schon zuvor für eine Verschleppungsdosis von 0,3 mg/kg KG Enrofloxacin berichtet, nimmt die Enrofloxacin-Konzentration innerhalb des Behandlungszeitraumes stark zu. Hingegen zeigt die Faeceskonzentration von Ciprofloxacin eine sinkende Tendenz über den gesamten Behandlungszeitraum. Die Konzentrationen für beide Analyten nehmen innerhalb der letzten 24 Stunden rapide auf 0,12 mg/kg Enrofloxacin ($\cong 2,3$ % der maximalen Konzentration) sowie 0,03 mg/kg Ciprofloxacin ($\cong 8,5$ % der maximalen Konzen-

tration) ab. Die absoluten Mengen in mg/kg nach 96 Stunden sind für beide Analyten ähnlich zu denen für eine Verschleppungsdosis von 0,3 mg/kg KG Enrofloxacin gemessenen Konzentrationen.

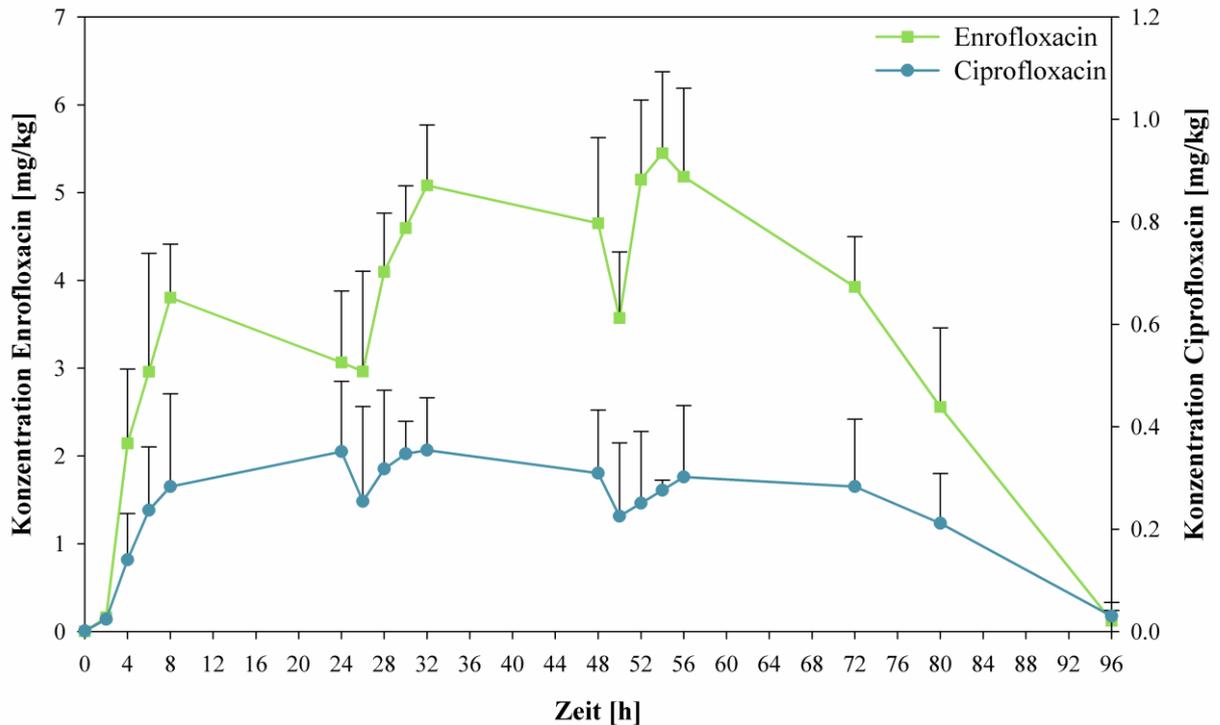


Abb. 8.5: Faeceskonzentrationsprofil für Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin nach Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 1 mg/kg KG Enrofloxacin (n = 3, Mittelwert + Standardabweichung).

3 mg/kg KG Enrofloxacin

Das Konzentrationsprofil (Abb. 8.6) für eine Verschleppungsdosis von 3 mg/kg KG Enrofloxacin ($\cong 3\%$ Verschleppung) ist für Enrofloxacin mit dem bereits beschriebenen Profil für die Verschleppungsdosis von 1 mg/kg KG Enrofloxacin vergleichbar. Die Enrofloxacin-Konzentration in Faeces steigt nach jeder Applikation innerhalb der ersten 8 Stunden steil an. Des Weiteren nehmen die gemessenen Konzentrationen nach dem Erreichen des ersten Maximums nach 8 Stunden nahezu um das Doppelte während des Behandlungszeitraumes zu. Die Ciprofloxacin-Konzentration nimmt ebenfalls innerhalb der Behandlungsdauer zu. Wie bereits für die zuvor beschriebenen Verschleppungsdosen von 0,3 mg/kg KG Enrofloxacin und 1 mg/kg KG Enrofloxacin fallen die Konzentrationen für Enrofloxacin auf 4,48 mg/kg ($\cong 21,2\%$ der maximalen Konzentration) und seinen aktiven Metaboliten Cipro-

floxacin 0,46 mg/kg (\cong 19,1 % der maximalen Konzentration) ab 24 Stunden nach Behandlungsende stark ab.

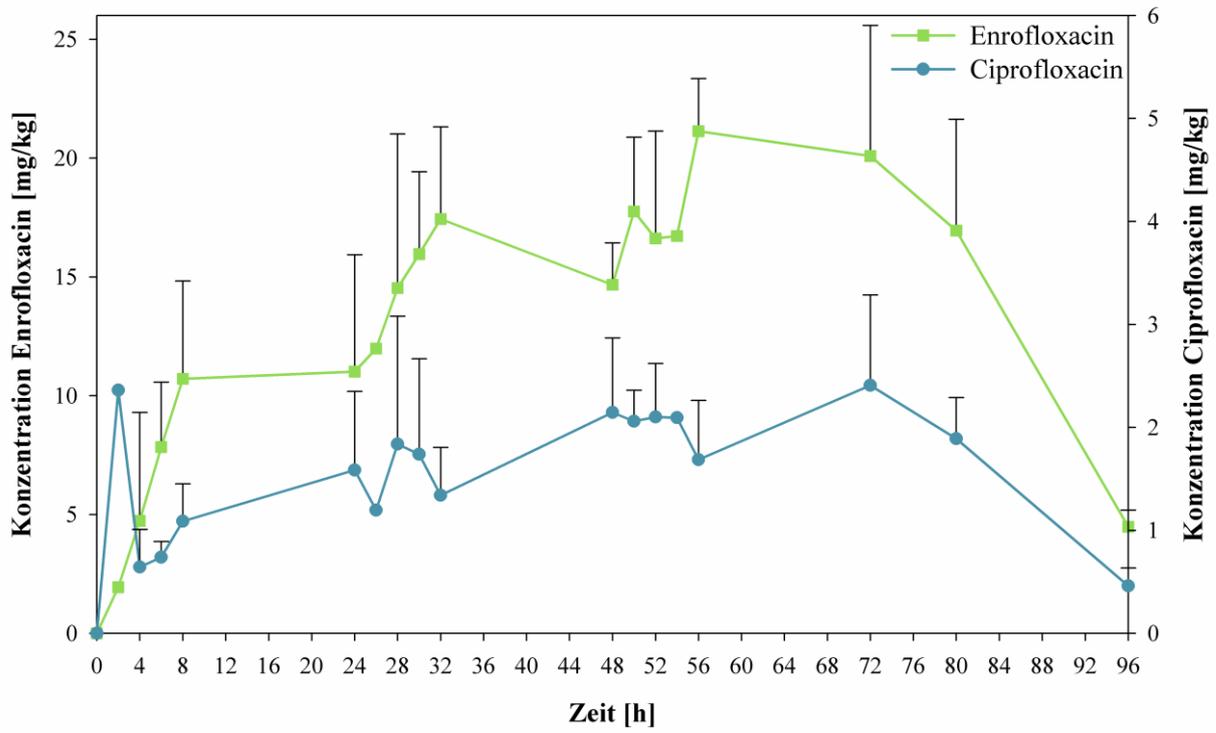


Abb. 8.6: Faeceskonzentrationsprofil für Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin nach Behandlung mit einer Verschleppungsdosis von 3 mg/kg KG Enrofloxacin (n = 3, Mittelwert + Standardabweichung).

8.3.2 Empfohlene Dosis 10 mg/kg KG Enrofloxacin

Die für Enrofloxacin gemessenen Konzentrationen in Hühnerfaeces nach einer Behandlung mit der empfohlenen Dosis von 10 mg/kg KG Enrofloxacin steigen innerhalb von 24 Stunden nach der Applikation rapide an (Abb. 8.7). Das Konzentrationsprofil für Ciprofloxacin hingegen ist nach der jeweiligen Applikation nicht einheitlich. Wie bereits beschrieben, nehmen die Konzentrationen während des Behandlungszeitraumes zu. Jedoch ist die Zunahme von Enrofloxacin im Vergleich zu den anderen Behandlungsszenarien geringer. Die Konzentrationen für Enrofloxacin und Ciprofloxacin sinken 24 Stunden nach Behandlungsende innerhalb von 8 Stunden rapide ab. Im weiteren Verlauf nehmen die Konzentrationen weiter – jedoch nicht mehr so steil – bis auf 1,11 mg/kg Enrofloxacin (\cong 1,8 % der maximalen Konzentration) sowie Ciprofloxacin 0,25 mg/kg (\cong 1,34 % der maximalen Konzentration) innerhalb von 56 Stunden nach Behandlungsende ab.

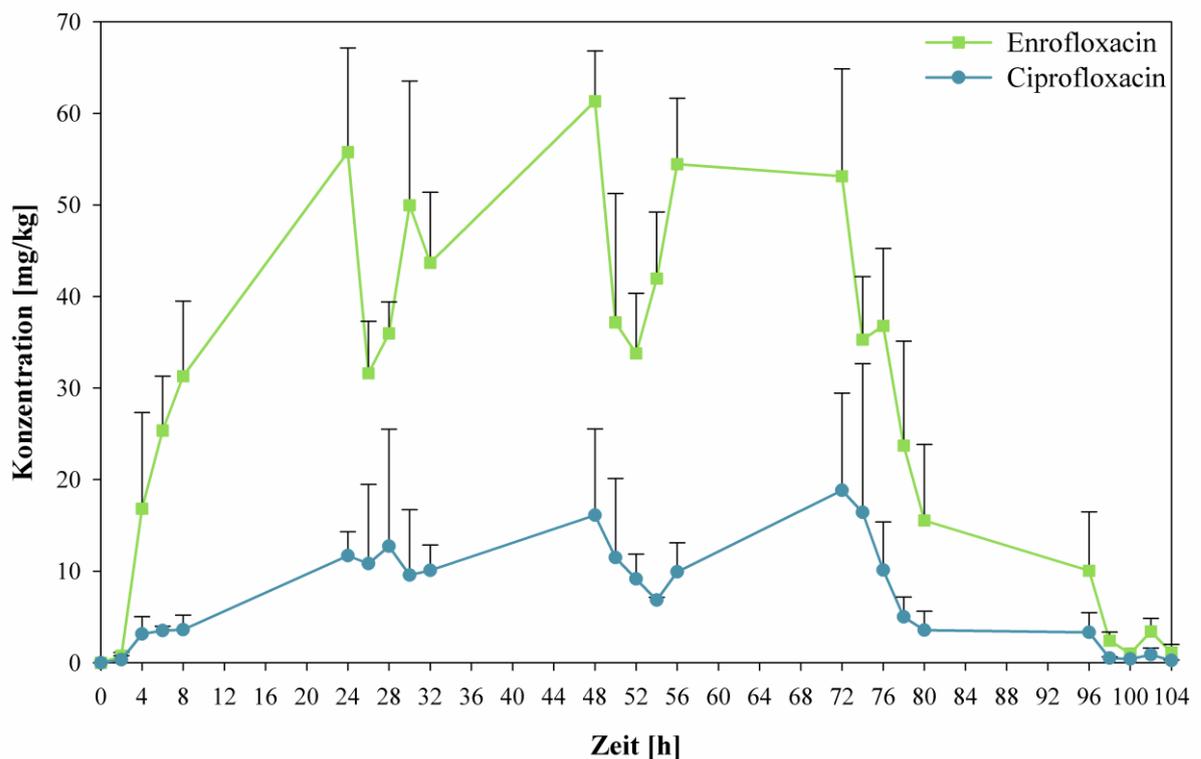


Abb. 8.7: Faeceskonzentrationsprofil für Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin nach Behandlung mit der vom Hersteller empfohlenen Dosis von 10 mg/kg KG Enrofloxacin (n = 3, Mittelwert + Standardabweichung).

8.3.3 Metabolisierungsprofil

Die Anteile von Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin zum Gesamtgehalt beider Analyten während des gesamten Behandlungszeitraumes für Verschleppungsdosen von 0,3 mg/kg, 1 mg/kg und 3 mg/kg KG Enrofloxacin sowie der empfohlenen Dosis von 10 mg/kg KG Enrofloxacin sind in Abb. 8.8 graphisch dargestellt. Der Anteil von Ciprofloxacin nimmt mit steigender Enrofloxacindosis von durchschnittlich 5,1 % für eine verabreichte Dosis von 0,3 mg/kg KG Enrofloxacin auf durchschnittlich 20,5 % nach Behandlung mit der empfohlenen Dosis zu.

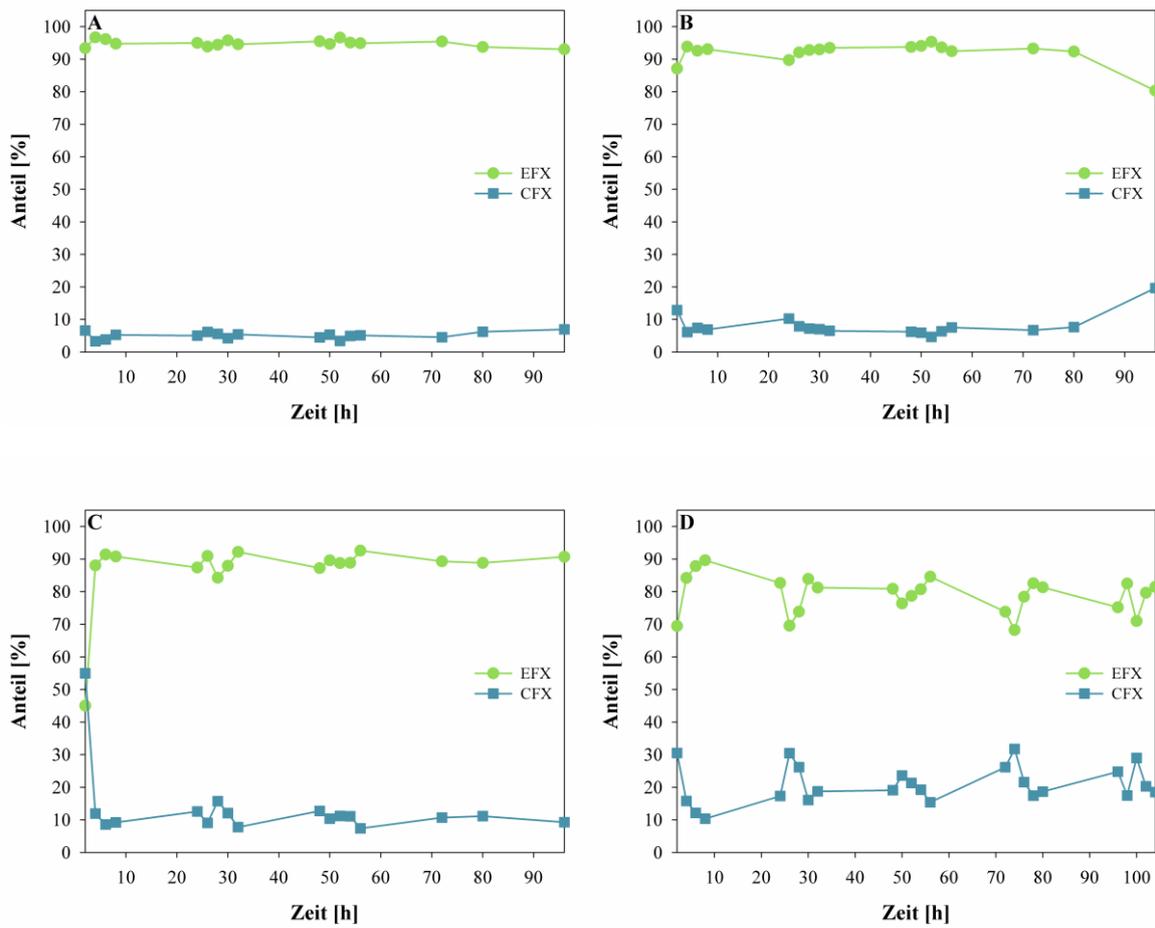


Abb. 8.8: Metabolisierungsprofil für die Behandlung mit Verschleppungsdosen von 0,3 mg/kg (A), 1 mg/kg (B); 3 mg/kg (C) sowie der vom Hersteller empfohlenen Dosis von 10 mg/kg (D) KG Enrofloxacin (EFX: Enrofloxacin, CFX: Ciprofloxacin).

9. Methodenvergleich Hühnerplasma

9.1 Allgemeines

Die Plasmaproben wurden wie bereits in 8.1 erwähnt zunächst mittels HPLC-FLD analysiert (Scherz 2013). Zusätzlich wurden im Rahmen der Methodenetablierung der in dieser Arbeit entwickelten Festphasenextraktionsmethode, in Plasmaproben mit einem verbleibenden Volumen $> 300 \mu\text{L}$ die Konzentration an Enrofloxacin und Ciprofloxacin bestimmt. Dabei handelte es sich um 14 Plasmaproben von Hühnern, die mit 1 mg/kg KG Enrofloxacin behandelt wurden sowie 12 weitere Plasmaproben aus dem Behandlungsszenario mit 3 mg/kg KG Enrofloxacin.

Der Methodenvergleich beinhaltete sowohl die Auftragung der Mittelwerte der mit beiden Methoden ermittelten Analytkonzentrationen als auch die Darstellung der Mittelwerte in einem Balkendiagramm, um den direkten Vergleich der Messwerte zu ermöglichen.

9.2 Verschleppungsdosis 1 mg/kg KG Enrofloxacin

Die Ergebnisse der Linearitätsfunktion zeigen, dass die Korrelation beider Methoden für Enrofloxacin mit einem Determinationskoeffizienten von $R^2 = 0,9888$ gut ist (Abb. 9.1 A). Jedoch liegt die Steigung mit $0,8113$ unter dem Idealwert von $1,0$. Der Grund hierfür liegt darin, dass die mittels HPLC-FLD bestimmten Konzentrationen für Enrofloxacin niedriger sind (Abb. 9.1 B). Besonders stark zeigt sich das für Proben, die nach 2 Stunden entnommen wurden.

Ein Vergleich der Ciprofloxacin-Konzentrationen ist für diese Verschleppungsdosis nicht möglich, da die mittels HPLC-FLD analysierten Plasmaproben unterhalb der Bestimmungsgrenze ($1 \mu\text{g/L}$) lagen.

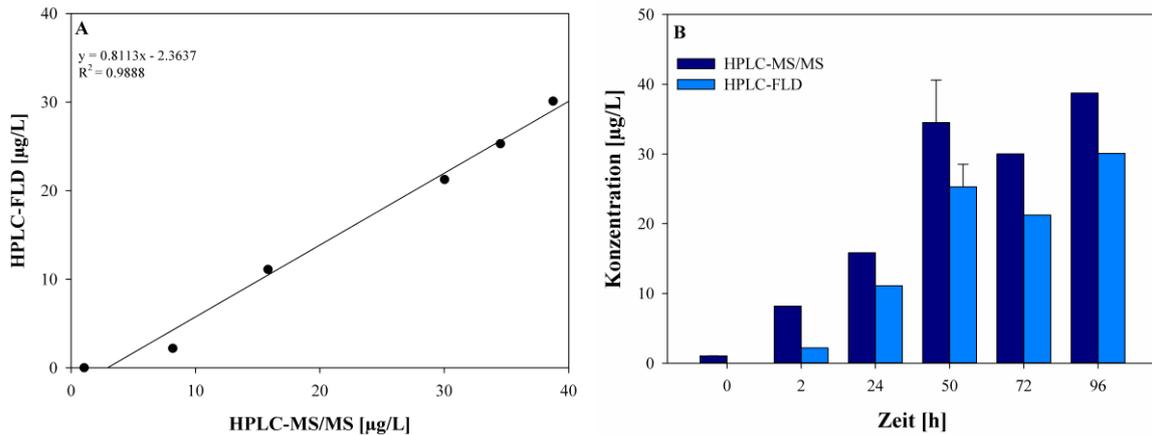


Abb. 9.1: Methodenvergleich der Enrofloxacin-Konzentrationen für die Verschleppungsdosis von 1 mg/kg KG Enrofloxacin dargestellt als Linearitätsfunktion (A) und Balkendiagramm (B) (Mittelwert + Standardabweichung für $n = 3$, für $n = 2$ Mittelwert).

9.3 Verschleppungsdosis 3 mg/kg KG Enrofloxacin

Der Vergleich beider Methoden für Enrofloxacin zeigt eine hervorragende Korrelation mit einem Determinationskoeffizienten von $R^2 = 0,9950$ und einer Steigung von nahezu 1,0 (Abb. 9.2 A). Das bedeutet, dass die Ergebnisse beider Methoden miteinander vergleichbar sind, was auch aus Abb. 9.2 B hervor geht.

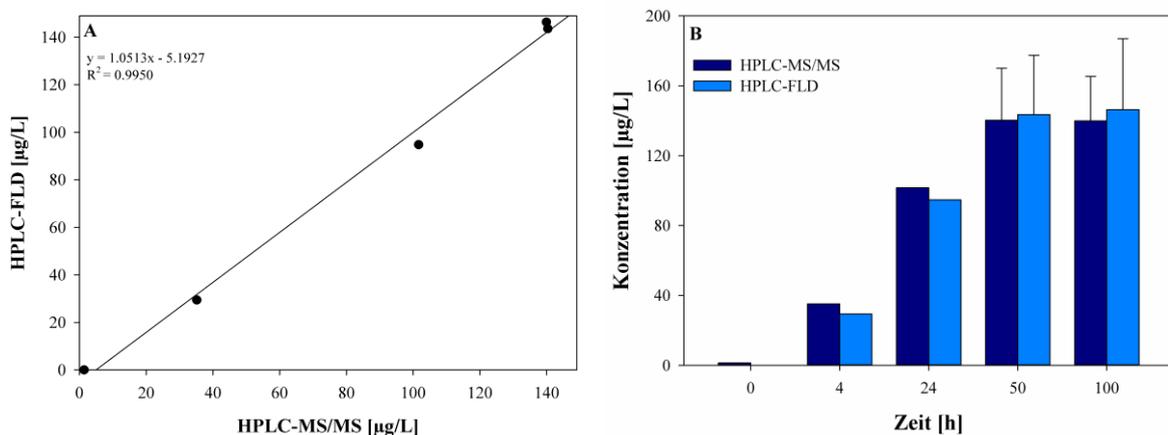


Abb. 9.2: Methodenvergleich der Enrofloxacin-Konzentrationen für die Verschleppungsdosis von 3 mg/kg KG Enrofloxacin dargestellt als Linearitätsfunktion (A) und Balkendiagramm (B) (Mittelwert + Standardabweichung für $n = 3$, für $n = 2$ Mittelwert).

Im Gegensatz zu Enrofloxacin ist die Korrelation beider Methoden für Ciprofloxacin mit einem Determinationskoeffizienten von $R^2 = 0,8635$ und einer Steigung von 0,6179 gering (Abb. 9.3 A). Dies zeigt auch der direkte Wertevergleich der Methoden (Abb. 9.3 B), bei dem

die mittels HPLC-FLD bestimmten Ciprofloxacin-Konzentrationen an allen Probenahmezeitpunkten deutlich niedriger sind.

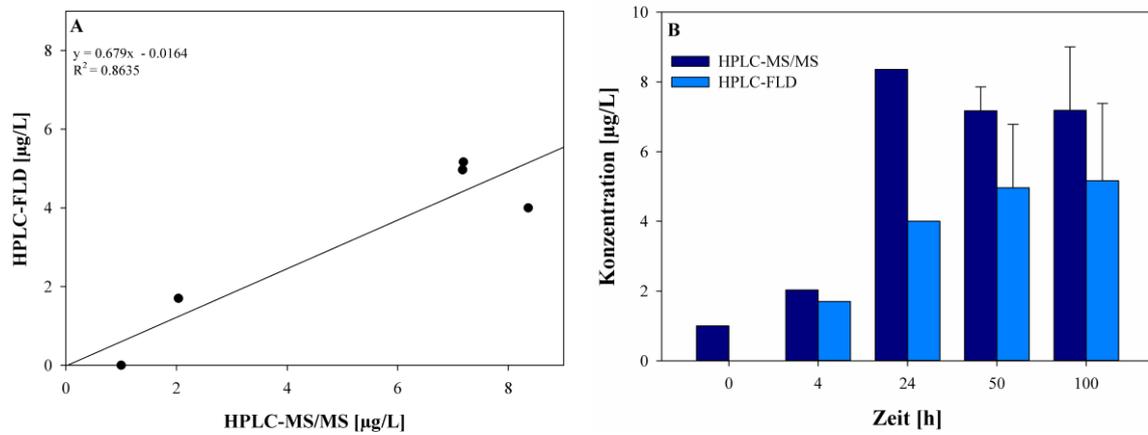


Abb. 9.3: Methodenvergleich der Ciprofloxacin-Konzentrationen für die Verschleppungsdosis von 3 mg/kg KG Enrofloxacin dargestellt als Linearitätsfunktion (A) und Balkendiagramm (B) (Mittelwert + Standardabweichung für $n = 3$, für $n = 2$ Mittelwert).

10. Stallstaub

Insgesamt wurden 86 Sedimentationsstaubproben aus Schweine- und Hühnerställen auf die Anwesenheit von Marbofloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Difloxacin untersucht. Keiner der Analyten konnte in den 46 Proben des 1. Probensets, das aus den Jahren 1982 - 2000 stammte, nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden beträchtliche Mengen an Marbofloxacin (bis zu 25,57 mg/kg) und Enrofloxacin (bis zu 1,24 mg/kg) im 2. Probenset, das aus den Jahren 2005 - 2009 stammte, quantifiziert (Tab. 10.1). Zusätzlich wurde Ciprofloxacin im Spurenbereich (0,02-0,10 mg/kg) in 10 Proben gefunden.

Der chronologische Verlauf der Konzentrationen an Marbofloxacin und Enrofloxacin in den untersuchten Sedimentationsstaubproben für Forschungsstall R ist in Abb. 10.1 dargestellt. Die detektierten Enrofloxacin-Konzentrationen sind wesentlich geringer im Vergleich zu Marbofloxacin. Lediglich im Februar 2005 und Dezember 2005 sind die Konzentrationen der beiden Antibiotika vergleichbar. Die Konzentration an Marbofloxacin ist im März 2005 sowie August 2005 am höchsten und sinkt innerhalb der beiden nachfolgenden Monate rapide ab, wodurch sich ein zweiphasiger Konzentrationsverlauf ergibt.

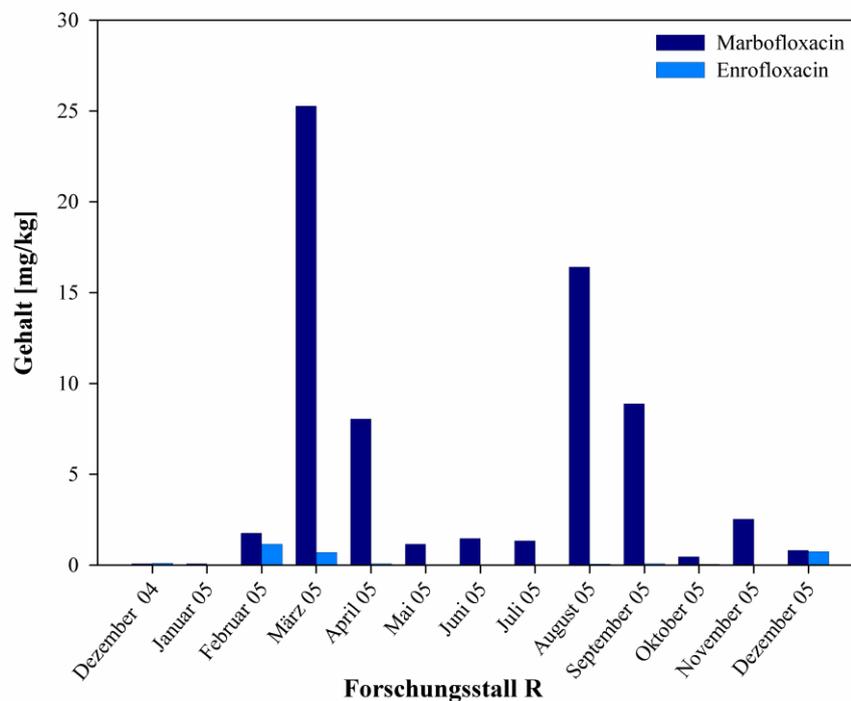


Abb. 10.1: Chronologischer Konzentrationsverlauf für Marbofloxacin und Enrofloxacin in Sedimentationsstaubproben aus dem Forschungsstall R von Dezember 2004 bis Dezember 2005.

Abbildung 10.2 zeigt den chronologischen Konzentrationsverlauf im Jahr 2009 für Marbofloxacin und Enrofloxacin in Sedimentationsstaubproben, die in den Ställen 1 (A) und 2 (B) eines Schweinemastbetriebes E entnommen wurden. Die in beiden Ställen quantifizierten Marbofloxacin-Konzentrationen sind kleiner als 0,5 mg/kg und somit mehr als Faktor 50 geringer im Vergleich zu den Proben aus dem Forschungsstall R. Jedoch sind die detektierten Enrofloxacin-Konzentrationen vergleichbar. Bis auf zwei Ausnahmen sind die analysierten Staubkonzentrationen an Enrofloxacin wie für Marbofloxacin $< 0,5$ mg/kg, steigen jedoch tendenziell für beide Ställe im Laufe des Probenahmezeitraumes an.

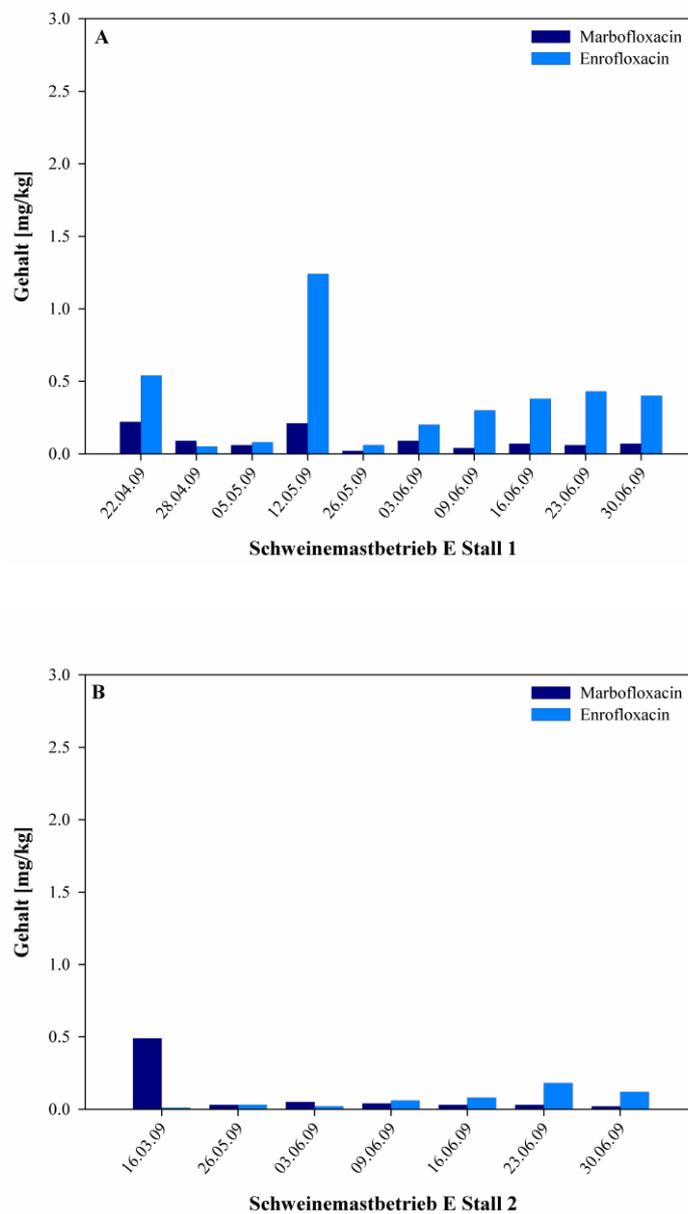


Abb. 10.2: Chronologischer Konzentrationsverlauf für Marbofloxacin und Enrofloxacin in Sedimentationsstaubproben in Stall 1 (A) und Stall 2 (B) eines Schweinemastbetriebes E im Jahr 2009.

Tab. 10.1: Fluorchinolonegehalt in 40 Sedimentationsstaubproben aus Schweineställen (MFX: Marbofloxacin, CFX: Ciprofloxacin, EFX: Enrofloxacin, DiFX: Difloxacin, BG: Bestimmungsgrenze, * < Nachweisgrenze,).

Probe	Herkunft	Probenahmezeitpunkt	Gehalt [mg/kg]			
			MFX	CFX	EFX	DiFX
1	Forschungsstall R	Dezember 2004	0,07	*	0,11	*
2		Januar 2005	0,07	*	< BG	*
3		Februar 2005	1,76	0,07	1,15	*
4		März 2005	25,57	0,10	0,71	< BG
5		April 2005	8,05	*	0,08	*
6		Mai 2005	1,15	*	< BG	*
7		Juni 2005	1,46	*	< BG	*
8		Juli 2005	1,34	*	*	*
9		August 2005	16,42	*	0,06	*
10		September 2005	8,89	*	0,08	*
11		Oktober 2005	0,46	*	0,05	*
12		November 2005	2,54	*	< BG	*
13		Dezember 2005	0,82	0,08	0,74	*
14	Schweinemastbetrieb E	Mai 2007	*	0,03	0,27	*
15		Mai 2007	*	0,03	0,12	*
16		März 2009	0,23	*	< BG	*
17		März 2009	0,15	*	0,02	*
18		April 2009	5,99	*	0,07	*
19		April 2009	0,67	*	0,21	*
20	Schweinemastbetrieb E Stall 1	22.04.2009	0,22	0,02	0,54	*
21		28.04.2009	0,09	< BG	0,05	*
22		05.05.2009	0,06	*	0,08	*
23		12.05.2009	0,21	*	1,24	*
24		26.05.2009	0,02	*	0,06	*
25		03.06.2009	0,09	*	0,20	*
26		09.06.2009	0,04	0,02	0,30	*
27		16.06.2009	0,07	0,03	0,38	*
28		23.06.2009	0,06	*	0,43	*
29		30.06.2009	0,07	0,03	0,40	*
30	Schweinemastbetrieb E Stall 2	16.03.2009	0,49	*	< BG	*
31		26.05.2009	0,03	*	0,03	*
32		03.06.2009	0,05	*	0,02	*
33		09.06.2009	0,04	*	0,06	*
34		16.06.2009	0,03	*	0,08	*
35		23.06.2009	0,03	0,04	0,18	*
36		30.06.2009	0,02	*	0,12	*
37		Schweinemastbetrieb V	04.01.2000	*	*	*
38	24.01.2000		*	*	*	*
39	14.02.2000		*	*	*	*
40	13.03.2000		*	*	*	*

11. Identifizierung möglicher Enrofloxacin-Metaboliten in Hühnerfaeces

Faecesproben wurden auf die Anwesenheit von 10 Metaboliten (1-10), die von dem Basidiomyceten *Gloeophyllum striatum* gebildet werden können (Wetzstein *et al.* 1997), sowie 3 bekannte Ciprofloxacin-Metaboliten (Desethylen-Ciprofloxacin (11), Sulfo-Ciprofloxacin (12), Oxo-Ciprofloxacin (13), (Scholl *et al.* 1987) und auf das bisher nur in Schweinen detektierte Enrofloxacin-N-Oxid ((14), Lykkeberg 2006) hin untersucht (Abb. 11.1). Dabei dienten Untersuchungen mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie zunächst als Screeningmethode für mögliche Metaboliten in Hühnerfaeces. Die Ergebnisse wurden durch die Verwendung hochauflösender Massenspektrometrie (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific) verifiziert und die exakte Masse sowie Summenformel bestimmt.

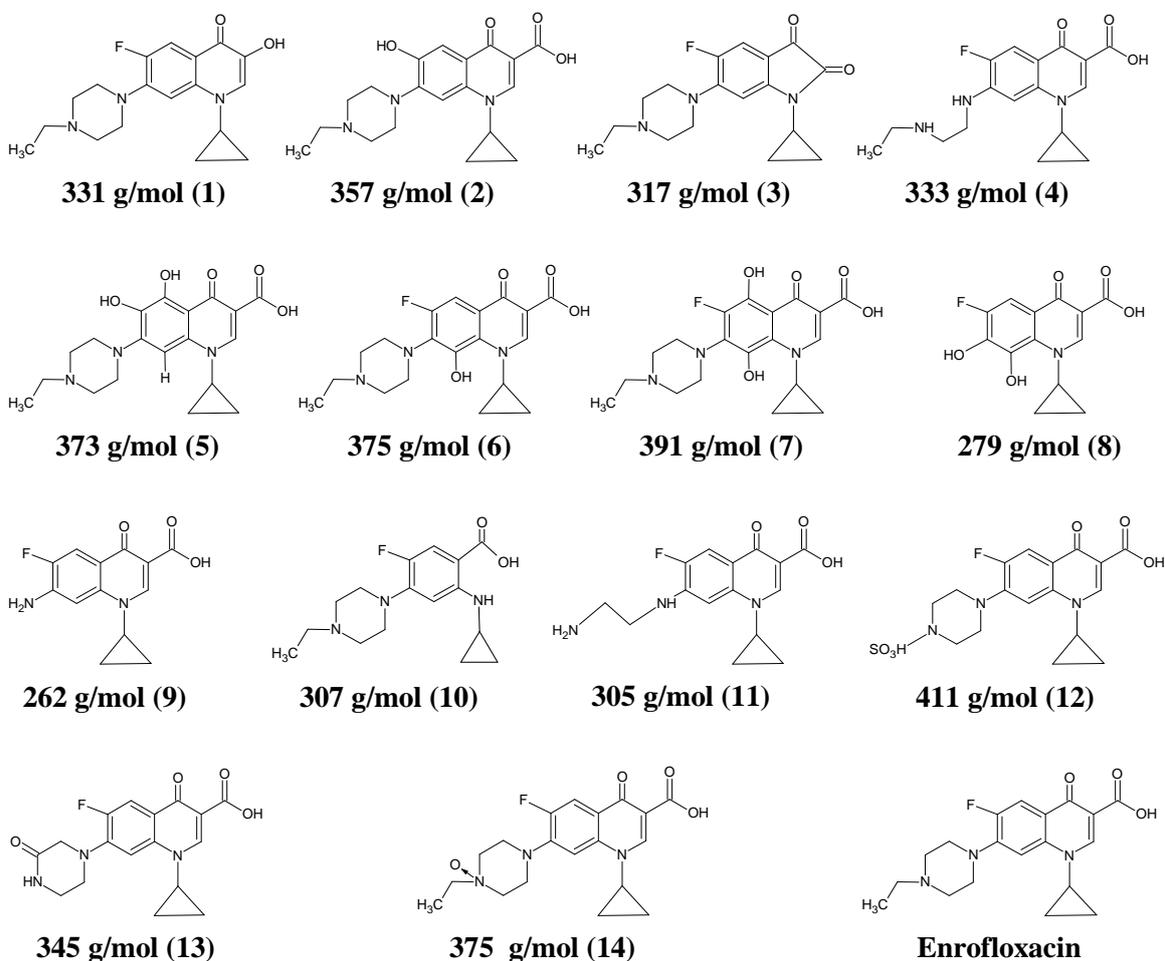


Abb. 11.1: Mögliche Metaboliten in Hühnerfaeces (1-10: vom Basidiomyceten *Gloeophyllum striatum* bekannt (Wetzstein *et al.* 1997), 11-13: Ciprofloxacin-Metaboliten (Scholl *et al.* 1987) und 14: Enrofloxacin-N-Oxid (Lykkeberg 2006).

11.1 Messungen mit Triple-Quadrupol-Massenspektrometer

Die massenspektrometrische Fragmentierung von Enrofloxacin beruht hauptsächlich auf der Abspaltung von Wasser, Kohlenstoffdioxid, Cyclopropan (C_3H_4), Piperazin oder Kohlenmonoxid. Daher wurden ausgehend von der Struktur der zu untersuchenden Metaboliten in Hühnerfaeces charakteristische Produktionen, die durch die oben genannten Fragmentierungsreaktionen generiert werden könnten, in Betracht gezogen, so dass eine spezifische Detektion mittels SRM möglich war. In Tab. 11.1 sind die charakteristischen Produktionen sowie die Fragmentierungsreaktion/en für jeden untersuchten Metaboliten dargestellt, die in der Probe detektiert werden konnten.

Tab. 11.1: Charakteristische Produktionen sowie Fragmentierungsreaktion möglicher Metaboliten in Hühnerfaeces. Retentionszeiten der untersuchten Metaboliten in Leermatrix, Matrix Standard und Probe (Teil 1, gelb hinterlegt: zusätzliche Peaks in der Probe im Vergleich zu Leermatrix und Matrix Standard).

Möglicher Metabolit [M+H] ⁺	Mögliches Produktion [m/z]	Abspaltung von									Retentionszeit Matrixblank	Retentionszeit Matrixstandard	Retentionszeit Faecesprobe
		CO ₂	H ₂ O	C ₄ H ₉ N	C ₃ H ₄	CO	OH	C ₂ H ₇ N	C ₂ H ₃ NO	C ₂ H ₅ O ₃ NS	[min]	[min]	[min]
263,4 (9)	245,4		X										
	195,4				X	X							
	179,4	X			X						7,9	3,7	7,4
	177,4		X		X	X						7,8	7,9
	151,4	X				X							
280,4 (8)	262,4		X								2,2	2,0	
	236,4	X									5,5	7,5	7,9
	196,4	X			X						7,9	7,9	
	168,4	X			X	X							
306,4 (11)	289,4								X				
	288,4		X										
	271,4		X						X			3,5	
	262,4	X									7,9	7,4	7,9
	248,4		X		X							7,8	
	231,4		X		X				X				
308,4 (10)	222,4	X			X								
	290,4		X										
	237,4			X									
	224,4	X			X						7,9	3,2	7,8
	196,4	X			X	X						7,8	
	179,4		X	X	X								
318,4 (3)	151,4		X	X	X	X							
	290,4					X							
	250,4				X	X						1,5	1,3
	247,4			X							1,2	2,5	3,0
	179,4			X	X	X					7,9	7,8	5,5

Tab. 11.2: Charakteristische Produktionen sowie Fragmentierungsreaktion möglicher Metaboliten in Hühnerfaeces. Retentionszeiten der untersuchten Metaboliten in Leermatrix, Matrix Standard und Probe (Teil 2, gelb hinterlegt: zusätzliche Peaks in der Probe im Vergleich zu Leermatrix und Matrix Standard).

Möglicher Metabolit [M+H] ⁺	Mögliches Produktion [m/z]	Abspaltung von									Retentionszeit Matrixblank	Retentionszeit Matrixstandard	Retentionszeit Faecesprobe
		CO ₂	H ₂ O	C ₄ H ₉ N	C ₃ H ₄	CO	OH	C ₂ H ₇ N	C ₂ H ₃ NO	C ₂ H ₅ O ₃ NS	[min]	[min]	[min]
332,4 (1)	314,4		X										
	261,4			X								1,1	1,2
	246,4		X		X	X					1,3	4,5	2,8
	243,4		X	X							7,9	7,4	4,6
	203,4		X	X	X							7,8	7,8
	193,4			X	X	X							
	175,4		X	X	X	X							
334,4 (4)	316,4		X										
	290,4	X											
	289,4							X				1,3	
	271,4		X					X				3,3	
	249,4		X					X				3,8	1,3
	245,4	X						X			7,9	4,5	4,5
	243,4		X			X		X				4,5	7,8
	231,4		X		X			X				7,4	
	221,4		X		X	X						7,8	
	205,4	X			X			X					
203,4		X		X	X		X						
346,4 (13)	328,4		X										
	302,4	X											
	245,4	X							X				1,5
	231,4		X		X				X		1,6	1,6	2,1
	221,4				X	X			X		7,9	4,3	4,5
	205,4	X			X				X		7,9	7,8	5,7
	203,4		X		X	X			X				7,5
	177,4	X			X	X			X				7,8
	175,4		X		X	XX			X				

Tab. 11.1: Charakteristische Produktionen sowie Fragmentierungsreaktion möglicher Metaboliten in Hühnerfaeces. Retentionszeiten der untersuchten Metaboliten in Leermatrix, Matrix Standard und Probe (Teil 3, gelb hinterlegt: zusätzliche Peaks in der Probe im Vergleich zu Leermatrix und Matrix Standard).

Möglicher Metabolit [M+H] ⁺	Mögliches Produktion [m/z]	Abspaltung von									Retentionszeit	Retentionszeit	Retentionszeit
		CO ₂	H ₂ O	C ₄ H ₉ N	C ₃ H ₄	CO	OH	C ₂ H ₇ N	C ₂ H ₃ NO	C ₂ H ₅ O ₃ NS	Matrixblank [min]	Matrixstandard [min]	Faecesprobe [min]
358,4 (2)	340,4		X										
	287,4				X								
	274,4	X				X						1,2	1,2
	272,4		X			X	X				1,3	3,3	3,5
	269,4		X	X							7,9	5,4	5,6
	247,4			X	X							7,8	7,9
	243,4	X		X									
	229,4		X	X	X								
	201,4		X	X	X	X							
374,4 (5)	356,4		X										
	303,4				X								
	285,4		X	X									
	259,4	X		X									2,5
	245,4		X	X	X					7,9	7,9		5,8
	235,4			X	X	X							7,9
	219,4	X		X	X								
	217,4		X	X	X	X							
191,4	X		X	X	X								
376,4 (6)	358,4		X										
	332,4	X											1,3
	305,4				X							1,2	4,3
	287,4		X	X						1,3	5,5		5,5
	261,4	X		X						7,9	7,1		6,6
	247,4		X	X	X						7,8		7,1
	221,4	X		X	X								7,8
	219,4		X	X	X	X							

Tab. 11.1: Charakteristische Produktionen sowie Fragmentierungsreaktion möglicher Metaboliten in Hühnerfaeces. Retentionszeiten der untersuchten Metaboliten in Leermatrix, Matrix Standard und Probe (Teil 4).

Möglicher Metabolit [M+H] ⁺	Mögliches Produktion [m/z]	Abspaltung von									Retentionszeit Matrixblank [min]	Retentionszeit Matrixstandard [min]	Retentionszeit Faecesprobe [min]
		CO ₂	H ₂ O	C ₄ H ₉ N	C ₃ H ₄	CO	OH	C ₂ H ₇ N	C ₂ H ₅ O ₃ NS	C ₄ H ₉ NO			
376,4 (14)	358,4		X										
	332,4	X											
	261,4					X				X		1,7	1,7
	249,4				X					X		5,5	5,5
	231,4		X		X					X	7,9	6,5	6,5
	221,4				X	X				X		7,1	7,1
	205,4	X			X					X		7,9	7,9
	203,4		X		X	X				X			
	177,4	X			X	X				X			
392,4 (7)	374,4		X										
	348,4	X											
	321,4			X									
	306,4		X		X	X							
	281,4			X	X						7,9	5,5	5,5
	263,4		X	X	X							7,8	7,9
	253,4			X	X	X							
	237,4	X		X	X								
	235,4		X	X	X	X							
	209,4	X		X	X	X							
412,4 (12)	394,4		X										
	300,4	X			X	X							
	289,4								X				
	271,4		X						X				
	249,4				X				X		7,9	7,9	7,9
	245,4	X							X				
	231,4		X		X				X				
	221,4				X	X			X				
	203,4		X		X	X			X				

Um eine Beurteilung über die Anwesenheit von Metaboliten in der Probe zu ermöglichen, wurden die TIC-Chromatogramme (Summe aller Massenübergänge eines Metaboliten) von einer extrahierten Leermatrixprobe, einem Matrix Standard und einer Faecesprobe (Huhn 2, 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h) übereinander gelegt. Es wurde Huhn 2 ausgewählt, da es im Vergleich zu den anderen Tieren dieser Gruppe eine hohe Metabolisierung des Enrofloxacins aufweist. Die Ergebnisse (Abb. 11.2 - 11.6) zeigen, dass für fünf mögliche Metaboliten (m/z 318, 332, 346, 374 und 376) in der Faecesprobe mindestens ein zusätzlicher Peak vorhanden ist, der weder in der Leermatrixprobe noch im Matrix Standard detektiert wurde.

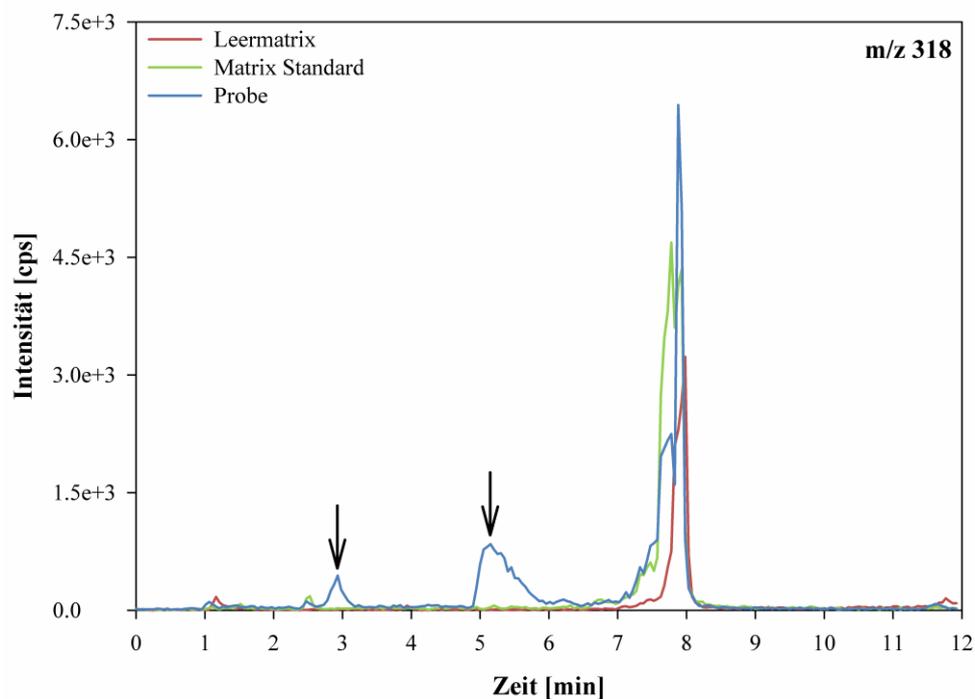


Abb. 11.2: TIC-Chromatogramme des möglichen Metaboliten m/z 318 (3) für eine Leermatrixprobe, einen Matrixstandard sowie eine Faecesprobe (Huhn 2, 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h, ↓ zusätzliche Peaks bei Messung der Faecesprobe im Vergleich zu Leermatrix und Matrix Standard).

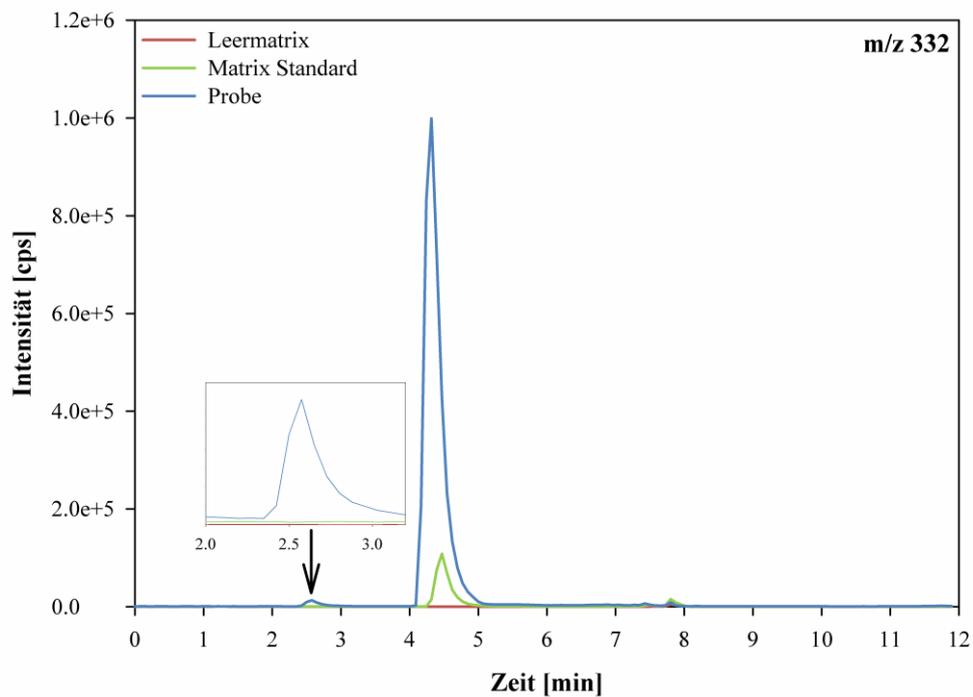


Abb. 11.3: TIC-Chromatogramme des möglichen Metaboliten m/z 332 (1) für eine Leermatrixprobe, einen Matrixstandard sowie eine Faecesprobe (Huhn 2, 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h, ↓ zusätzliche Peaks bei Messung der Faecesprobe im Vergleich zu Leermatrix und Matrix Standard).

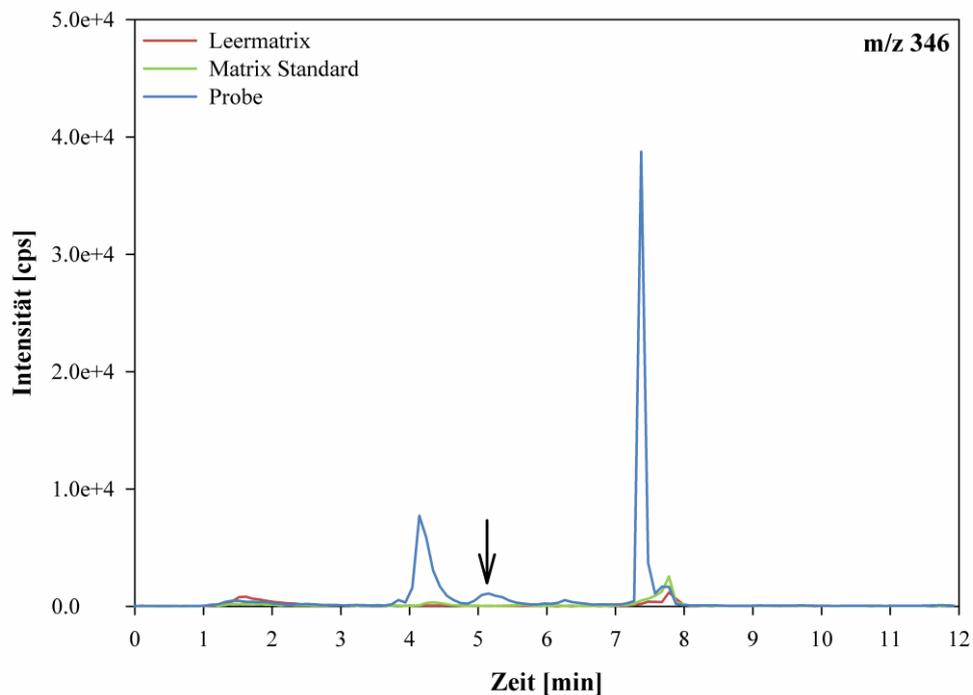


Abb. 11.4: TIC-Chromatogramme des möglichen Metaboliten m/z 346 (13) für eine Leermatrixprobe, einen Matrixstandard sowie eine Faecesprobe (Huhn 2, 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h, ↓ zusätzliche Peaks bei Messung der Faecesprobe im Vergleich zu Leermatrix und Matrix Standard).

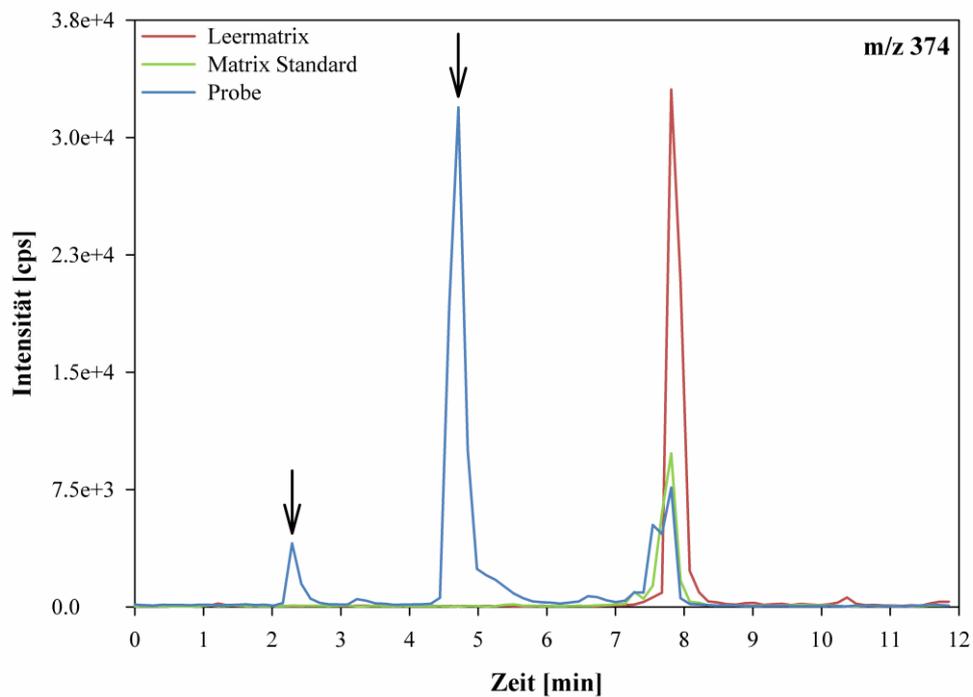


Abb. 11.5: TIC-Chromatogramme des möglichen Metaboliten m/z 374 (5) für eine Leermatrixprobe, einen Matrixstandard sowie eine Faecesprobe (Huhn 2, 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h, ↓ zusätzliche Peaks bei Messung der Faecesprobe im Vergleich zu Leermatrix und Matrix Standard).

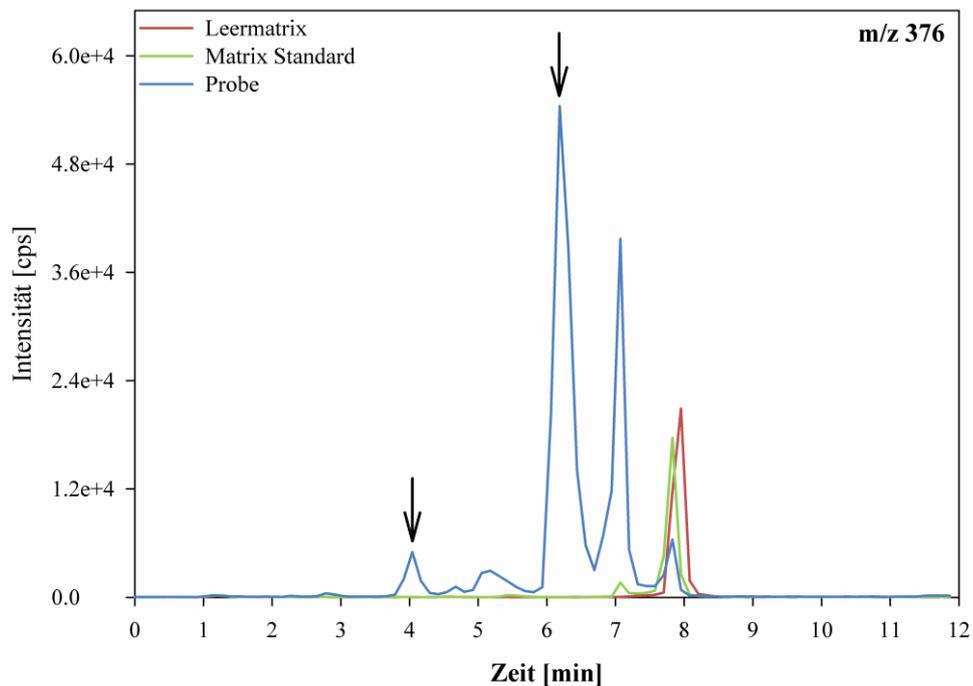


Abb. 11.6: TIC-Chromatogramme des möglichen Metaboliten m/z 376 (6) für eine Leermatrixprobe, einen Matrixstandard sowie eine Faecesprobe (Huhn 2, 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h, ↓ zusätzliche Peaks bei Messung der Faecesprobe im Vergleich zu Leermatrix und Matrix Standard).

Die Metabolisierung von Enrofloxacin ist individuen-spezifisch und kann dementsprechend stark variieren. In der Versuchsgruppe, die mit der empfohlenen Dosis von 10 mg/kg KG Enrofloxacin behandelt wurde, befand sich ein Tier (Huhn 2) mit einer vergleichsweise hohen Metabolisierung. Daher ist davon auszugehen, wenn es sich bei den zusätzlichen Peaks um Metaboliten handelt, dass die absoluten Peakflächen für die Probe des Tieres mit einer hohen Metabolisierung im Vergleich zu den anderen beiden Tieren der Versuchsgruppe (Huhn 1 und 3), höher sein müssten. Des Weiteren wurden die relativen Intensitäten (bezogen auf den intensivsten Massenübergang) der Massenübergänge für die fünf möglichen Metaboliten aller drei Proben miteinander verglichen (Tab. 11.2).

Tab. 11.3: Vergleich der absoluten Peakflächen sowie relativen Intensitäten für Massenübergänge, der fünf in Frage kommenden Metaboliten (m/z 318, 332, 346, 374 und 376) in Faecesproben von drei unterschiedlichen Tieren (Huhn 1, Huhn 2, Huhn 3).

Möglicher Metabolit [M+H] ⁺	Mögliches Produktion [m/z]	Peakfläche [counts]			Relative Intensität [%]		
		Huhn 1	Huhn 2	Huhn 3	Huhn 1	Huhn 2	Huhn 3
318,4 (3)	290,4	1927	3852	3110	12,6	17,7	16,0
	247,4	15335	21762	19475	100,0	100,0	100,0
332,4 (1)	261,4	29325	183330	61044	100,0	100,0	100,0
	246,4	178	1200	477	0,6	0,7	0,8
	243,4	544	1941	908	1,9	1,1	1,5
346,4 (13)	328,4	520	1590		3,1	100,0	
	221,4	1085	145	448	6,4	9,1	5,5
	205,4	17005	1103	8121	100,0	69,4	100,0
	177,4	2489	1511	2509	14,6	95,0	30,9
374,4 (5)	356,4	25083	36561	32633	100,0	100,0	100,0
	303,4	1319	1913	1993	5,3	5,2	6,1
	285,4		2133	2213		5,8	6,8
	259,4	1168	1691	1649	4,7	4,6	5,1
	245,4	1574	2184	1531	6,3	6,0	4,7
	235,4	329	642	509	1,3	1,8	1,6
	219,4	648	1419	837	2,6	3,9	2,6
	217,4	797	1460	869	3,2	4,0	2,7
191,4	622	667	478	2,5	1,8	1,5	
376,4 (6)	358,4	13246	170659	31173	52,8	36,3	42,1
	332,4	25078	469824	74004	100,0	100,0	100,0
	305,4	1126	23891	4093	4,5	5,1	5,5
	287,4	4661	64592	11621	18,6	13,7	15,7
	261,4	14475	253975	39405	57,7	54,1	53,2
	247,4	341	5199	830	1,4	1,1	1,1
	221,4	239	3723	840	1,0	0,8	1,1
219,4	420	6270	851	1,7	1,3	1,1	

Metabolit m/z 318 (3)

Die Ergebnisse zeigen, dass die relativen Intensitäten sowie absoluten Peakflächen für die drei untersuchten Faecesproben ähnlich sind d. h. die absoluten Peakflächen des Tieres mit einer höheren Metabolisierung sind nur geringfügig größer. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser Masse nicht um einen Metaboliten von Enrofloxacin handelt.

Metabolit m/z 332 (1)

Die relativen Intensitäten der untersuchten Massenübergänge sind in allen drei Proben vergleichbar, was dafür spricht, dass die gleiche Substanz detektiert wurde. Des Weiteren sind die absoluten Peakflächen für die Massenübergänge in der Probe des Tieres mit einer hohen Metabolisierung im Vergleich zu den beiden anderen Proben Faktor 4-7 größer. Daher ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dieser Masse um einen Metaboliten von Enrofloxacin handelt.

Metabolit m/z 346 (13)

Diese Masse konnte zwar in allen drei Proben als zusätzlicher Peak detektiert werden. Jedoch sprechen weder die absoluten Peakflächen noch die relativen Intensitäten dafür, dass es sich bei dieser Masse um einen Metaboliten handelt.

Metabolit m/z 374 (5)

Die absoluten Peakflächen wie auch die relativen Intensitäten der Massenübergänge aller drei untersuchten Proben sind miteinander vergleichbar. Daher handelt es sich bei dieser Masse wahrscheinlich nicht um einen Metaboliten von Enrofloxacin.

Metabolit m/z 376 (6)

Bis auf den Massenübergang $m/z\ 376 \rightarrow m/z\ 358$ sind die relativen Intensitäten für alle drei Proben in einem ähnlichen Bereich. Jedoch sind die absoluten Peakflächen für die Probe des Tieres mit einer stärkeren Metabolisierung wesentlich höher. Daher könnte es sich bei dieser Masse um einen Metaboliten von Enrofloxacin handeln.

11.2 Messungen mit hochauflösendem Massenspektrometer

Die mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometer erzielten Ergebnisse deuten auf das Vorhandensein der beiden möglichen Metaboliten $m/z\ 332\ (1)$ und $m/z\ 376\ (6)$ hin. Daher wurden weitere Messungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Zusätzlich wurden die Proben auf die möglichen

Metaboliten m/z 318 (3), m/z 346 (13) und m/z 374 (5) untersucht, da eine abschließende Bewertung auf ihr Vorhandensein in Faecesproben mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie nicht möglich war. Mittels Q Exactive wurden eine Leermatrixprobe, ein Matrix Standard sowie drei Faecesproben (Huhn 1, Huhn 2 und Huhn 3) untersucht. Sowohl in der Leermatrixprobe als auch im Matrix Standard wurden keine der fünf möglichen Metaboliten detektiert (Anhang).

Die drei untersuchten Faecesproben wurden bezüglich der Retentionszeiten der möglichen Metaboliten, Signalintensität sowie Fragmentierungsschema miteinander verglichen. Für jeden der in Frage kommenden Metaboliten ist exemplarisch ein Extracted Ion Chromatogramm, ein Massenspektrum und ein Fragmentierungsspektrum dargestellt. Zur Trennung der Analyten wurde analog zu den Messungen mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometer ein UHPLC-System von Dionex und eine Phenyl-Hexyl-Säule verwendet, wodurch die Retentionszeiten der möglichen Metaboliten verglichen werden konnten.

Metabolit m/z 318,1608 (3)

Übereinstimmend mit den Voruntersuchungen wurde bei 2,80 min ein schwaches Signal für die untersuchte Masse detektiert (Abb. 11.7). Jedoch konnten in den beiden zusätzlich gemessenen Faecesproben keine Signale bei dieser Retentionszeit detektiert werden. Im Massenspektrum ist die Masse von m/z 318,1614 dominierend. Der Anteil anderer Massen ist jedoch ebenfalls hoch (Abb. 11.8). Das Fragmentierungsspektrum zeigt mit m/z 247,1285 (Abspaltung C_4H_9N), m/z 232,0588 (Abspaltung H_2O , C_3H_4 , CO) und m/z 219,0929 (Abspaltung C_4H_9N , CO) drei spezifische Produktionen (Abb. 11.9). Dennoch handelt es sich bei dieser Masse wahrscheinlich um keinen Metaboliten von Enrofloxacin, da das detektierte Signal sehr schwach war und zudem nicht in den zusätzlich untersuchten Faecesproben bei einer Retentionszeit von 2,80 min detektiert werden konnte.

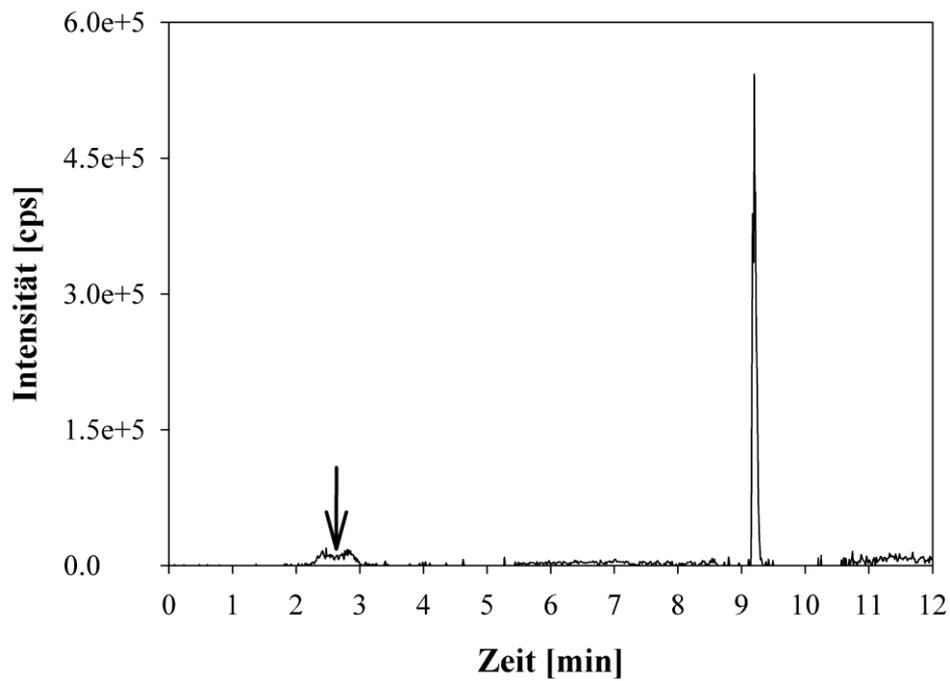


Abb. 11.7: Extracted Ion Chromatogramm für die Masse m/z $318,1608 \pm 0,0032$ (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

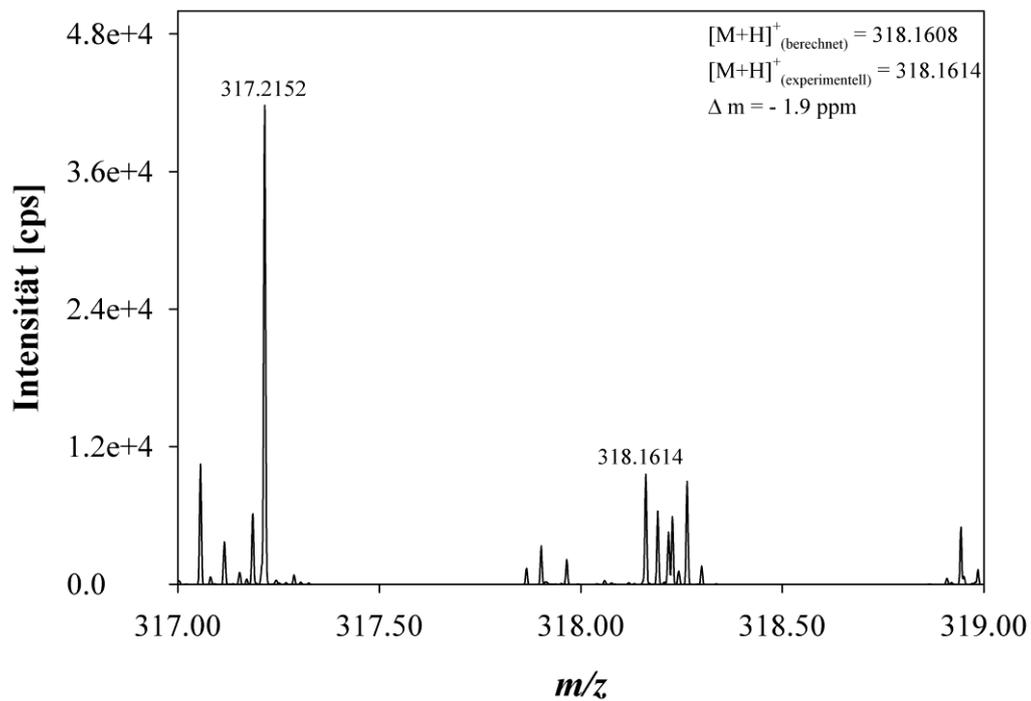


Abb. 11.8: Massenspektrum für den möglichen Metaboliten m/z $318,1608 \pm 1$ amu zwischen 2,30 und 2,93 min (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

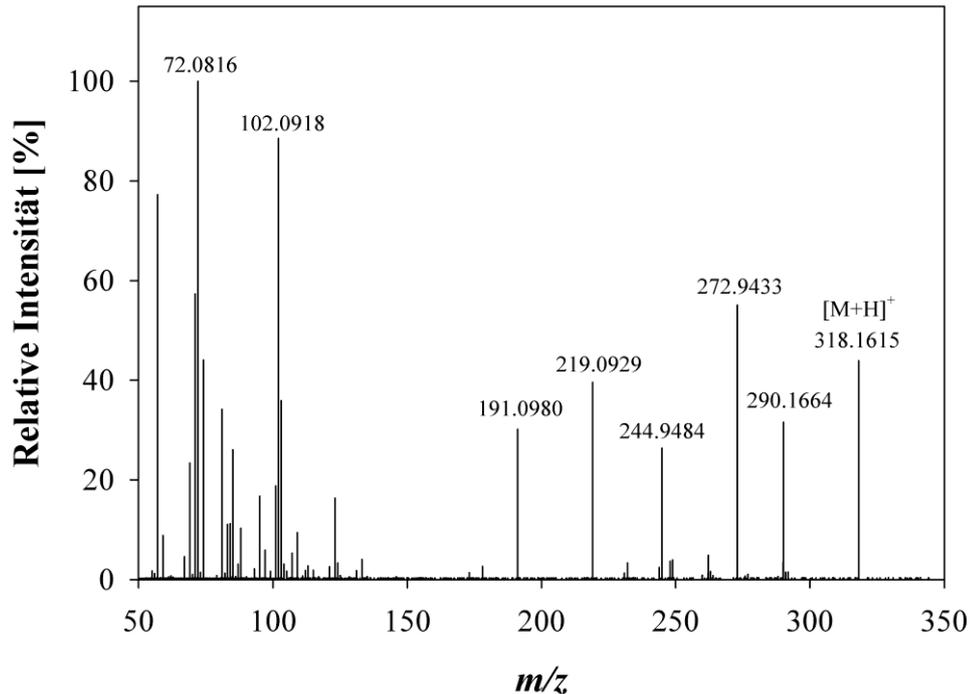


Abb. 11.9: Fragmentierungsspektrum zwischen 2,30 und 2,97 min für die Masse m/z 318,1615 (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

Metabolit m/z 332,1764 (1)

Übereinstimmend mit den Voruntersuchungen wurde bei 2,30 min in allen drei gemessenen Faecesproben ein Signal für die untersuchte Masse detektiert (Abb. 11.10). Entsprechend den Messungen mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometer sind die absoluten Intensitäten in der Probe des Tieres mit einer hohen Metabolisierung im Vergleich zu den beiden anderen Proben um einen Faktor 8 - 11 größer. Die dominierende Masse im Massenspektrum aller drei Faecesproben ist m/z 332,1767 (Abb. 11.11). Jedoch trägt – insbesondere für die Proben von Huhn 1 und 3 – ebenso die Masse von m/z 332,1406 stark zum Massenspektrum bei. Diese Masse entspricht Ciprofloxacin und wie Abb. 11.12 zeigt, eluiert Ciprofloxacin bereits ab ca. 2,00 min womit die Anwesenheit dieser Masse zu erklären ist. Jedoch erschwert dies auch die Interpretation des Fragmentierungsspektrums (Abb. 11.13), da es nicht nur die Fragmentierung für m/z 332,1767 beinhaltet. Dennoch können mit m/z 261,1034 (Abspaltung C_4H_9N) und m/z 220,0644 (Abspaltung C_4H_9N , C_3H_4) in allen drei untersuchten Faecesproben zwei charakteristische Produktionen detektiert werden. Auf Grund der übereinstimmenden Detektion dieser Masse bei 2,30 min in allen drei untersuchten Proben, der Intensitätsunterschiede sowie der zwei charakteristischen Produktionen handelt es sich bei dieser Masse wahrscheinlich um einen Metaboliten von Enrofloxacin.

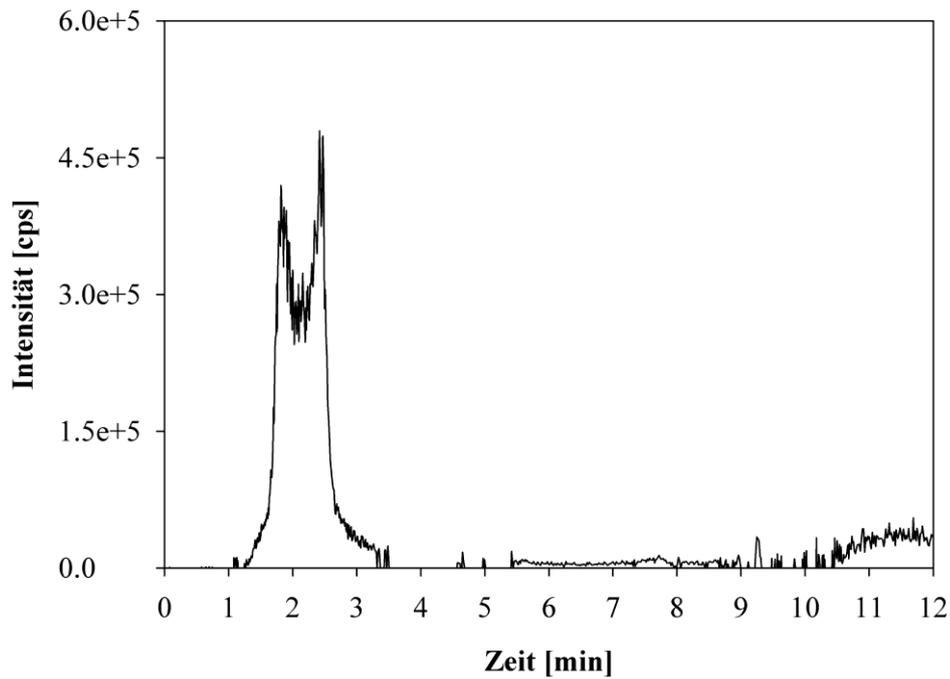


Abb. 11.10: Extracted Ion Chromatogramm für die Masse m/z $332,1764 \pm 0,0033$ (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

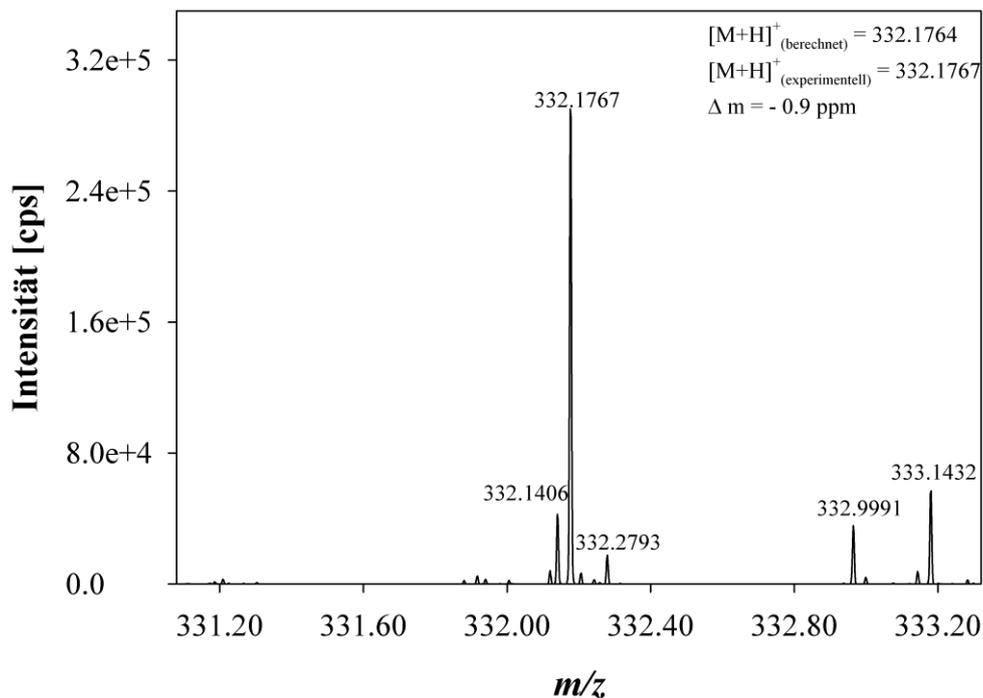


Abb. 11.11: Massenspektrum für den möglichen Metaboliten m/z $332,1764 \pm 1$ amu zwischen 1,76 und 1,94 min (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

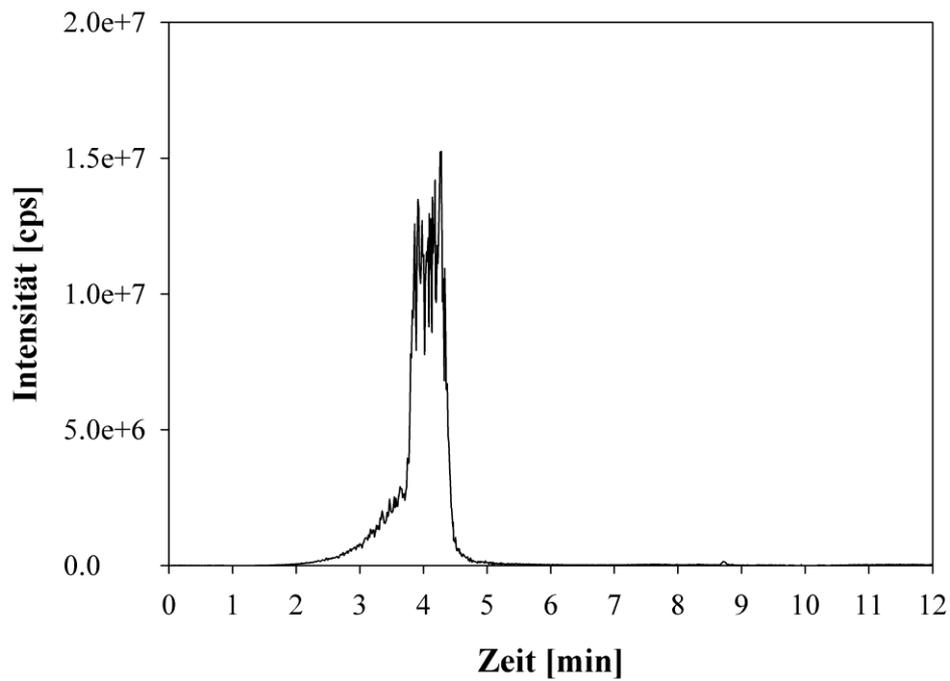


Abb. 11.12: Extracted Ion Chromatogramm für die Masse m/z $332,1410 \pm 0,0033$ (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

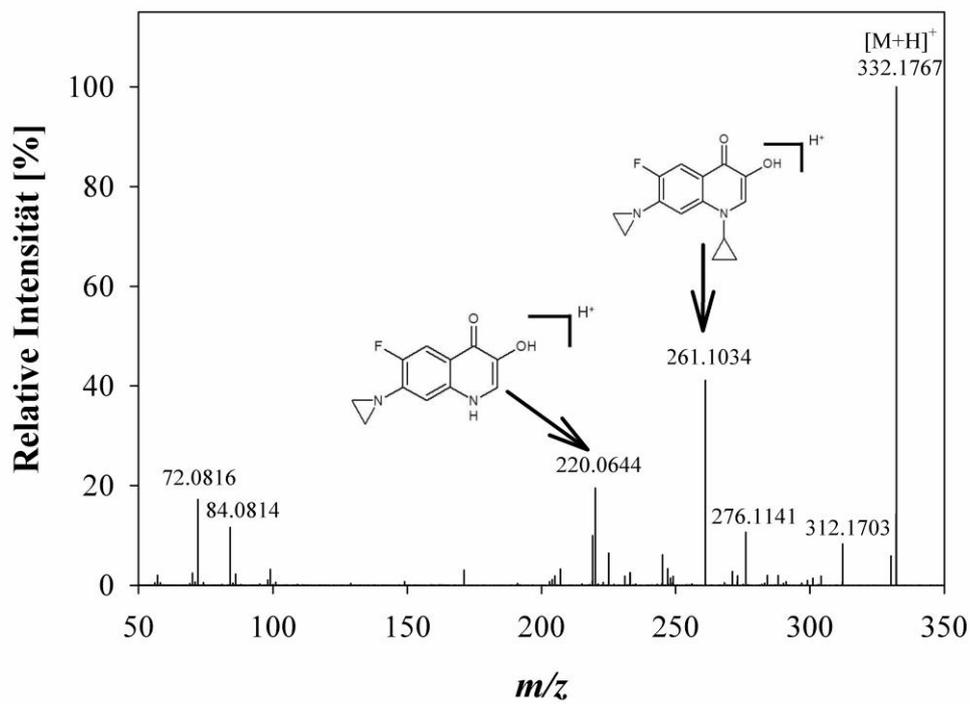


Abb. 11.13: Fragmentierungsspektrum zwischen 1,74 und 1,91 min für die Masse m/z 332,1767 (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

Metabolit m/z 346,1194 (13)

In den Extracted-Ion Chromatogrammen der drei untersuchten Faecesproben wurde übereinstimmend bei 8,66 min ein Signal mit ähnlicher Intensität für die untersuchte Masse detektiert (Abb. 11.14). Das Ergebnis deckt sich nicht mit den Voruntersuchungen, da auf Grund der Struktur des möglichen Metaboliten mit einer früheren Retentionszeit zu rechnen ist (siehe 11.1). Des Weiteren zeigt das Massenspektrum weitere dominierende Massen in diesem Elutionsbereich (Abb. 11.15). Außerdem wurden im Fragmentierungsspektrum keine charakteristischen Produktionen detektiert (Abb. 11.16). Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser Masse nicht um einen Metaboliten von Enrofloxacin handelt.

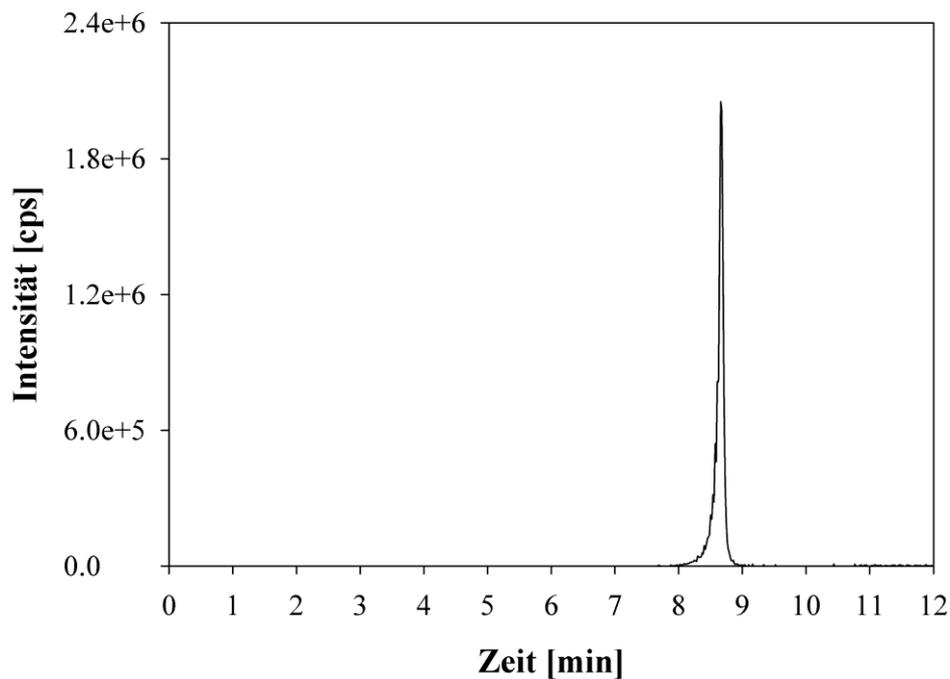


Abb. 11.14: Extracted Ion Chromatogramm für die Masse $m/z\ 346,1194 \pm 0,0035$ (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

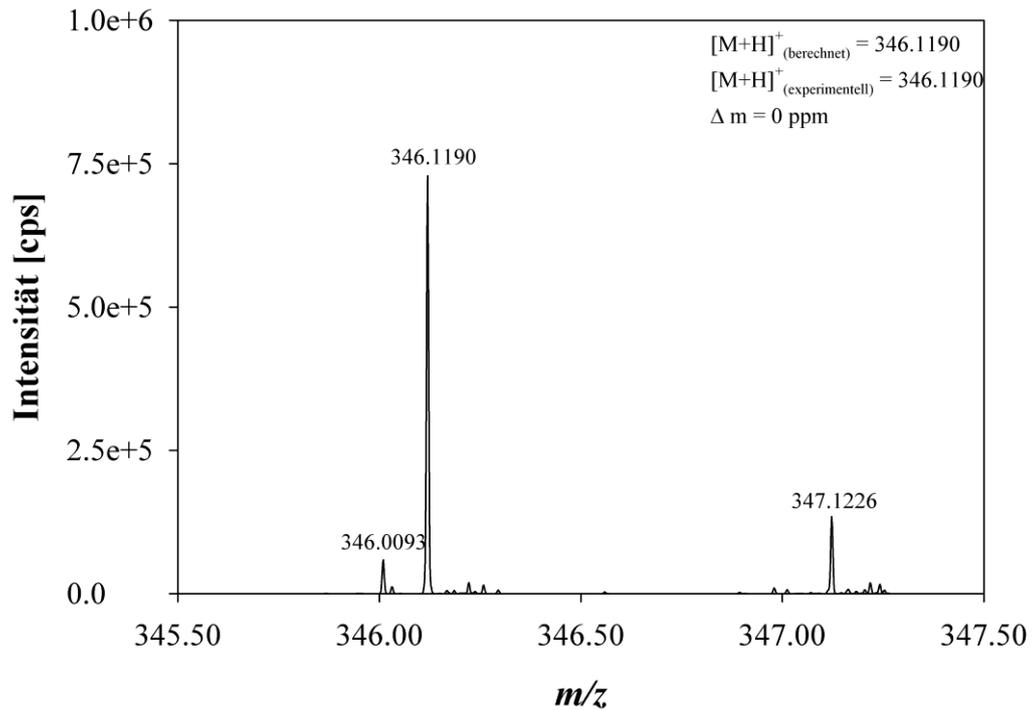


Abb. 11.15: Massenspektrum für den möglichen Metaboliten m/z $346,1194 \pm 1$ amu bei 8,66 min (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

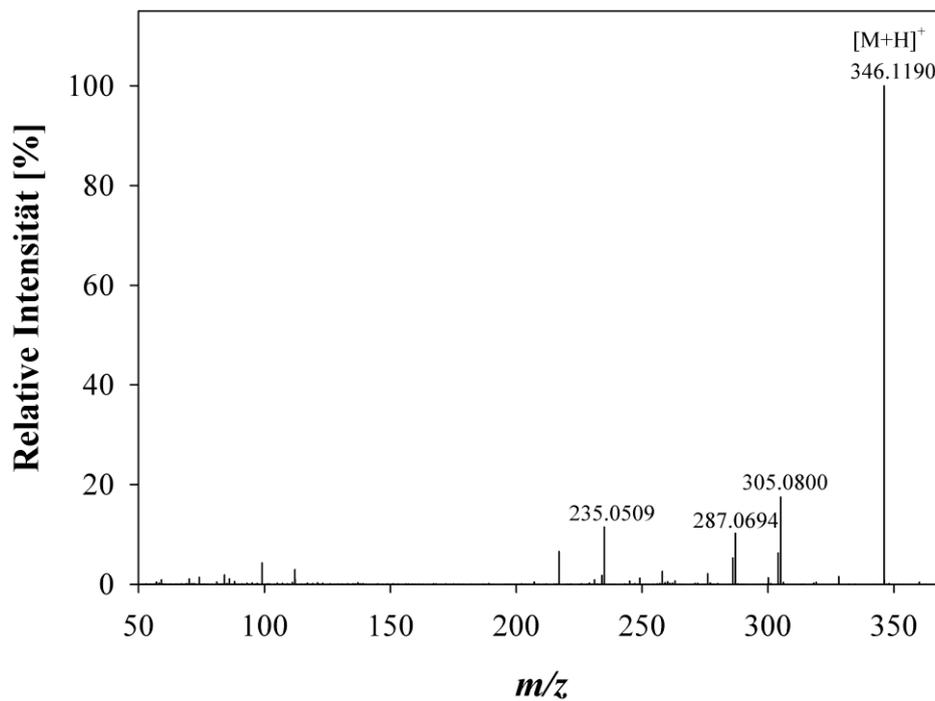


Abb. 11.16: Fragmentierungsspektrum zwischen 8,53 und 8,77 min für die Masse m/z 346,1190 (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

Metabolit m/z 374,1705 (5)

In allen drei untersuchten Proben konnte für die Masse m/z 374,1705 ein Peak bei 4,50 min detektiert werden (Abb. 11.17). Dieses Ergebnis ist mit den Voruntersuchungen in Übereinstimmung. Des Weiteren ist – wie zu erwarten – die absolute Signalintensität für die beiden Proben mit einer vergleichsweise niedrigeren Metabolisierung (ca. Faktor 10) geringer. Im Massenspektrum ist die Masse m/z 374,1705 dominierend (Abb. 11.18). Zusätzlich weist das Fragmentierungsspektrum mit m/z 303,0974 (Abspaltung C_4H_9N) und m/z 257,0917 (Abspaltung H_2O , C_4H_9N , CO) zwei charakteristische Produktionen auf (Abb. 11.19). Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser Masse um einen Metaboliten von Enrofloxacin handelt.

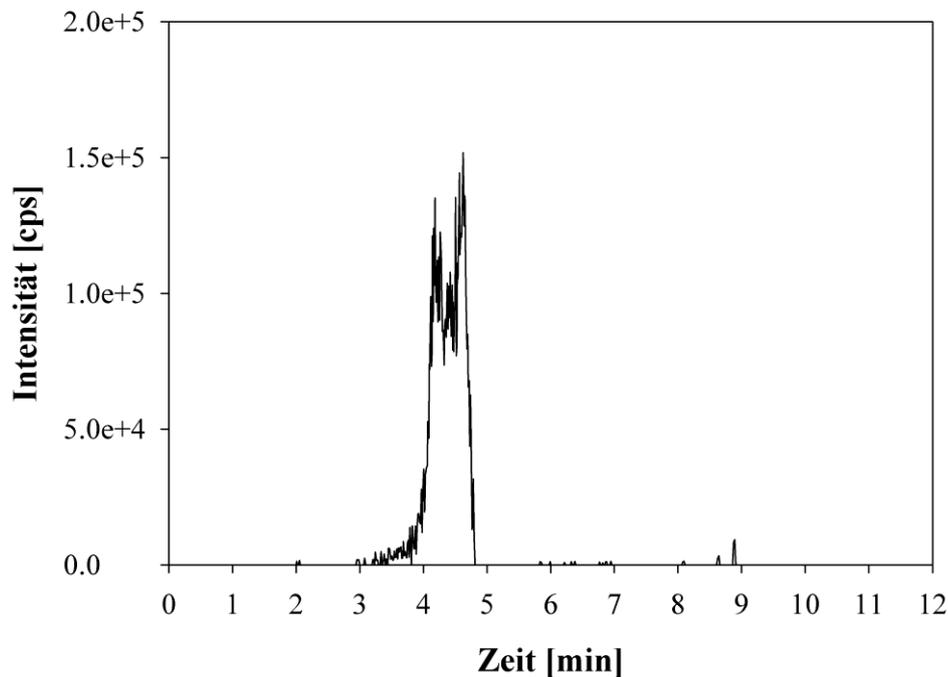


Abb. 11.17: Extracted Ion Chromatogramm für die Masse m/z 374,1705 \pm 0,0037 (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

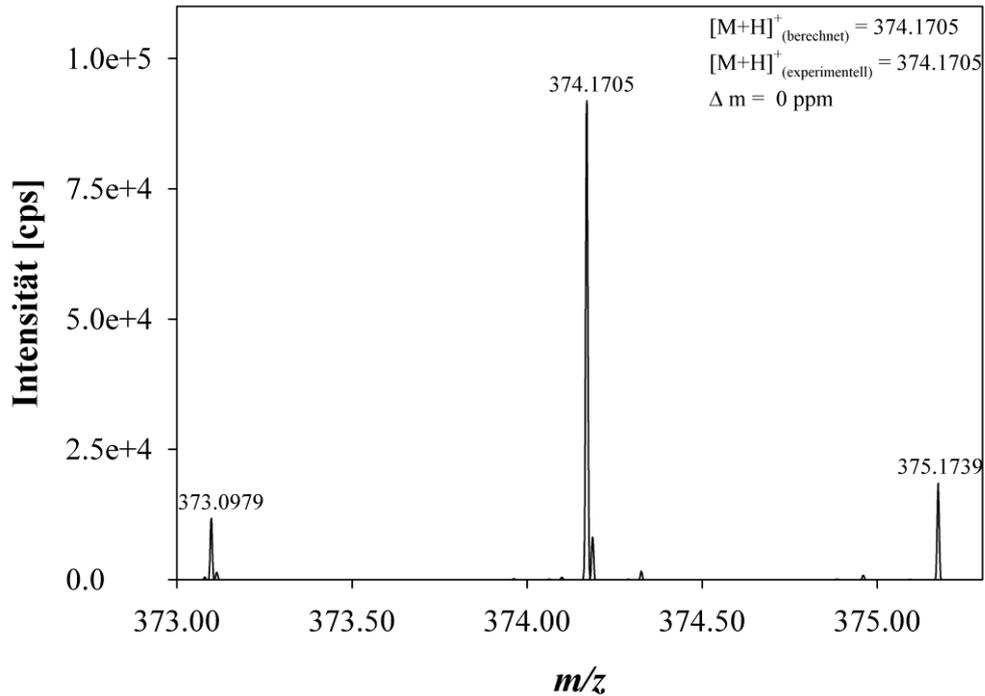


Abb. 11.18: Massenspektrum für den möglichen Metaboliten m/z 374,1705 \pm 1 amu zwischen 4,07 und 4,32 min (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

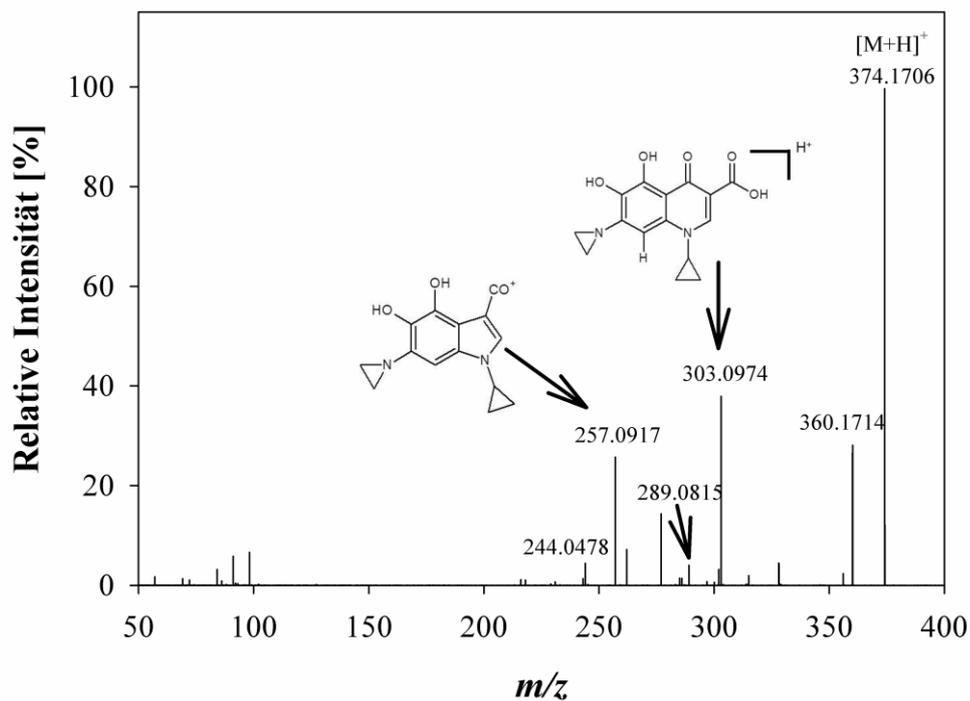


Abb. 11.19: Fragmentierungsspektrum zwischen 4,16 und 4,66 min für die Masse m/z 374,1707 (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

Metabolit m/z 376,1662 (6)

Das Extracted-Ion Chromatogramm für die Masse m/z 376,1662 weist in allen drei untersuchten Faecesproben sowohl ein Signal bei 5,80 min als auch bei 7,56 min auf (Abb. 11.20). Jedoch ist auf Grund der Voruntersuchungen sowie der Struktur des möglichen Metaboliten davon auszugehen, dass dieser bei 5,80 min eluiert. Des Weiteren sind die Signalintensitäten für die Proben mit einer vergleichsweise niedrigen Metabolisierung geringer. Im Massenspektrum ist die dominierende Masse m/z 376,1665 (Abb. 11.21), jedoch zeigt das Massenspektrum der beiden Proben mit geringer Metabolisierung auf Grund der geringen Signalintensität noch zahlreiche weitere Massen. Das Fragmentierungsspektrum weist mit m/z 305,0932 (Abspaltung C_4H_9N), m/z 300,1507 (Abspaltung OH, F, C_3H_4), m/z 261,1031 (Abspaltung CO_2 , C_4H_9N), m/z 246,0434 (Abspaltung F, C_4H_9N , C_3H_4), m/z 237,0668 (Abspaltung C_4H_9N , C_3H_4 , CO) und m/z 193,0410 (Abspaltung CO_2 , C_4H_9N , C_3H_4 , CO) sechs charakteristische Produktionen auf (Abb. 11.22). Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Signal 5,80 min um einen Metaboliten von Enrofloxacin handelt.

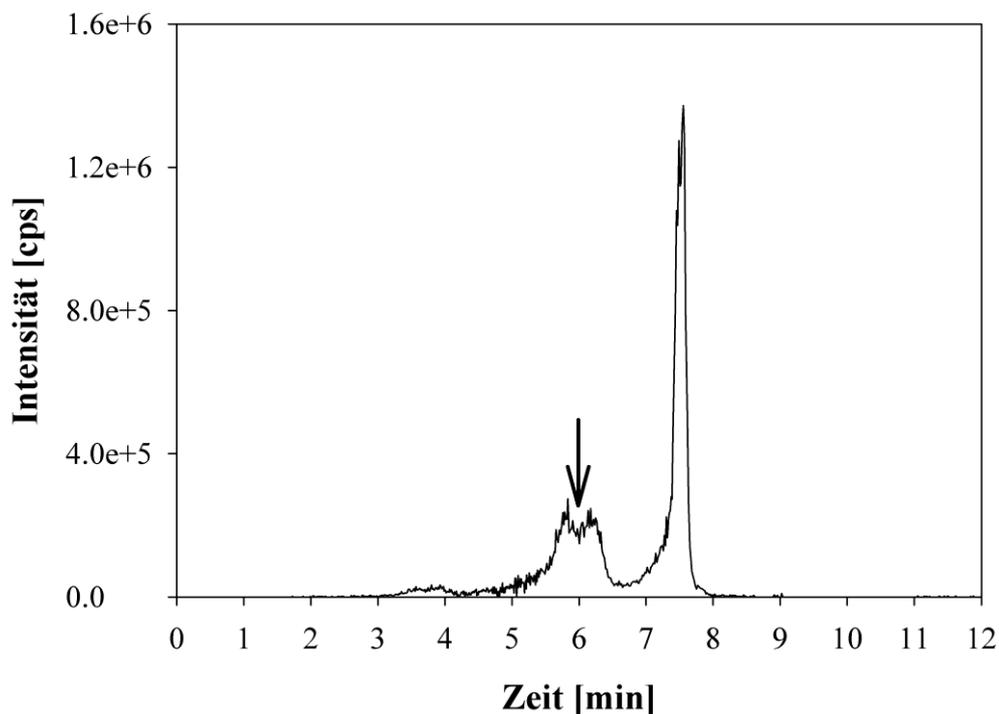


Abb. 11.20: Extracted Ion Chromatogramm für die Masse m/z 376,1662 \pm 0,0038 (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

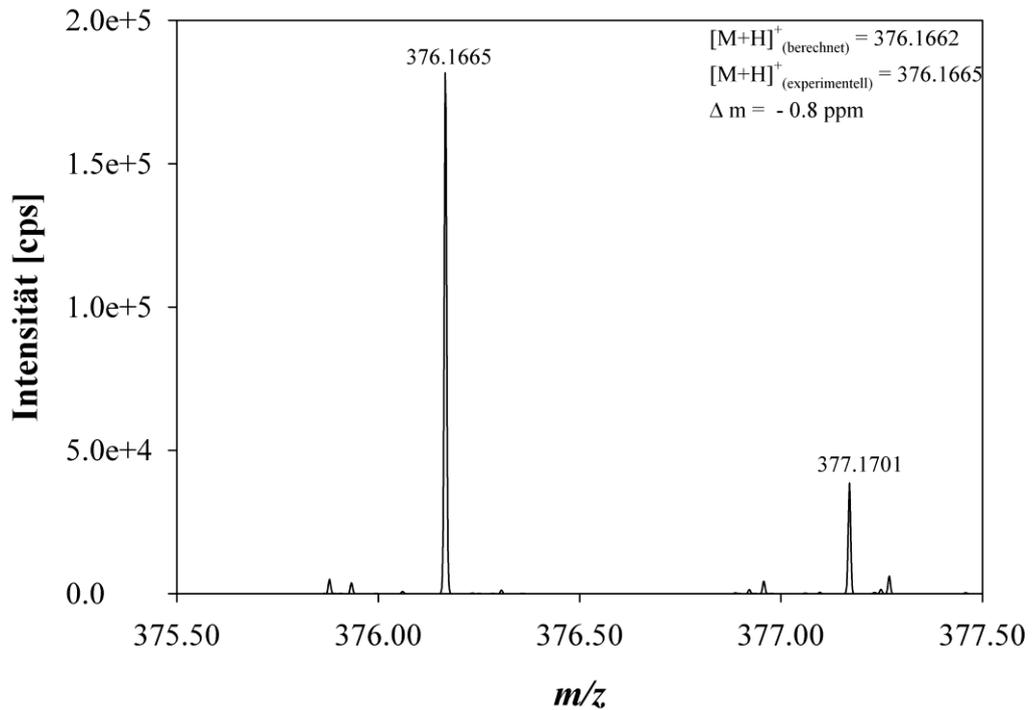


Abb. 11.21: Massenspektrum für den möglichen Metaboliten m/z 376,1662 \pm 1 amu zwischen 5,60 und 5,89 min (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

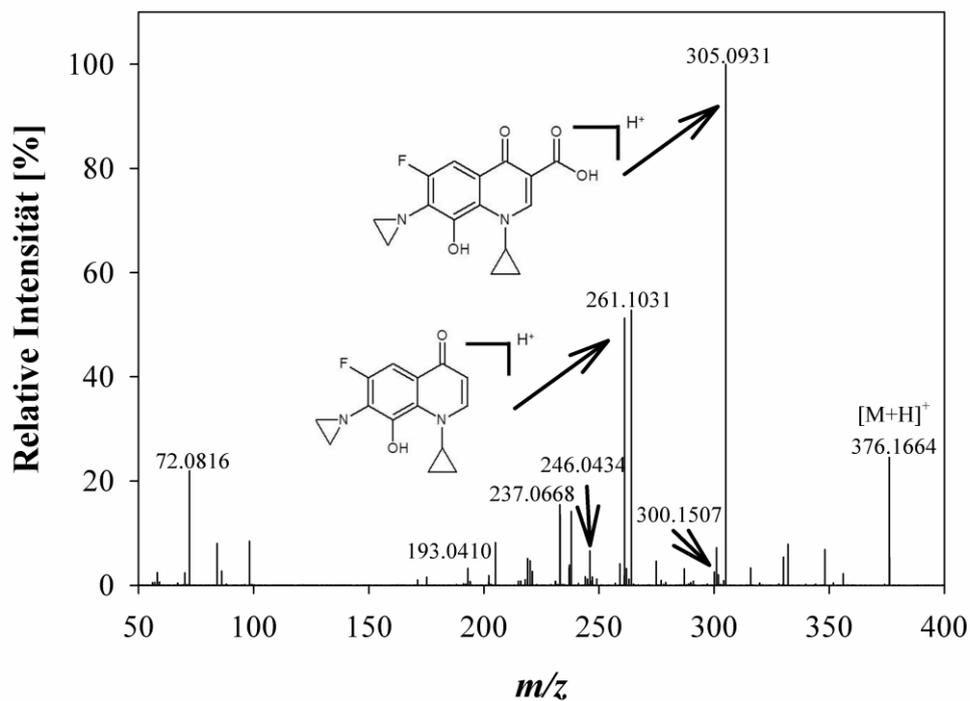


Abb. 11.22: Fragmentierungsspektrum zwischen 5,61 und 6,27 min für die Masse m/z 376,1664 (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 72 h).

12. Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist Teil des BMBF-Verbundprojektes RESET, welches sich u. a. als Ziel gesetzt hatte, eine Korrelation zwischen der Resistenzentwicklung und der Konzentration an Antibiotika in biologischen Matrices aufzuzeigen. Daher war die Hauptaufgabe dieser Arbeit zunächst die Entwicklung spurenanalytischer Nachweis- sowie Extraktionsmethoden von Fluorchinolon-Antibiotika in Hühnerplasma sowie Hühnerfaeces, welche dann im Rahmen von Fütterungsstudien angewandt werden sollten. Dies wurde durch die Entwicklung einer SPE-Methode für die Extraktion von Hühnerplasma sowie einer Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode für Hühnerfaeces erfolgreich umgesetzt. Des Weiteren wurden die entwickelten Methoden – insbesondere für die Extraktion von Hühnerplasma – weiter optimiert. Die Extraktionsmethode für Hühnerfaeces konnte nach geringfügigen Modifikationen auch auf Stallstäube angewandt werden. Diese und weitere Ergebnisse werden detailliert im folgenden Kapitel diskutiert.

12.1 Methodenentwicklung Hühnerplasma

Für die Extraktion von Fluorchinolonen in Plasma werden vorzugsweise folgende Methoden eingesetzt: Proteinpräzipitation, Flüssig-Flüssig-Extraktion oder Festphasenextraktion (SPE). Im Vergleich zu den beiden anderen Methoden weist die SPE zwei Vorteile auf: eine selektive Entfernung von störenden Matrixkomponenten sowie die Anreicherung der Analyten. Des Weiteren werden mittels SPE meist höhere Analytwiederfindungen erreicht, da bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion ionische Verbindungen - wie Fluorchinolone - zunächst in ihre neutrale Form überführt werden müssen und zudem mehrere Extraktionsschritte für eine quantitative Extraktion notwendig sind. Daher wurde für die Probenvorbereitung von Hühnerplasma in dieser Arbeit die SPE eingesetzt.

Eine Vielzahl von SPE-Materialien u. a. Mixed-Mode, Polymer- oder Kieselgel-Umkehrphasen sind für die Extraktion von Fluorchinolonen in biologischen Proben geeignet. Hauptsächlich werden jedoch Umkehrphasen auf Polymer- (Garcés *et al.* 2006; Hermo *et al.* 2005; Hernandez *et al.* 2002) oder Kieselgelbasis (González *et al.* 2006; Manceau *et al.* 1999) verwendet. Dabei weisen Polymer-Umkehrphasen im Vergleich zu Umkehrphasen auf Kieselgelbasis zwei Vorteile auf: einerseits eine höhere Ladungskapazität, wodurch geringere Sorbentismengen benötigt werden, und zum anderen können geringere Elutionsvolumina eingesetzt werden, was den Analytdurchbruch deutlich minimiert.

Insgesamt wurden im Rahmen der Methodenentwicklung vier Umkehrphasen auf Polymerbasis (Oasis HLB, Strata X, SDB und Isolute ENV+), eine Umkehrphase auf Kieselgelbasis (HyperSep C18) sowie fünf Mixed-Mode-Phasen (HR-XA, Easy, HyperSep Retain PEP, HR-XC und HyperSep Retain CX) eingesetzt. Die Ergebnisse belegen, dass durch den Zusatz von Säuren oder Basen zum Elutionsmittel die Analytwiederfindungen für Umkehrphasen auf Polymerbasis i. d. R. deutlich gesteigert werden können. Zufriedenstellende Wiederfindungen für Ciprofloxacin sowie Enrofloxacin wurden sowohl mit drei Mixed-Mode Säulen (HyperSep Retain PEP, Easy und HR-XA) als auch mit drei Umkehrphasen auf Polymerbasis (Oasis HLB, Strata X und SDB) erreicht. Um störende Matrixkomponenten im Probenextrakt und somit Matrixeffekte zu minimieren, ist die Integration eines zusätzlichen Waschschrilles mit einer methanolischen Waschlösung neben Reinstwasser von Vorteil. Jedoch konnte in das SPE-Protokoll der zwei Mixed-Mode Säulen Easy sowie HR-XA kein weiterer Waschschrille mit einer methanolischen Lösung ohne Analytverlust integriert werden. Die Integration eines zusätzlichen Waschschrilles mit methanolischen Waschlösungen war für die vier weiteren SPE-Säulen hingegen möglich. Dabei reicht die Spannweite der methanolischen Lösungen, die ohne Analytverlust eingesetzt werden können, von 20 % (Oasis HLB und HyperSep Retain PEP) bis 90 % (SDB) Methanol. Daher ist anzunehmen, dass die Probenextrakte, die unter Verwendung von 90 % Methanol als Waschlösung extrahiert wurden, wesentlich weniger störende Matrixkomponenten aufweisen. Jedoch ist der methanolische Anteil im Waschschrille nicht zwingend ein Indikator für die Extraktreinheit. So weisen z. B. die UV-Chromatogramme für Strata X (50 % Methanol als Waschlösung) im Vergleich zu SDB (90 % Methanol Waschlösung) bedeutend weniger störende Peaks im Elutionsbereich der Analyten auf. Der anwendbare Methanolgehalt in der Waschlösung ist somit abhängig von dem eingesetzten Sorbent und nicht von einem Säulentyp, z. B. Umkehrphase auf Polymerbasis. Daher muss für jedes Sorbent eine individuelle sequentielle Elution zur Ermittlung des optimalen Waschschrilles ohne Analytverlust durchgeführt, sowie die Effektivität des Schrittes (Reinheit des Probenextraktes) überprüft werden.

Des Weiteren wurden die sechs SPE-Methoden mit den besten Wiederfindungen für Ciprofloxacin und Enrofloxacin bezüglich der Elutionsvolumina optimiert, um den Lösungsmittelverbrauch sowie die Probenvorbereitungszeit zu minimieren. Für die beiden Mixed-Mode-Phasen Easy sowie HyperSep Retain PEP führt die Reduktion der Elutionsvolumina zu einem Einbruch der Analytwiederfindungen, insbesondere für Ciprofloxacin (85 % weniger). Jedoch sinken die Wiederfindungen der anderen Analyten ebenso, allerdings nicht in diesem Umfang. Das unterschiedliche Elutionsverhalten von Ciprofloxacin – insbesondere, wenn man die

strukturelle Ähnlichkeit zu Enrofloxacin in Betracht zieht – ist unerwartet. Jedoch berichten Karci und Balcioglu (2008) für die Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Boden sowie Gülle ebenso, dass sich auch das Extraktionsverhalten von Ciprofloxacin und Enrofloxacin stark unterscheidet.

Da die Evaluierung von Matrixeffekten in der Methodenentwicklung von Hühnerplasma einen wesentlichen Bestandteil darstellt und umfangreich untersucht wurde, wird dieser Bereich im folgenden Kapitel diskutiert.

12.2 Evaluierung und Minimierung von Matrixeffekten in der Analytik von Hühnerplasma

Die Evaluierung und Minimierung von Matrixeffekten während der Methodenentwicklung ist ein wichtiger Schritt, um u. a. die Richtigkeit und Präzision einer analytischen Methode zu gewährleisten. Als Marker wurden Phospholipide gewählt, da diese mit bis zu 3 g/L (Wu *et al.* 2008) in beträchtlichen Mengen in Plasma vorhanden sind und zudem dafür bekannt sind, Matrixeffekte zu verursachen. Ziel war es daher, Matrixeffekte durch die Entfernung von Phospholipiden während der Probenvorbereitung mittels SPE sowie durch die Optimierung der chromatographischen Bedingungen zu reduzieren. Hierzu wurden sowohl Umkehrphasen auf Polymerbasis als auch eine Kombination aus einem Mixed-Mode-Anionen- und -Kationenaustauscher eingesetzt.

Für die massenspektrometrische Detektion von Phospholipiden wurden zunächst folgende vier Methoden untersucht: Vorläuferionen Scan, Neutralverlust Scan, stoßinduzierte Dissoziation in der Ionenquelle sowie Selected Ion Monitoring. Beim Vorläuferionen Scan, Neutralverlust Scan und In-Source CID handelt es sich um Screening- bzw. Übersichtsmethoden mit denen Phospholipide qualitativ und summarisch erfasst werden können. Jedoch ist ohne *a priori* Informationen (z. B. Polarität der eingesetzten HPLC-Säule) i. d. R. keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Phospholipidklassen und somit keine Aussage über die Zusammensetzung der Phospholipide im Plasma möglich. Des Weiteren kann die Erfassung von Substanzen, die das gleiche Fragment oder den gleichen Neutralverlust aufweisen, zu falsch positiven Ergebnissen führen. Daher sind diese Methoden nur empfehlenswert, wenn die Extraktreinheit von Plasmaproben beurteilt werden soll und keine weiteren Informationen über die Phospholipidzusammensetzung erforderlich sind. So eignen sich der Vorläuferionen Scan von m/z 184,1 und die In-Source CID von m/z 184,1 - wie auch von Xia

und Jemal (2009) sowie Little *et al.* (2006) beschrieben - zur simultanen Erfassung von PC, Lyso PC und SM. Jedoch ist mit Hilfe des Vorläuferionen Scans im Vergleich zum In-Source CID eine sensitivere Bestimmung dieser Phospholipide möglich. Des Weiteren können mit dem Neutralverlust Scan von 141 Da gleichzeitig PE und Lyso PC erfasst werden. Auf Grund des schlechten Signal-zu-Rauschverhältnisses des Vorläuferionen Scans von m/z 153 ist keine Erfassung weiterer Phospholipidklassen wie PA, PS, PG und PI möglich. Daher können mit diesen Screeningmethoden nur PC, Lyso PC, SM, Lyso PE und PE erfasst werden.

Im Vergleich zu den bereits genannten MS/MS-Methoden ist mit Hilfe des SRM eine sensitivere und selektivere Bestimmung von Phospholipiden möglich. Dies wurde ebenfalls von Xia und Jemal (2009) gezeigt. Die Erfassung spezifischer Phospholipid-Massenübergänge jeder Klasse ermöglicht ihre qualitative sowie semi-quantitative Bestimmung. Zudem besteht die Möglichkeit Phospholipidprofile zu erstellen, d. h. eine Aussage über die Phospholipidzusammensetzung jeder einzelnen Klasse zu treffen. Aber auch die Ermittlung des Anteils jeder Phospholipidklasse zum Gesamtphospholipidgehalt ist möglich. Auf Grund der genannten Vorteile des SRM-Modus wurde dieser zur Bestimmung von Phospholipiden in Hühnerplasma verwendet.

Die Methodenentwicklung zur Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerplasma hat gezeigt, dass die besten Analytwiederfindungen, wenig störende Matrixkomponenten im Probenextrakt sowie eine Minimierung des Elutionsvolumens unter Verwendung der beiden Umkehrphasen auf Polymerbasis, Oasis HLB und Strata X, erreicht wurden. Daher wurden diese beiden Säulen für weitere Methodenoptimierungsschritte, die sich mit der Evaluierung und Minimierung von Matrixeffekten beschäftigen, verwendet. Der Gesamtphospholipidgehalt in mit Oasis HLB extrahierten Plasmaproben ist ungefähr doppelt so hoch im Vergleich zu mit Strata X extrahierten Proben. Jedoch konnten nur für Marbofloxacin und Ciprofloxacin erhöhte Matrixeffekte für eine Konzentration von 0,01 ng/ μ L bestimmt werden. Dennoch war ein Ziel dieser Arbeit, Phospholipide im Probenextrakt zu reduzieren. Daher wurde auf Grund des geringeren Ausgangsgehalts an Phospholipiden, die Strata X SPE-Säule für weitere Untersuchungen zur Minimierung von Matrixeffekten sowie Phospholipiden im Probenextrakt verwendet.

Die Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Elutionsmittel auf den Phospholipidgehalt im Probenextrakt von Umkehrphasen auf Polymerbasis haben gezeigt, dass auf die Verwendung von angesäuerten Elutionsmitteln sowie Acetonitril verzichtet werden sollte, da diese im Vergleich zu Methanol zu einer deutlich verstärkten Phospholipidelution führen.

Dies steht im Widerspruch zu Chambers *et al.* (2007), die berichten, dass die Verwendung von Methanol, angesäuerten sowie basischen Elutionsmitteln keinen Einfluss auf die Phospholipidelution bei Umkehrphasen auf Polymerbasis hat. Des Weiteren schreiben sie, dass Phospholipide in Methanol besser löslich sind als in Acetonitril. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht bestätigt werden, da der größte Anteil an Phospholipiden mit Acetonitril eluiert und diese daher löslicher in Acetonitril sind. Lahaie *et al.* (2010) haben - wie auch hier - gezeigt, dass bei Umkehrphasen auf Polymerbasis der Phospholipidgehalt im Probenextrakt unter Verwendung von Acetonitril ansteigt. Eine mögliche Erklärung sind die unterschiedlichen Elutionsstärken beider Elutionsmittel. Methanol ist polarer als Acetonitril, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass unter Verwendung einer Umkehrphase die unpolaren Phospholipide wahrscheinlicher mit Acetonitril eluieren. Zusätzlich haben Lahaie *et al.* (2010) festgestellt, dass der Zusatz von Ameisensäure zu Acetonitril den Phospholipidgehalt im Probenextrakt bei Verwendung von Umkehrphasen auf Kieselgelbasis verstärkt. Bisher gibt es keine Literaturdaten, wie sich der Einsatz von angesäuerten Elutionsmitteln auf die Phospholipidelution bei Umkehrphasen auf Polymerbasis auswirkt. Jedoch wird durch Ameisensäure wahrscheinlich die Bindung zwischen den Phospholipiden und der Umkehrphase beeinträchtigt, so dass diese im Vergleich zur Elution mit organischen Lösungsmitteln ohne Säurezusatz in größeren Mengen eluieren.

Bei der Verwendung von Umkehrphasen auf Polymerbasis ist der Einsatz einer weiteren Waschlösung neben Reinstwasser ratsam, da somit der Phospholipidgehalt im Probenextrakt reduziert werden kann. Jedoch war es nicht möglich, alle Phospholipide durch einen zusätzlichen Waschschrift zu eliminieren. So können durch 40 % Methanol als Waschlösung ca. 30 % PC, SM und PE entfernt werden. Eine Reduktion des Lyso PC-Gehaltes ist hingegen nicht möglich, da diese erst mit 80 % Methanol eluieren. Daher ist der Phospholipidgehalt im Probenextrakt der Strata X-Extraktion wesentlich höher im Vergleich zum Extrakt aus der Kombination aus Mixed-Mode-Anionen- und -Kationenaustauscher. Chambers *et al.* (2007) berichten ebenfalls, dass Mixed-Mode-Phasen im Vergleich zu Umkehrphasen auf Polymerbasis zu saubereren Probenextrakten bei der Extraktion von Plasma führen. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Kombination aus Mixed-Mode-Anionen- und -Kationenaustauscher der Gehalt an Phospholipiden im Probenextrakt im Vergleich zu Umkehrphasen auf Polymerbasis um einen Faktor größer 30 verringert werden. Chambers *et al.* (2007) hingegen stellten zwischen Umkehrphasen auf Polymerbasis und Mixed-Mode-Phasen nur einen Faktor von zwei fest.

Die Optimierung der chromatographischen Bedingungen hat gezeigt, dass die Integration eines Spülschrittes mit 95 % Methanol in den HPLC-Gradienten sowie einer erhöhten Flussrate dazu beitragen können, die Elution von unpolaren Substanzen – wie auch Phospholipiden – zu beschleunigen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Injektion eines Lösungsmittelblanks zwischen zwei Proben ausreichend ist, um die Akkumulation von Phospholipiden auf der Trennsäule zu vermeiden und somit unspezifischen Matrixeffekten vorzubeugen.

Matrixeffekte wurden sowohl durch die Dotierung einer extrahierten Leerplasmaprobe als auch mittels Post-column-Infusionsexperimenten bestimmt. Bei der Post-column-Infusion ist jedoch zu beachten, dass bei der Verwendung eines Gradienten die Injektion eines Blanks (Methanol) als Referenz unerlässlich ist, da ansonsten Bereiche im Chromatogramm fälschlicherweise als Matrixeffekte interpretiert werden können, die auf einer Änderung des Gradienten beruhen. Zudem ist zu beachten, dass jeder Analyt separat infundiert werden muss, da eine Beeinflussung der Analyten untereinander nicht ausgeschlossen werden kann. Anhand der Post-column-Infusion konnte am Beispiel von Difloxacin gezeigt werden, dass Phospholipide konzentrationsabhängige Matrixeffekte verursachen, d. h. niedrige Konzentrationen sind stärker von Matrixeffekten betroffen als hohe Analytkonzentrationen. Daher müssen Matrixeffekte im relevanten Konzentrationsbereich bestimmt werden.

Die Post-column-Infusionsprofile sowohl der ursprünglichen (Signalverstärkung Difloxacin) als auch der optimierten (Signalunterdrückung Marbofloxacin) Methode für die Umkehrphase auf Polymerbasis haben gezeigt, dass die Fluorchinolonanalytik von Matrixeffekten beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu weisen die Post-column-Infusionsprofile für die Kombination aus Mixed-Mode-Anionen- und -Kationenaustauscher für keinen der untersuchten Analyten Matrixeffekte auf. Ebenso sind im Elutionsbereich der Phospholipide im Vergleich zur Umkehrphase auf Polymerbasis keine Matrixeffekte ersichtlich. Daher weist die Kombination aus Mixed-Mode-Anionen- und -Kationenaustauscher zwei entscheidende Vorteile auf. Zum einen können höhere Wiederfindungen (bis auf Ciprofloxacin) erzielt werden und zum anderen können Phospholipide im Probenextrakt um einen Faktor von mehr als 30 reduziert werden. Somit ist die Kombination aus Mixed-Mode-Anionen- und -Kationenaustauscher für die selektive Extraktion von amphoteren Verbindungen – wie den Fluorchinolonen – bei gleichzeitiger Elimination störender Matrixbestandteile geeignet und empfehlenswert. Neutrale und kationische Störsubstanzen werden von der Mixed-Mode-Anionenaustauscher-Phase durch die Verwendung von 1 % Ammoniak in Methanol eluiert, während anionische

und amphotere Verbindungen weiterhin retardiert werden. Durch die Wahl von angesäuertem Elutionsmittel zur Elution der Substanzen von der Mixed-Mode-Anionenaustauscher-Phase auf die Mixed-Mode-Kationenaustauscher-Phase werden saure Verbindungen eluiert und nur noch amphotere Substanzen verbleiben auf dem Mixed-Mode-Kationenaustauscher. Auf Grund der sehr überzeugenden Ergebnisse wurde für die Extraktion von Plasmaproben, die im Rahmen der Tierstudien entnommen wurden, die Kombination aus Oasis MAX/Oasis MCX eingesetzt.

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgestellt werden, dass der Phospholipidgehalt im Probenextrakt und Matrixeffekte durch die Verwendung einer Kombination aus einem Mixed-Mode-Anionen- und -Kationenaustauscher im Vergleich zu einer Umkehrphase auf Polymerbasis deutlich reduziert werden konnten. Dennoch ist zu bedenken, dass die Materialkosten dieser Methode in etwa doppelt so hoch sind. Bei Verwendung der Umkehrphase auf Polymerbasis sollte auf angesäuerte Elutionsmittel sowie Acetonitril verzichtet werden, da dies zu einer erhöhten Phospholipidelution beiträgt. Des Weiteren sollte die Integration eines zusätzlichen Waschschrattes in Betracht gezogen werden, um störende Matrixbestandteile effektiv und selektiv zu eliminieren. Diese Arbeit hat darüber hinaus gezeigt, dass die Post-column-Infusion eine geeignete Methode ist, um die Bereiche im Chromatogramm zu identifizieren, welche von Matrixeffekten beeinflusst werden. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Analytik von Marbofloxacin und Difloxacin unter Verwendung der Umkehrphase auf Polymerbasis von Matrixeffekten beeinflusst wird. Daher ist ein analytischer Mehraufwand, z. B. der Einsatz eines internen Standards, Standardaddition oder In-Matrix-Kalibrierung notwendig, um diese Matrixeffekte zu kompensieren. Die Integration eines Spülschrattes mit erhöhter Flussrate in den HPLC-Gradienten und die Injektion eines Lösungsmittelblanks zwischen den Probeninjektionen sind empfehlenswert, um Verschleppungen, Retentionszeitverschiebungen oder die Akkumulation störender Matrixkomponenten zu vermeiden. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass Matrixeffekte konzentrationsabhängig sein können und daher im relevanten Konzentrationsbereich untersucht werden müssen. Zudem konnte gezeigt werden, dass Phospholipide geeignete Marker für die Bestimmung von Matrixeffekten bei der Extraktion von Plasma sind, d. h. die Reduktion von Phospholipiden während der Probenvorbereitung minimiert Matrixeffekte und andere störende Matrixbestandteile im Probenextrakt.

Die meisten publizierten SPE-Methoden zur Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerplasma verwenden zur Detektion einen UV-, Diodenarray- oder Fluoreszenzdetektor und können somit nicht zum direkten Vergleich herangezogen werden. Lediglich zwei massen-

spektrometrische Methoden zur Detektion von Fluorchinolonen (Marbofloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Difloxacin) in Schweineplasma sind in der Literatur beschrieben (Garcés *et al.* 2006; Hermo *et al.* 2011). Die Bestimmungsgrenze für die in dieser Arbeit entwickelten Methode ist um den Faktor 6 - 8 (LC-MS/MS; Garcés *et al.* 2006) sowie um den Faktor 20 - 40 (LC-MS; Hermo *et al.* 2011) je nach Analyt niedriger.

12.3 Methodenentwicklung Hühnerfaeces

Für die Extraktion von Fluorchinolonen in Faeces werden vorwiegend die Flüssig-Flüssig-Extraktion, die Ultraschall-Extraktion, die Mikrowellenextraktion oder die beschleunigte Lösungsmittlextraktion (ASE: Accelerated Solvent Extraction) angewandt. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde sowohl die Flüssig-Flüssig-Extraktion als auch die Mikrowellenextraktion eingesetzt. Dabei wurde der Einfluss unterschiedlicher Extraktionsparameter untersucht sowie optimiert.

Häufig wird für die Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen Acetonitril als Extraktionsmittel verwendet (Hu *et al.* 2010; Martínez-Carballo *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2010), da es eine bessere Wiederfindung im Vergleich zu Dichlormethan, Methanol und Ethylacetat ermöglichen soll (Horie *et al.* 1994; Yorke und Froc 2000). Jedoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Dichlormethan die größte Extraktionseffizienz gegenüber Fluorchinolonen aufweist. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Pierini *et al.* (2004) überein. Zhou *et al.* (2008) verwendeten als Extraktionsmittel Chloroform, welches wie hier gezeigt mit Dichlormethan vergleichbare Ergebnisse liefert, jedoch auf Grund seiner ungünstigen toxiologischen Eigenschaften nicht in dieser Arbeit verwendet wurde.

Für eine quantitative Extraktion der Fluorchinolone ist die Verwendung eines Lösungsmittels nicht ausreichend, sondern die Einstellung des pH-Wertes ist zusätzlich erforderlich. Die Zugabe von Säuren und Basen zum Lösungsmittel führt – wie auch von Bailac *et al.* (2006) beschrieben – zu einer verstärkten Extraktion von störenden Matrixbestandteilen. Daher wurden zur pH-Werteinstellung der Extraktionslösung sowie der Probe Puffer verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Wiederfindung vom eingestellten pH-Wert abhängig ist. In der vorliegenden Arbeit konnten die besten Ergebnisse unter Verwendung von Mc-Ilvaine-Puffer pH 7,0 erzielt werden. Der optimale pH-Wert für die Extraktion von Fluorchinolonen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Turiel *et al.* (2006) und Karci und Balcioğlu (2009) schreiben, dass die beste Extraktionseffizienz unter Verwendung von basischen Lösungen erreicht wird. Hingegen gibt Martínez-Carballo *et al.* (2007) an, dass die besten Fluor-

chinolon-Wiederfindungen bei saurem pH-Wert erlangt werden. Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit kommen Pierini *et al.* (2004) zu dem Ergebnis, dass Fluorchinolone am besten bei neutralen pH-Wert extrahiert werden können. Auf Grund ihrer Amphoterie besitzen Fluorchinolone zwei pK_s -Werte, die ungefähr zwischen 6 und 8 liegen d. h. in diesem Bereich liegen sie in ihrer neutralen Form vor und besitzen dann auch die höchste Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln (z. B. Dichlormethan) und die geringste in polaren Lösungsmitteln (z. B. Wasser). Dies lässt sich experimentell auch über den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten nachweisen und somit stimmen die erzielten Ergebnisse gut mit den theoretischen Grundlagen überein.

Der pH-Wert ist ein wichtiger Extraktionsparameter für eine Flüssig-Flüssig-Extraktion. Dennoch hat sich gezeigt, dass durch die Optimierung des pH-Wertes zwar eine Verbesserung der Wiederfindung für Ciprofloxacin erreicht wurde, diese jedoch nicht ausreichend hoch war. Daher wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht, um die Ciprofloxacin-Wiederfindung zu verbessern. Trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Enrofloxacin wechselwirkt Ciprofloxacin wesentlich spezifischer und stärker mit Matrixbestandteilen, wodurch die Extraktionseffizienz herabgesetzt werden kann (Karcı und Balcıođlu 2009). Bekannt sind u. a. hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenaustausch sowie Komplexierung (Hu *et al.* 2010). Insbesondere die Bildung von Chelatkomplexen zwischen Fluorchinolonen und divalenten oder trivalenten Kationen stellt ein mögliches Problem dar. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde EDTA bei pH 7,0 als Komplexbildner eingesetzt. Für Ciprofloxacin bewirkt eine steigende EDTA-Konzentration die Zunahme der Wiederfindung. Somit ist die Wechselwirkung von Ciprofloxacin mit Matrixbestandteilen in Faeces wahrscheinlich hauptsächlich auf die Chelatbildung mit Kationen zurückzuführen. Die Wiederfindungen der anderen Analyten sinken hingegen mit steigender EDTA-Konzentration. Als Kompromiss wurde daher 0,5 M EDTA pH 7,0 verwendet, womit die Ciprofloxacin-Wiederfindung im Vergleich zu Mc-Ilvaine-Puffer pH 7,0 immer noch deutlich gesteigert werden konnte. Der in dieser Arbeit gezeigte Effekt von sinkenden Analytwiederfindungen bei steigender Extraktionszeit sowie Extraktionstemperaturen wurde bereits von Turiel *et al.* (2006) für Boden beschrieben.

Mit Hilfe der Mikrowellenextraktion sollte die Probenvorbereitungszeit sowie das Lösungsmittelvolumen bei gleichzeitiger Erhöhung der Analytwiederfindung reduziert werden. Jedoch können weder durch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln noch durch wässrige Lösungen und anschließender Aufreinigung mittels SPE Analytwiederfindungen > 40 %

erzielt werden. Um die gleichen oder sogar höhere Wiederfindungen im Vergleich zur Flüssig-Flüssig-Extraktion zu erreichen, wären der Einsatz von höheren Temperaturen, anderen Lösungsmitteln, mehreren Extraktionszyklen sowie eine Erhöhung des Lösungsmittelvolumens notwendig. Bis auf eine Erhöhung der Extraktionszyklen, welche allerdings im Vergleich zur Flüssig-Flüssig-Extraktion keine Zeitersparnis bedeutet, sind die weiteren Schritte auf Grund gerätebedingter Limitierungen nicht möglich. Auf Grund der Komplexität der vorliegenden Matrix müssen die mit dieser Methode erreichten Analytwiederfindungen als Optimum angesehen werden. Daher wurde die zunächst entwickelte Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode für die Extraktion von Faecesproben beibehalten.

Ein direkter Vergleich der in dieser Arbeit entwickelten Extraktionsmethode mit literaturbekannten Methoden ist schwierig, da bisher keine Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode zur Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces mit anschließender massenspektrometrischer Detektion entwickelt wurde. Jedoch sind zwei Ultraschallextraktionsmethoden (Martínez-Carballo *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2010) und eine Mikrowellenextraktionsmethode (Hu *et al.* 2010) mit anschließender fluorometrischer oder massenspektrometrischer Detektion für die Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces beschrieben. Die Wiederfindungen liegen für Ciprofloxacin zwischen 78 und 106 % (Hu *et al.* 2010; Martínez-Carballo *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2010), für Enrofloxacin zwischen 82 und 88 % (Martínez-Carballo *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2010) sowie für Difloxacin bei 74 % (Zhao *et al.* 2010) und sind somit deutlich höher als die in dieser Arbeit beschriebenen Wiederfindungen. Jedoch geht aus diesen Arbeiten nicht eindeutig hervor, ob diese Wiederfindungen auf einen internen Standard bezogen wurden und somit prinzipiell deutlich höher sind oder wie in dieser Arbeit die reinen Analytwiederfindungen darstellen. Die in dieser Arbeit erzielten Bestimmungsgrenzen sind im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Methoden mit massenspektrometrischer Detektion für Ciprofloxacin um den Faktor 20 - 63 besser und für Enrofloxacin sogar um den Faktor 113 (Hu *et al.* 2010; Martínez-Carballo *et al.* 2007). Im Vergleich zur fluorometrischen Detektion sind die Bestimmungsgrenzen um den Faktor 83 für Ciprofloxacin, um den Faktor 370 für Enrofloxacin sowie um den Faktor 165 für Difloxacin niedriger (Zhao *et al.* 2010). Marbofloxacin wurde in diesen Arbeiten nicht untersucht.

12.4 Tierstudien

Der Einsatz von Antibiotika ist in der intensiven Nutztierhaltung weit verbreitet und häufig auch zwingend notwendig, um die Gesundheit eines Bestandes zu gewährleisten. Jedoch

nehmen Antibiotikaresistenzen seit 20 Jahren deutlich zu, wodurch die therapeutischen Möglichkeiten sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eingeschränkt werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen der Gabe von Fluorchinolonen und der damit verbundenen Entstehung resistenter Keime näher zu charakterisieren. Hierbei sollten vor allem die Art der Applikation, Dosis und Behandlungsdauer kritisch betrachtet werden. Insbesondere die Verabreichung über das Futter birgt das Risiko von subtherapeutischen Kontaminationen, z. B. über Stallstaub. Der Einfluss dieser subtherapeutischen Konzentrationen auf die Entstehung resistenter Mikroorganismen wurde bisher nur wenig untersucht. Daher wurden in dieser Studie Hühner mit der therapeutischen Konzentration von 10 mg/kg KG Enrofloxacin sowie Verschleppungsdosen von 0,3 mg/kg, 1 mg/kg und 3 mg/kg KG Enrofloxacin behandelt und die Konzentration an Enrofloxacin sowie seines Hauptmetaboliten Ciprofloxacin in Plasmaproben (teilweise in dieser Arbeit), Stallstaub- und aerosolen (Scherz 2013) sowie in Faecesproben bestimmt. Des Weiteren wurde die Entwicklung von resistenten Bakterien im Behandlungszeitraum verfolgt (Scherz 2013).

In Hühnerfaecesproben konnten Enrofloxacin und Ciprofloxacin sowohl für die Behandlung mit der empfohlenen Dosis als auch nach der Behandlung mit Verschleppungsdosen quantifiziert werden. Die höchste Konzentration in Hühnerfaeces für Enrofloxacin beträgt ca. 60 mg/kg und für Ciprofloxacin ca. 20 mg/kg, beide Proben stammen aus der Behandlung mit der empfohlenen Dosis. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Eintrag der beiden Antibiotika in die Stallumgebung z. B. durch getrocknete Faecespartikel denkbar ist. Daher wurden Sedimentationsstaubproben und Stallaerosole auf das Vorhandensein von Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin überprüft. Dabei konnten Enrofloxacin mit bis zu 16 µg/g und Ciprofloxacin mit ca. 1 µg/g in Sedimentationsstaub detektiert werden. Die gefundenen Konzentrationen in Stallaerosolen betragen bis zu 65 ng/m³ für Enrofloxacin sowie bis zu 5 ng/m³ für Ciprofloxacin. Beide Antibiotika konnten noch mehrere Tage nach Behandlungsende in der Stallluft nachgewiesen werden (Scherz 2013).

Auf Grund der Größe von Geflügelbeständen erfolgt die Applikation der pharmazeutischen Präparate hauptsächlich oral über das Tränkwasser oder das Futter. Die orale Verabreichung birgt auch Risiken, wie u. a. eine schlechtere Bioverfügbarkeit der Pharmazeutika, die u. U. nicht ausreichende Wirkstoffspiegel als Folge haben. Zusätzlich sind Verschleppungen durch ungenügende Reinigung des Tränkesystems oder Verteilung von Futterpartikeln in die Stallumgebung möglich (Löscher *et al.* 2006). Jedoch kann nahezu ausgeschlossen werden, dass Enrofloxacin und Ciprofloxacin in der vorliegenden Studie durch die Verschleppung über das

Futter in Sedimentationsstaubproben sowie Stallaerosolen gelangten, da die ermittelten Konzentrationen für die Behandlung über Tränkwasser sowie Futter ähnlich waren. Somit scheint der Haupteintragsweg von Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin in die Stallumgebung über die Verteilung von getrockneten Faecespartikeln zu erfolgen, womit eine Wiederaufnahme der beiden Antibiotika unterhalb der therapeutischen Dosis für Tier und Mensch möglich ist.

Auch in Kontrollproben (Probeentnahme vor Behandlungsbeginn) aller Tiere sowie Behandlungsszenarien in Faecesproben konnten Enrofloxacin (bis zu 2 µg/kg) sowie teilweise Ciprofloxacin (bis zu 0,7 µg/kg) sicher quantifiziert und über das Verhältnis der beiden Massenübergänge auch qualifiziert werden. Eine Verschleppung während der Probenvorbereitung kann ausgeschlossen werden, da für jede Probe zum Einwiegen ein separater Spatel verwendet wurde. Darüber hinaus wurden beide Antibiotika in den für die Extraktion verwendeten Lösungsmitteln sowie Lösungen nicht nachgewiesen. Auch wurden beide Antibiotika in einer auf-gearbeiteten Leermatrixprobe (Hühnerfaeces von unbehandelten Tieren, die im Rahmen der Methodenentwicklung und -validierung verwendet wurde) nicht nachgewiesen. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass wenn es sich um eine Verschleppung während der Probenvorbereitung handelt, ebenso Marbofloxacin und Difloxacin hätten detektiert werden müssen, da diese ebenfalls wie auch der interne Standard Ciprofloxacin d8 zur Kontrolle des Extraktionsprozesses von Faecesproben eingesetzt wurden. Die zwischen den Kontrollproben gemessenen Lösungsmittelblanks zeigen keine Signale für die untersuchten Analyten. Damit kann auch eine Verschleppung innerhalb des HPLC-Systems ausgeschlossen werden. Die ermittelten Spurenkonzentrationen beider Antibiotika wurden somit wahrscheinlich entweder im Stall der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover oder bereits im Geflügelzuchtbetrieb aufgenommen. Insbesondere wenn zuvor in dem Stall eine Behandlung mit Enrofloxacin stattgefunden hat und dieser nicht ausreichend gereinigt wurde, ist eine Aufnahme über die Stallumgebung möglich, wie bereits Kietzmann *et al.* (1995) anhand von Sulfamethazin demonstriert haben.

In den Faecesproben wurden hohe Enrofloxacin-Konzentrationen ermittelt, was darauf hindeutet, dass der größte Anteil an Enrofloxacin unmetabolisiert wieder ausgeschieden wird und nur teilweise eine Metabolisierung in den aktiven Metaboliten Ciprofloxacin erfolgt. Die Metabolisierung scheint zudem abhängig von der verabreichten Enrofloxacinosis zu sein, da diese mit zunehmender Dosis ebenso ansteigt. Zur Bestätigung sollten die Versuche allerdings mit größeren Versuchsgruppen ($n > 10$) durchgeführt werden, da die Metabolisierung tier-

spezifisch ist, d. h. manche Tiere können eine deutlich höhere Metabolisierung aufweisen als andere.

Die ausgeschiedenen Konzentrationen sowohl von Enrofloxacin als auch von Ciprofloxacin während der Behandlung mit der empfohlenen Dosis von 10 mg/kg KG Enrofloxacin sind beträchtlich. Zwei Tage nach Behandlungsende werden immer noch bis zu 1 mg/kg Enrofloxacin ausgeschieden, womit erhebliche Mengen an Fluorchinolonen in die Umwelt gelangen würden, wenn diese Exkremente als Dünger für landwirtschaftliche Nutzflächen Verwendung fänden. Ausgehend von einer Enrofloxacin-Konzentration von 1 mg/kg Faeces, einer durchschnittlichen Gesamtausscheidung von 165 g/Tag/Tier (Siegmann 2005) sowie einem Bestand von 10.000 Tieren würden somit 1,65 g Enrofloxacin in die Umwelt gelangen. Diese Mengen wären auf jeden Fall noch deutlich höher, wenn die während des Behandlungszeitraumes ausgeschiedenen Exkremente als Dünger verwendet werden würden. Bisher ist wenig über mögliche Folgen, wie z. B. die Entstehung resistenter Mikroorganismen oder (toxischer) Abbauprodukte bekannt. Jedoch weisen Fluorchinolone im Boden ein großes Sorptionsvermögen an Bodenbestandteile auf, was einerseits ihre biologische Aktivität reduziert aber ihre Wirkung nicht vollständig aufhebt. Daher sollte der Eintrag von Fluorchinolonen in die Umwelt so gering wie möglich sein. Eine Möglichkeit, um den Abbau zu beschleunigen, wäre die Verwendung dieser Exkremente in Fermentationsprozessen, wie z. B. in Biogasanlagen. Informationen bezüglich möglicher Abbauprodukte, ihren toxikologischen sowie antibakteriellen Eigenschaften sind jedoch sehr lückenhaft (Panseri *et al.* 2013). Eine weitere Möglichkeit, um den Eintrag von Fluorchinolonen in die Umwelt so gering wie möglich zu halten sind die Überprüfung von Exkrementen behandelter Tiere auf Antibiotikarückstände und die anschließende Verbrennung dieser Exkremente. Nachteile sind jedoch der hohe Energieverbrauch sowie die Emission von Treibhausgasen. Des Weiteren können Fütterungsstudien und die Bestimmung der Faeceskonzentration von Enrofloxacin über einen längeren Zeitraum (bis zu 20 Tage) dazu verwendet werden, Empfehlungen darüber auszusprechen, ab wann Exkremente wieder als Dünger Verwendung finden könnten. Problematisch wäre hierbei jedoch die Festlegung eines Schwellenwertes basierend auf dem bisherigen Datenmaterial.

Die Entwicklung empfindlicher Methoden ist besonders wichtig, wenn die Korrelation zwischen der Konzentration der Antibiotika in biologischen Matrices sowie der Entstehung resistenter Mikroorganismen bei der Verabreichung subtherapeutischer Dosen bestimmt werden soll. Dies wurde bisher nicht durchgeführt. Jedoch wurden in separaten Versuchen,

die detailliert in der Arbeit von Frau Dr. Scherz (2013) beschrieben sind, Hühner mit verschiedenen Behandlungsszenarien behandelt und die Resistenzentwicklung verfolgt. Im Rahmen dieser Versuche konnte anhand von *E.coli* als Modellorganismus gezeigt werden, dass Low-Level-Resistenzen (Minimale Hemmkonzentration $< 2 \mu\text{g/mL}$) bereits durch die Behandlung mit der empfohlenen Enrofloxacin-Dosis von 10 mg/kg KG auftreten. Um die ungewollte Aufnahme subtherapeutischer Dosen zu simulieren, wurden die Tiere zunächst 22 Tage mit Verschleppungsdosen von $0,3 \text{ mg/kg}$ sowie mit 1 mg/kg KG Enrofloxacin behandelt, gefolgt von einer fünftägigen Behandlung mit der empfohlenen Dosis von 10 mg/kg KG Enrofloxacin. Analog zur Behandlung mit der therapeutischen Dosis konnten für das Verschleppungsszenario mit $0,3 \text{ mg/kg KG}$ Enrofloxacin ebenfalls Low-Level-Resistenzen detektiert werden. High-Level-Resistenzen (Minimale Hemmkonzentration $> 2 \mu\text{g/mL}$) hingegen traten für die Behandlung mit 1 mg/kg KG Enrofloxacin und anschließender therapeutischer Behandlung auf (Scherz 2013). Diese Versuche haben gezeigt, dass bei allen untersuchten Behandlungsszenarien Enrofloxacin-Resistenzen, unabhängig von Behandlungszeitraum und Antibiotikadosis, auftreten.

12.5 Methodenvergleich

Im Rahmen des Methodenvergleichs wurden ausgewählte Plasmaproben von Tieren, die mit Verschleppungsdosen von 1 mg/kg sowie 3 mg/kg KG Enrofloxacin behandelt wurden, mit der in dieser Arbeit entwickelten Festphasenextraktionsmethode aufgearbeitet und mit den in der Dissertation von Frau Dr. Scherz veröffentlichten Werte für diese Proben verglichen (Aufarbeitung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion).

Methodisch unterscheiden sich beide Methoden vor allem durch die Wahl der eingesetzten Probenaufarbeitungsmethode sowie der Analytdetektion (HPLC-MS/MS im Vergleich zu HPLC-Fluoreszenz). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der Analyten mittels HPLC-MS/MS, welche im Gegensatz zur Fluoreszenzdetektion ein Bestätigungsverfahren ist, mit dem ein Analyt eindeutig nachgewiesen werden kann. Des Weiteren ist die HPLC-MS/MS für die Analytik von Antibiotika i. d. R. wesentlich sensitiver. Vergleicht man die Nachweisgrenzen beider Methoden, so kann Ciprofloxacin (NWG: $0,05 \mu\text{g/L}$) viermal und Enrofloxacin (NWG: $0,03 \mu\text{g/L}$) ca. siebenmal empfindlicher mittels HPLC-MS/MS im Vergleich zur Fluoreszenzdetektion (NWG für beide Analyten: $0,2 \mu\text{g/L}$) nachgewiesen werden. Der Unterschied im Nachweisvermögen zwischen beiden Methoden ist in diesem Fall gering, da zum einen das bei der Fluoreszenzdetektion verwendete Injektionsvolumen

fünzigfach größer (100 µL) ist und zum anderen die Fluoreszenz gegenüber Fluorchinolonen eine sehr hohe Sensitivität aufweist. Dennoch ist die Bestimmungsgrenze (1 µg/L) nicht ausreichend, um wie in dieser Arbeit, Enrofloxacin in den vor der Behandlung entnommenen Kontrollproben quantifizieren zu können.

Tendenziell sind die mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion bestimmten Konzentrationen für Enrofloxacin (1 mg/kg KG Enrofloxacin) sowie Ciprofloxacin (3 mg/kg KG Enrofloxacin) deutlich niedriger. Dafür könnten mehrere methodische Gründe verantwortlich sein: Außer der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan als Lösungsmittel wurden keine weiteren Aufarbeitungsschritte durchgeführt, so dass sich im Probenextrakt eine Vielzahl von störenden Matrixbestandteilen befinden könnten, die mit den Analyten co-eluieren und somit die Bestimmung beeinflussen. Des Weiteren wurden die in der Arbeit von Frau Dr. G. Scherz eingesetzten HPLC-Vials ebenfalls in der vorliegenden Arbeit getestet. Dabei hat sich gezeigt, dass bereits ein Teil der Analyten (bis zu 30 %) am Glas adsorbiert. In der vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grund spezifizierte HPLC-MS-Vials verwendet, die vom Hersteller speziell vorbehandelt wurden. Bei entsprechender Kalibrierung sollte die Adsorption ausgeglichen werden. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass die Analyten in Standardlösungen und in extrahierten Matrixproben ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten aufweisen. Eine weitere Möglichkeit, insbesondere für die verglichenen Ciprofloxacin-Konzentrationen, könnte sein, dass die mittels HPLC-FLD quantifizierten Konzentrationen im Bereich der Bestimmungsgrenze liegen und somit größeren Messunsicherheiten unterliegen.

12.6 Stallstaubproben

Stallstaub setzt sich im Wesentlichen aus Hautpartikeln, Futter und getrockneten Ausscheidungen zusammen (Frey und Löscher 2002). Die Aufnahme von antibiotikahaltigem Stallstaub über die Stallluft kann wie bereits beschrieben zur Induktion von resistenten Mikroorganismen führen und könnte somit eine Gefahr für den Tierbestand aber auch für den Landwirt darstellen.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 86 Sedimentationsstaubproben aus Schweine- und Hühnerställen untersucht. Dabei wurden in 46 Proben, die zwischen 1980 und 2000 gesammelt wurden, keine Fluorchinolone detektiert. Dies ist durchaus plausibel, da die untersuchten Fluorchinolone erst Ende der 1980er Jahre (Enrofloxacin 1987) bzw. Mitte der 1990er Jahre (Marbofloxacin 1995 und Difloxacin 1996) entwickelt wurden und zunächst als Reserveantibiotika eingestuft wurden (Sukul und Spiteller 2007). Des Weiteren muss bedacht werden,

dass diese Antibiotika im Vergleich zu anderen sehr teuer sind und deshalb zurückhaltender eingesetzt wurden.

Dies änderte sich jedoch in den folgenden Jahren und so konnten Marbofloxacin (in 94 % der Proben), Ciprofloxacin (in 31 % der Proben) und Enrofloxacin (in 97 % der Proben) in Proben aus den Jahren 2005 und 2009 nachgewiesen werden. Das Verhältnis von Enrofloxacin zu Ciprofloxacin für die Proben, in denen beide Analyten bestimmt werden konnten, schwankt zwischen 1:4 und 1:25. Dies ist vergleichbar mit den in dieser Arbeit ermittelten durchschnittlichen Metabolisierungen für Hühnerfaeces. Difloxacin konnte in einer Probe qualifiziert aber nicht quantifiziert werden.

Betrachtet man den Konzentrationsverlauf von Forschungsstall R für Marbofloxacin im Vergleich zu den beiden Ställen des Schweinemastbetriebes E so ist davon auszugehen, dass dort möglicherweise eine Studie mit diesem Antibiotikum durchgeführt wurde. Wahrscheinlich wurden die Versuche mit zwei Gruppen durchgeführt, da zwischen den beiden Maximalkonzentrationen an Marbofloxacin 5 Monate liegen und eine Schweinemast in konventionellen Betrieben ca. 18 Wochen in Anspruch nimmt.

12.7 Identifizierung möglicher Enrofloxacin-Metaboliten

Fluorchinolone werden häufig in N-Desmethyl-, N-Desethyl- oder N-Oxid-Analoga metabolisiert (Horie *et al.* 1994). Jedoch ist neben Ciprofloxacin als Hauptmetabolit wenig über weitere Enrofloxacin-Metaboliten bekannt. In Schweden wurde 2006 erstmals Enrofloxacin-N-Oxid in Lebermikrosomen von Schweinen identifiziert (Lykkeberg 2006), konnte aber bisher in keinem weiteren Säugetier detektiert werden. Im Gegensatz zu Säugetieren zeigen Pilze – insbesondere Basidiomyceten – ein hohes Transformationspotential gegenüber Enrofloxacin (Wetzstein *et al.* 1997; Wetzstein *et al.* 2006). Vorwiegende Transformationsreaktionen sind Hydroxylierungen, Decarboxylierung sowie Desethylierung, welche auch in Geflügel und Säugetieren möglich sind.

Screening-Untersuchungen mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie haben gezeigt, dass von den fünfzehn untersuchten Enrofloxacin-Metaboliten möglicherweise fünf in Hühnerfaecesproben vorhanden sind. Mittels hochauflösender Massenspektrometrie konnten die Metaboliten m/z 332, m/z 374 und m/z 376 auf Grund der exakten Masse sowie charakteristischen Produktionen identifiziert werden. Die Entstehung dieser Metaboliten durch Hühner ist bisher nicht bekannt. Jedoch ist zu beachten, dass die Metabolisierung mit < 1 % sehr

gering ist (ausgehend davon, dass die Ionisierung der Metaboliten ähnlich zu Enrofloxacin erfolgt). Den größten Anteil macht dabei m/z 332 mit 0,58 %, gefolgt von m/z 376 mit 0,34 % und m/z 374 mit 0,13 % aus.

Die Metabolisierung von Wirkstoffen ist notwendig, um ihre Ausscheidung zu beschleunigen und findet hauptsächlich in der Leber aber auch in geringem Umfang in Darm, Lunge sowie Niere statt. Dabei unterscheidet man zwei Phasen: Phase-I- und Phase-II-Reaktionen (z. B. Dealkylierung, Desaminierung, Substitutionen, Oxidation von Alkoholen und aromatische Decarboxylierung) in Phase-I beruhen u. a. auf der Umsetzung des Wirkstoffes durch Cytochrom P450-Enzyme. Die in Phase-II gebildeten Produkte, welche sich durch eine hohe Hydrophilie auszeichnen, sind auf Konjugationsreaktionen (z. B. Glukuronidierung, Sulfatierung und Acetylierung) mit den in Phase I entstandenen Produkten sowie endogenen Verbindungen zurückzuführen. Der Metabolismus ist dabei stark vom eingesetzten Wirkstoff sowie der Spezies abhängig (Frey und Löscher 2002).

Der Metabolismus, der in dieser Arbeit identifizierten Metaboliten beruht ausschließlich auf Phase-I-Reaktionen wie Decarboxylierung (m/z 332), Hydroxylierung (m/z 332, 374 und 376) und der Substitution von Fluor (m/z 376). Die Substitution des Fluoratoms durch eine Hydroxylgruppe ist eine eher unerwartete Reaktion, da C-F Bindungen auf Grund der hohen Bindungsenergie als sehr stabil gelten. Dennoch ist für Marbofloxacin in Aras, welche wie das Huhn ebenfalls zur Klasse der Vögel gehören, eine ähnliche Reaktion beschrieben, bei der Fluor durch Sauerstoff oder Schwefel substituiert wird (Hunter *et al.* 2007).

12.8 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurden neue, selektive, sensitive, robuste sowie zuverlässige Extraktionsmethoden zur Bestimmung von vier Fluorchinolonen (Marbofloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Difloxacin) in Hühnerplasma, Hühnerfaeces und Stallstaub mittels HPLC-MS/MS entwickelt. Die Extraktion von Hühnerfaeces und Stallstaub erfolgte mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion, wobei sich die starke Sorption insbesondere von Ciprofloxacin an Matrixbestandteile als schwierig erwiesen hat. Zur Extraktion von Hühnerplasma wurde die Festphasenextraktion zur Probenvorbereitung verwendet. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Bestimmung und Minimierung von Matrixeffekten ein wichtiger Schritt im Rahmen der Methodvalidierung ist, da ansonsten die Zuverlässigkeit der Methode beeinflusst werden kann. Die besten Analytwiederfindungen und geringsten Matrixeffekte wurden mit einer Kombination aus einem Mixed-Mode-Anionen- und -Kationenaustauscher erzielt. Des

Weiteren belegen die Ergebnisse, dass Phospholipide in der Plasmaanalytik geeignete Marker für Matrixeffekte darstellen.

In Hühnerfaeces von Tieren, die mit der vom Hersteller empfohlenen Dosis von 10 mg/kg KG sowie Verschleppungsdosen von 0,3 mg/kg, 1 mg/kg und 3 mg/kg KG Enrofloxacin behandelt wurden, konnten Enrofloxacin und sein Metabolit Ciprofloxacin nachgewiesen werden. Beide Antibiotika wurden ebenfalls in vor der Behandlung entnommenen Faecesproben detektiert und quantifiziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, dass das Vorhandensein der beiden Antibiotika in Stallstaub am wahrscheinlichsten auf die Verteilung getrockneter Faecespartikel zurückzuführen ist. Möglich wäre somit eine Wiederaufnahme subtherapeutischer Konzentrationen von Enrofloxacin sowie Ciprofloxacin über die Stallumgebung und die damit verbundene Induktion resistenter Mikroorganismen, welche ebenfalls über die Luft aufgenommen werden können.

Weitere Studien in denen die Korrelation zwischen der Enrofloxacin- und Ciprofloxacin-Konzentration in Faecesproben sowie der Entwicklung resistenter Keime bestimmt wird, wären erforderlich, um so u. U. einen Schwellenwert (Antibiotikakonzentration in Faeces) bestimmen zu können ab dem vermehrt Resistenzen auftreten. Des Weiteren sind zusätzliche Studien sinnvoll, in denen die Aufnahme subtherapeutischer Konzentrationen unter realistischen Bedingungen simuliert wird. Beispielsweise indem unbehandelte Tiere in einen Stall gehalten werden in dem zuvor Tiere mit therapeutischen Fluorchinolondosen behandelt wurden und der zum einen gar nicht oder als Vergleich gründlich gereinigt wurde. Die Bestimmung der Antibiotikakonzentration in Plasma-, Faeces, Staub- sowie Luftproben und die Verfolgung der Resistenzentwicklung würden weitere Rückschlüsse erlauben.

13. Material und Methoden

13.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tab. 13.1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Gerät	Modell	Hersteller
Dispenser	Ceramus Classic 10 - 60 mL	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Feinwaage	BP 211 D	Sartorius, Göttingen, D
HPLC-System	UltiMate 3000	
• Binäre Pumpe	Ultimate 3000 RS Pump	
• Autosampler	Ultimate 3000 RS Autosampler	
• Säulenofen	Ultimate 3000 RS Column Compartment	Dionex, Sunnyvale, USA
• UV/Vis-Detektor	Ultimate 3000 RS Variable Wavelength Detector	
HPLC-MS Vials		
• 2 mL	MSCert4000 - 40W	National Scientific, Rockwood, USA
• 200 µL	MSCert4000 - 36LVW	
Mikroliter-Spritzen		
• 100 µL	1710 RN	Hamilton, Höchst, D
• 1000 µL	1001 RNR	
Laborwaage	EW 6200 - 2NM	Kern & Sohn, Balingen, D
Magnetrührer	RCT classic	IKA®, Staufen, D
Mikrowelle	MLS-ETHOS plus	MLS, Leutkirch, D
pH-Meter	pH 730	WTW, Weilheim, D
Pipetten		
• 0,5 - 10 µL	m10	
• 2 - 20 µL	m20	
• 10 - 100 µL	m100	Biohit, Rosbach, D
• 20 - 200 µL	m200	
• 100 - 1000 µL	m1000	
• 500 - 5000 µL	m5000	
Pyrolyseofen	HBA 70B550	Bosch, Gerlingen, Deutschland
Reaktionsgefäße		
• 1,5 mL	Safe Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg, D
• 2,0 mL		
Reinstwasser-Anlage	Arium 611VF	Sartorius, Göttingen, D
Rotationsverdampfer	RV 10 digital	IKA®, Staufen, D
Schüttler	KS 130 basic	IKA®, Staufen, D
SPE-Kammer	spe-12G	Avantor, Center Valley, USA
Spitzkolben		Lenz Laborglas, Wertheim, D
• 10 mL		
• 25 mL		
• 50 mL		
Spritzenpumpe		Havard Apparatus, Holliston, USA
Spülmaschine	G 7883 CD	Miele, Gütersloh, Deutschland
Triple-Quadrupol-Massen- spektrometer mit Turbo Ionspray Interface	API 3000	AB Sciex, Framingham, USA

Ultraschallbad	USC 300TH	VWR, Darmstadt, D
Umwälzkühler	Unichiller UC006	Huber, Offenburg, D
Vakuumpumpe	ME 1C	vacuubrand, Wertheim, D
Vortexer	Q4	VWR, Darmstadt, D
Zentrifugen		
• Reaktionsgefäße	Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Langerwehe, D
• Zentrifugenröhrchen	Universal 320 R	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifugenröhrchen		
• 15 mL	Cellstar® Tubes, 15 mL PP	Greiner Bio One, Frickenhausen, D
• 50 mL	Cellstar® Tubes, 15 mL PP	

Tab. 13.2: Verwendete Festphasenextraktionskartuschen.

Handelsname	Sorbentmenge	Kartuschenvolumen	Hersteller
Bakerbond SDB	200 mg	6 mL	Avantor, Center Valley, USA
Chromabond® Easy	500 mg	3 mL	
Chromabond® HR-XA	200 mg	3 mL	Macherey & Nagel, Düren, D
Chromabond® HR-XC	200 mg	3 mL	
Empore™ C8	Membran	3 mL	
Empore™ SDB-RPS	Membran	3 mL	3M, Neuss, D
Empore™ UR	Membran	3 mL	
HyperSep C18	500 mg	6 mL	
HyperSep Retain PEP	500 mg	3 mL	Thermo Fisher Scientific, Langerwehe, D
HyperSep Retain-CX	500 mg	3 mL	
Isolute ENV+	200 mg	6 mL	Biotage, Uppsala, SWE
Oasis HLB	60 mg	3 mL	
	200 mg	6 mL	
Oasis MAX	150 mg	3 mL	Waters, Eschborn, D
Oasis MCX	150 mg	3 mL	
Strata X	200 mg	3 mL	
	200 mg	6 mL	Phenomenex, Aschaffenburg, D

13.2 Chemikalien

Tab. 13.3: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Aceton	99,9 %	VWR, Darmstadt, D
Acetonitril	HPLC Grade	Avantor, Center Valley, USA
Ameisensäure	p.a., 98 - 100 %	AppliChem, Darmstadt, D
Ammoniak	min. 25 %	VWR, Darmstadt, D
Ammoniumacetat	p.a., ≥ 98 %	Merck, Darmstadt, D
Chloroform	p.a.	Merck Darmstadt, D
Ciprofloxacin	99,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ciprofloxacin d8 HCl * 1,5 H ₂ O	99,9 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Citronensäure Monohydrat	p.a., 99,5 - 100,5 %	Merck Darmstadt, D
Dichlormethan	HPLC Grade	Thermo Fisher Scientific, Langerwehe, D
Difloxacin HCl	99,0 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
EDTA Dihydrat	98,5 - 101,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

Enrofloxacin	99,0 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Isopropanol	HPLC Grade	VWR, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a., 99,5 - 100,5 %	Merck Darmstadt, D
Marbofloxacin	98,9 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Methanol	HPLC Grade	Avantor, Center Valley, USA
MTBE	p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogenphosphat	p.a., $\geq 99,5$ %	Merck Darmstadt, D
Natriumhydroxid	p.a., ≥ 99 %	Merck Darmstadt, D
Phosphorsäure 85 %	reinst, 84 - 86 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Reinstwasser	R > 18 M Ω	Hausanlage von Sartorius, Göttingen, D
Salzsäure 37 %	p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, D
Stickstoff	mind. 99 %	Interne Anlage

13.2.1 Herstellung Fluorchinolonstandards

Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL wurden hergestellt, indem 1 mg ($\pm 0,01$ mg) des jeweiligen Fluorchinolons und des internen Standards (Ciprofloxacin d8) in einem definierten Volumen 0,5 %iger Ameisensäure gelöst wurden. Mischstandards wurden durch das Verdünnen der Stammlösungen mit 0,5 % Ameisensäure in 1 mM Ammoniumacetat und Methanol (1:1, v:v) hergestellt. Fluorchinolon-Stammlösungen wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und waren mindestens 1 Jahr stabil.

13.3 HPLC-ESI-MS/MS-Methoden

13.3.1 HPLC-Methode

Zur chromatographischen Trennung wurde eine Accucore Phenyl-Hexyl Säule (100 x 2,1 mm; 2,6 μ m) von Thermo Fisher Scientific (Langerwehe, D) verwendet. Als Eluentensystem wurden 0,5 % Ameisensäure in 1 mM Ammoniumacetat (Eluent A) und Methanol (Eluent B) eingesetzt. Der ursprüngliche Gradient sowie der modifizierte Gradient sind in Tab. 13.4 aufgeführt. Der ursprüngliche Gradient wurde ausschließlich im Rahmen der Methodenentwicklung für die Bestimmung von Fluorchinolonen in Hühnerplasma verwendet. Die Säulentemperatur wurde auf 30 °C eingestellt. Proben wurden bis zur Messung im Autosampler bei 10 °C aufbewahrt. Als Waschlösung für das Injektionssystem wurden 50 % Methanol verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 2 μ L. Um Rückschlüsse auf die Reinheit der Probeextrakte ziehen zu können, wurde zusätzlich zur massenselektiven Detektion ein UV-Detektor mit einer Wellenlänge von 280 nm eingesetzt. Eine Beurteilung über die Reinheit der Probenextrakte ist auf Grund der selektiven Detektion mittels MS/MS nicht möglich. Der HPLC-Fluss wurde vor Infusion in das Massenspektrometer in einem Verhältnis von 1:10 gesplittet.

Tab. 13.4: Ursprünglicher (links) und modifizierter (rechts) HPLC-Gradient (Eluent A: 0,5 % Ameisensäure in 1 mM Ammoniumacetat, Eluent B: Methanol).

	Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]		Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
Ursprünglicher Gradient	0,0	0,20	95	5	Modifizierter Gradient	0,0	0,25	80	20
	0,5	0,20	95	5		0,5	0,25	80	20
	1,0	0,20	79	21		4,5	0,25	80	20
	6,0	0,20	79	21		7,0	0,25	30	70
	7,0	0,20	63	37		7,1	0,60	5	95
	8,0	0,20	5	95		10,0	0,60	5	95
	14,0	0,20	5	95		10,1	0,25	80	20
	15,0	0,20	95	5		12,0	0,25	80	20
	18,0	0,20	95	5					

13.3.2 ESI-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Fluorchinolonen

Die Erfassung der Analyten erfolgte im Selected Reaction Monitoring (SRM) Modus. Für die Bestimmung der optimalen massenspektrometrischen Detektionsparameter für Marbofloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Difloxacin sowie den internen Standard Ciprofloxacin d8 wurde ein konstanter Analytfluss (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) mit einer Konzentration von 1 ng/ μL mittels einer Spritzenpumpe in das Massenspektrometer infundiert. Simultan wurde eine HPLC-Flussrate (70 % Eluent A/30 % Eluent B) von 0,025 μL infundiert. Die zwei intensivsten Produktionen jedes Analyten (Abb. 13.1) wurden in die Methode integriert welche anschließend für die Analytik der Fluorchinolone in verschiedenen Matrices verwendet wurde.

Für die Ionisierung wurden für alle Analyten folgende Parameter verwendet: Kapillarspannung 5000 V, Zerstäubungsgas (Stickstoff) 8, Curtain Gas (Stickstoff) 8, Kollisionsgas (Stickstoff) 4 und Quelltemperatur 250 °C. Die Gasflüsse werden in gerätespezifischen Einheiten angegeben und können nicht umgerechnet werden. Zur Detektion wurde der Sekundärelektronenvervielfacher auf 2400 V eingestellt. Die Detektion der Analyten erfolgte im Positivmodus. Die optimalen Potentiale sowie Produktionen sind in Tab. 13.5 dargestellt. Als Aufnahmezeit pro Massenübergang wurden 500 ms gewählt.

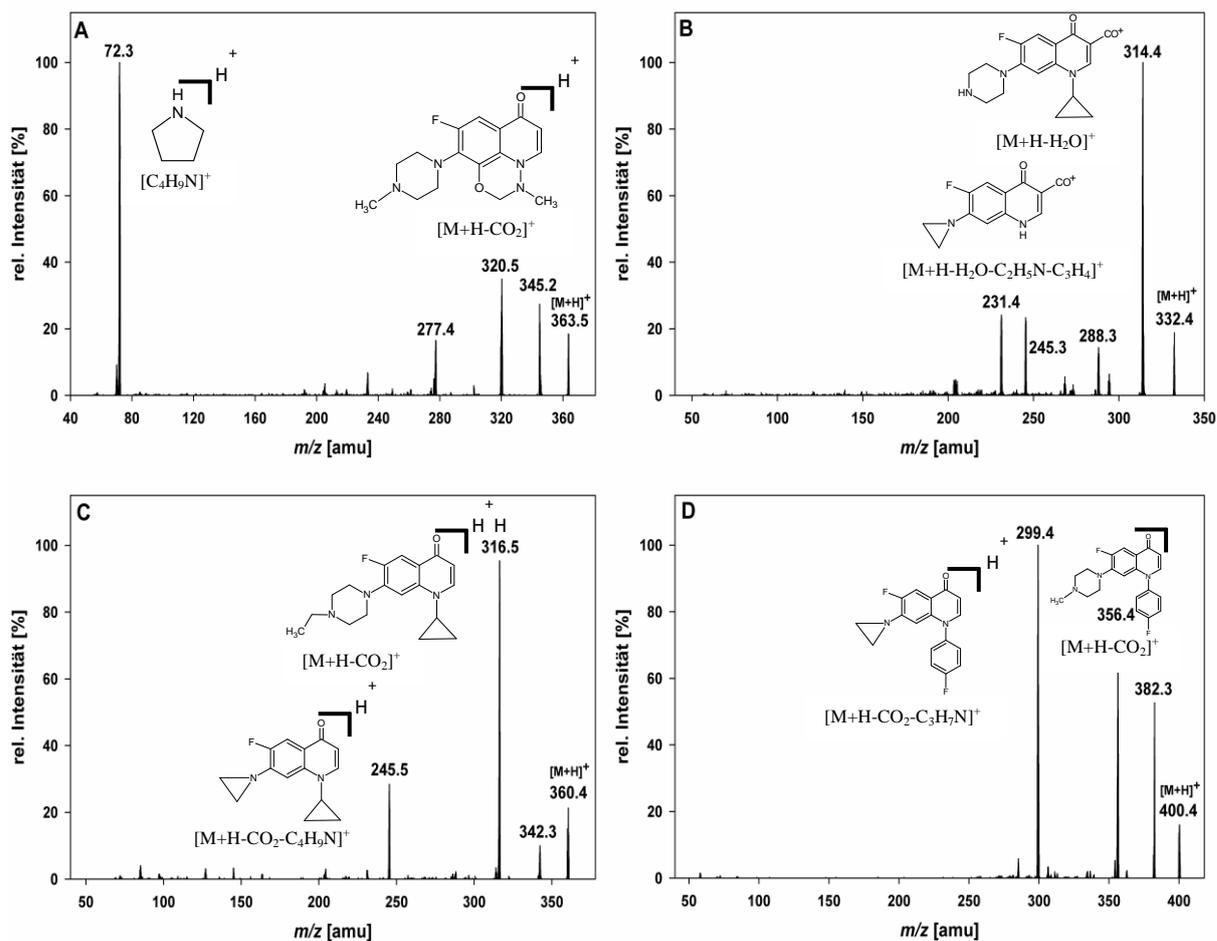


Abb. 13.1: Produktionen Scans für Marbofloxacin (A), Ciprofloxacin (B), Enrofloxacin (C) und Difloxacin (D).

Tab. 13.5: Massenspektrometrische Parameter für die Detektion von Fluorchinolonen (DP: Declustering Potential, FP: Fokussierungs Potential, EP: Eintrittspotential, CE: Kollisionsenergie, CEP: Eintrittspotential Kollisionszelle, BP: Basispeak).

	Vorläuferion				Produkt- ionen		
	$[M+H]^+$ [m/z]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	(m/z)	CE [V]	CEP [V]
Ciprofloxacin	332,4	70	180	15	231,4	52	13
					314,4 (BP)	32	8
Ciprofloxacin d8	340,5	70	180	15	235,4	54	13
					322,5	33	8
Difloxacin	400,4	70	200	15	299,4	41	18
					356,4 (BP)	29	9
Enrofloxacin	360,4	70	190	15	245,5	38	15
					316,5 (BP)	29	20
Marbofloxacin	363,5	70	180	15	72,3 (BP)	46	13
					320,5	23	20

13.3.3 MS/MS-Methoden zur Bestimmung von Phospholipiden in Hühnerplasma

Für die Detektion von Phospholipiden in Hühnerplasma wurden verschiedene MS/MS-Methoden (Neutralverlust Scan, stoßinduzierte Dissoziation in der Ionenquelle, Vorläuferionen Scan sowie Selected Reaction Monitoring) bezüglich ihrer Selektivität und Sensitivität miteinander verglichen.

Neutralverlust Scan

Mit Hilfe des Neutralverlust Scans von 141 Da im Positivmodus können Phosphatidylethanolamine und Lyso Phosphatidylethanolamine erfasst werden. Der gescannte Massenbereich betrug m/z 350 - 1000. Die Aufnahmezeit wurde auf 500 ms eingestellt. Weitere MS-Parameter sind Tab. 13.6 zu entnehmen.

Tab. 13.6: MS-Parameter des Neutralverlust Scans von 141 Da.

Declustering Potential	Fokussierungspotential	Eintrittspotential	Kollisionsenergie	Austrittspotential Kollisionszelle
50 V	250 V	6 V	40 V	10 V

Stoßinduzierte Dissoziation in der Ionenquelle

Bei der stoßinduzierten Dissoziation innerhalb der Ionenquelle im Positivmodus wurde das charakteristische Produktion m/z 184,1 zur simultanen Erfassung von Phosphatidylcholinen, Lyso Phosphatidylcholinen und Sphingomyelinen verwendet. Lyso Phosphatidylcholine generieren ein weiteres charakteristisches Produktion (m/z 104,1), wodurch sie alleinig erfasst werden können. Da die Fragmentierung in der Ionenquelle stattfindet und keine weitere Fragmentierung erwünscht ist, wurde die Kollisionsenergie auf ein Minimum reduziert. Q1 und Q3 wurden jeweils auf das charakteristische Produktion eingestellt. Als Aufnahmezeit wurden 500 ms verwendet. Weitere MS-Parameter sind in Tab. 13.7 aufgeführt.

Tab. 13.7: MS-Parameter der stoßinduzierten Dissoziation innerhalb der Ionenquelle für die Produktionen m/z 184,1 und m/z 104,1.

Declustering Potential	Fokussierungspotential	Eintrittspotential	Kollisionsenergie	Austrittspotential Kollisionszelle
120 V	250 V	6 V	5 V	10 V

Vorläuferionen Scan

Mit Hilfe des Vorläuferionen Scans des charakteristischen Fragments von m/z 184,1 im Positivmodus können Phosphatidylcholine, Lyso Phosphatidylcholine und Sphingomyeline simultan erfasst werden. Der Vorläuferionen Scan von m/z 153,3 im Negativmodus eignet sich zur Erfassung von Phosphatidylsäuren, Phosphatidylinositolen, Phosphatidylserinen, Phosphatidylglycerinen, Phosphatidylcholinen und Lyso Phosphatidylcholine. Dabei wurde der Q3 auf das jeweilige Produktion eingestellt und Q1 scannte einen Massenbereich von m/z 350 - 1000. Die Aufnahmezeit wurde auf 500 ms eingestellt. Weitere MS-Parameter sind in Tab. 13.8 ersichtlich.

Tab. 13.8: MS-Parameter des positiven Vorläuferionen Scans von m/z 184,1 und des negativen Vorläuferionen Scans von m/z 153,3.

Declustering Potential	Fokussierungs Potential	Eintrittspotential	Kollisionsenergie	Austrittspotential Kollisionszelle
± 50 V	± 250 V	± 6 V	± 40 V	± 10 V

Selected Reaction Monitoring

Für die Erfassung der Phospholipide mittels Selected Reaction Monitoring wurden spezifische Massenübergänge und Phospholipidmassen für jede Phospholipidklasse, die mit Hilfe einer Literaturrecherche (Pang *et al.* 2008; Pulfer und Murphy 2003; Uran *et al.* 2001; Xia und Jemal 2009; Zemski Berry und Murphy 2004) ermittelt wurden, verwendet und durch eigene Überlegungen (z. B. Auswahl charakteristischer Produktionen auf Grund der Molekülstruktur) ergänzt. Entsprechend ihrer Polarität und Intensität wurden jeweils die spezifischen Massenübergänge von zwei Phospholipidklassen in einer SRM Methode zusammengefasst. Dies resultierte in insgesamt vier SRM Methoden wodurch pro Injektion zwei Phospholipidklassen erfasst werden konnten. Zudem wurde darauf geachtet, nicht mehr als 20 spezifische Massenübergänge in eine Methode zu integrieren, um eine sensitive Erfassung ohne Intensitätsverluste zu gewährleisten. Die verwendeten MS-Potentiale sind für alle vier Methoden im Positivmodus sowie im Negativmodus identisch und in Tab. 13.9 aufgeführt. Als Aufnahmezeit pro Massenübergang wurde für alle Methoden 200 ms gewählt.

Tab. 13.9: MS-Potentiale zur Erfassung von Phospholipiden im positiven sowie im negativen Selected Reaction Monitoring Modus.

Declustering Potential	Fokussierungs Potential	Eintrittspotential	Eintrittspotential Kollisionszelle	Austrittspotential Kollisionszelle
± 60 V	± 250 V	± 10 V	± 12 V	± 15 V

Spezifische Phosphatidylcholin und Lyso Phosphatidylcholin Massenübergänge wurden in eine SRM Methode (Positivmodus) integriert (Tab. 13.10).

Tab. 13.10: Massenübergänge und Kollisionsenergien zur Erfassung von Phosphatidylcholinen und Lyso Phosphatidylcholinen im positiven Selected Reaction Monitoring Modus.

Phospholipidklasse	Vorläuferionen [M+H] ⁺ [m/z]	Produktion [m/z]	Kollisionsenergie [V]
	706,5; 734,5; 756,5		40
Phosphatidylcholine	758,6; 760,5; 772,6; 774,5; 784,5; 786,5; 790,5	184,1	45
	806,5; 810,5; 834,5		50
Lyso Phosphatidylcholine	496,1; 508,3; 520,3; 522,3; 524,4; 544,3	184,1	35

In eine weitere SRM Methode im Positivmodus wurden spezifische Sphingomyelin und Phosphatidylethanolamin Massenübergänge integriert (Tab. 13.11).

Tab. 13.11: Massenübergänge und Kollisionsenergien zur Erfassung von Sphingomyelinen und Phosphatidylethanolaminen im positiven Selected Reaction Monitoring Modus.

Phospholipidklasse	Vorläuferionen [M+H] ⁺ [m/z]	Produktion [m/z]	Kollisionsenergie [V]
	703,5; 731,6; 735,6; 747,7; 763,7; 775,7; 777,7; 779,7	184,1	40
Sphingomyeline	803,7; 807,7		45
	454,3	313,3	
	718,5	577,5	
	740,5	599,5	
	742,5	601,5	
Phosphatidylethanolamine	744,5	603,5	35
	746,5	605,5	
	748,5	607,5	
	764,5	623,5	
	766,5	625,5	
	768,5	627,5	

Die spezifischen Massenübergänge der Phosphatidylserine und Phosphatidylglycerine wurden in eine SRM Methode im Positivmodus zusammengefasst (Tab. 13.12).

Tab. 13.12: Massenübergänge und Kollisionsenergien zur Erfassung von Phosphatidylserinen und Phosphatidylglycerinen im positiven Selected Reaction Monitoring Modus.

Phospholipidklasse	Vorläuferionen [M+H] ⁺ [m/z]	Produktion [m/z]	Kollisionsenergie [V]
Phosphatidylserine	810,5	626,5	35
	812,5	628,5	
	834,5	650,5	
Phosphatidylglycerine	771,5	600,5	45
	799,5	628,5	

Im Negativmodus wurden die spezifischen Massenübergänge von Phosphatidylinositolen und Phosphatidsäure mittels SRM erfasst (Tab. 13.13).

Tab. 13.13: Massenübergänge und Kollisionsenergien zur Erfassung von Phosphatidylinositolen und Phosphatidsäure im negativen Selected Reaction Monitoring Modus.

Phospholipidklasse	Vorläuferionen [M+H] ⁺ [m/z]	Produktion [m/z]	Kollisionsenergie [V]
Phosphatidylinositole	833,5	241,2	- 50
	857,5		
	859,5		
	861,6		
	863,5		
	883,5		
	885,5		
Phosphatidsäure	887,5	153,1	- 40
	671,4		

13.3.4 Geräteparameter hochauflösende Massenspektrometrie

Ausgewählte Proben wurden zur Massenidentifizierung möglicher Enrofloxacin-Metaboliten mittels Q Exactive (Thermo Scientific, Langewehe, Deutschland) am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität Gießen analysiert. Die verwendeten Geräteparameter sind in Tab. 13.14 zusammengefasst.

Tab. 13.14: Geräteparameter der hochauflösenden Massenspektrometrie.

Ionisierung	Polarität	Positiv
	Kapillarspannung	4100 V
	Quellentemperatur	300 °C
Full MS	Auflösung	70000
	Massenbereich	<i>m/z</i> 300 - 460
	Aufnahmezeit	250 ms
MS/MS	Auflösung	35000
	Massentoleranz	4 mmu
	Kollisionsenergie	45 %

13.3.5 Software zur Datenaufnahme und -auswertung

Mit Hilfe der Software Dionex Chromatography MS Link 2.8.0.2633 (Dionex Corporation, Sunnyvale, USA) wurde die simultane Steuerung von HPLC und Triple-Quadrupol-Massenspektrometer ermöglicht. Die Datenaufnahme sowie Integration der Messsignale wurde mittels Analyst 1.4.2 (AB Sciex, Framingham, USA) durchgeführt. Die statistische Auswertung der ermittelten Messdaten erfolgte unter Verwendung von Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA). Für die graphische Auswertung der Messdaten wurde SigmaPlot 11 (Systat Software, San Jose, USA) verwendet.

13.4 Probenmaterial

13.4.1 Hühnerplasma

Plasma von unbehandelten Hühnern, das im Rahmen von Routineuntersuchungen entnommen wurde, wurde von der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen, dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover sowie der Lohmann Tierzucht GmbH in Cuxhaven zur Verfügung gestellt. Das Plasma wurde gepoolt und bis zur Verwendung (Methodenentwicklung und Methodvalidierung) bei -20 °C aufbewahrt.

13.4.2 Hühnerfaeces

Faeces von unbehandelten Junghennen, die im Rahmen von Routinediagnostik entnommen wurde, wurde von der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt und zur Methodenentwicklung sowie Methodvalidierung verwendet. Die Faeces wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

13.4.3 Stallstaub

Als Probenmaterial wurden Stallstaubproben (Probenset 1) aus der Sammlung von Herrn Prof. Dr. Jörg Hartung vom Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover verwendet. Die untersuchten Stallstaubproben können in vier Gruppen eingeteilt werden:

- Probe 1 - 20 (aus einem Schweinestall)
- Probe 21 - 24 (aus verschiedenen Hühnerställen)
- Probe 25 - 32 (aus verschiedenen Schweineställen)
- Probe 33 - 46 (aus verschiedenen Schweineställen)

Die Proben 1 - 32 wurden bereits auf die Anwesenheit u. a. von Sulfonamiden und Tetrazyklinen untersucht (Hamscher *et al.* 2003). Die Proben 33 - 46 wurden bisher noch nicht untersucht, aber es ist davon auszugehen, dass sie frei von Fluorchinolonen sind. Daher wurde aus diesen Proben eine Mischprobe gewonnen, die für die Methodenentwicklung und Methodvalidierung verwendet wurde. Für die Proben 21 - 46 liegen keine weiteren Angaben vor.

Die Proben 1 - 20 wurden jährlich im Zeitraum zwischen 1981 und 2000 gesammelt. Es handelt sich dabei um Sedimentationsstaub von Schweinemastbetrieben in denen 350 - 420 Tiere gehalten wurden. In einer Höhe von 1,5 m (durchschnittliche Atmungshöhe des stehenden Menschen) wurde in der Mitte des Stalls ein Metallrahmen (mit einer Aluminiumfolie beschichtet) mit einer Sammelfläche von 3 dm² (38 × 79 cm) befestigt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 14 - 30 Tagen gesammelt. Das Vorgehen wurde 10 - 15 Mal pro Jahr wiederholt. Aus diesen Proben wurde eine Probe gewählt und dem eigenen Probensortiment hinzugefügt. Die Proben wurden bis zur Analytik in luftdicht verschlossenen Reagenzgläsern im Kühlschrank bei 4 °C gelagert (Hamscher *et al.* 2003).

Zusätzlich wurden 40 weitere Sedimentationsstaubproben (Probenset 2) aus der Sammlung von Herrn Prof. Dr. Jörg Hartung untersucht. Dabei handelt es sich u. a. um 13 Proben aus einem Forschungsstall R (anonymisiert). Diese Proben wurden zwischen Dezember 2004 und Dezember 2005 gesammelt. Des Weiteren wurden 23 Proben, die innerhalb des Jahres 2009 in einem Schweinemastbetrieb E (anonymisiert) genommen wurden, untersucht. Abschließend wurden vier weitere Sedimentationsstaubproben aus dem Jahr 2000 eines Schweinemastbetriebes V (anonymisiert) analysiert.

13.5 Methoden zur Evaluierung und Minimierung von Matrixeffekten in der Analytik von Hühnerplasma

13.5.1 Einfluss des Elutionsmittels

Der Einfluss des verwendeten Elutionsmittels auf die Phospholipid-Elution wurde untersucht. Hierzu wurden folgende Elutionsmittel getestet: Acetonitril, 2 % Ameisensäure in Acetonitril, Methanol und 2 % Ameisensäure in Methanol.

13.5.2 Qualitativer Matrixeffekt

Die Bestimmung des qualitativen Matrixeffektes erfolgte mittels Post-column-Infusion. Diese Methode ermöglicht die Erfassung von Matrixeffektprofilen d. h. die Bereiche im Chromatogramm, die von Matrixeffekten betroffen sind, werden identifiziert. Bei der Post-column-Infusion Methode wird ein konstanter Analytfluss (2 $\mu\text{L}/\text{min}$) mittels einer Spritzenpumpe in das Massenspektrometer infundiert während ein Lösungsmittel Blank (Methanol) oder eine extrahierte Leermatrixprobe mittels HPLC injiziert wird. Der HPLC-Fluss wird dabei ebenfalls in das Massenspektrometer geleitet. Um die Konzentrationsabhängigkeit von Matrixeffekten zu bestimmen, wurden verschiedene Analytkonzentrationen (0,1; 1 und 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$) verwendet. Als Messsignal ergibt sich die Summe aus den beiden Massenübergängen (Tab. 12.5) für jeden Analyten. Damit eine Aussage möglich ist, welche Bereiche des Chromatogramms von Matrixeffekten betroffen sind, wurden die Messsignale von Lösungsmittel Blank und Leermatrixprobe graphisch übereinander gelegt. Des Weiteren wurde teilweise ein HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm eines Fluorchinolonstandards (1 $\text{ng}/\mu\text{L}$) in die Graphik integriert, um beurteilen zu können, ob die Fluorchinolonanalytik von Matrixeffekten beeinflusst wird.

13.5.3 Quantitativer Matrixeffekt

Der quantitative Matrixeffekt (ME) wurde ermittelt, indem eine nach der Extraktion dotierte Leermatrixprobe mit einem Mischstandard mit der entsprechenden Konzentration des Probenextraktes in Eluent A/Eluent B (1:1, v:v) ins Verhältnis gesetzt wurde. Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$ME = \left(\frac{A}{B} \times 100 \right) - 100 \text{ [%]}$$

A: Peakfläche einer nach der Extraktion dotierten Probe

B: Peakfläche eines Mischstandards mit der korrespondierenden Konzentration in Eluent A/Eluent B (1:1, v:v)

Das Analytsignal wird unterdrückt, wenn der berechnete Matrixeffekt $< 0 \%$ ist. Ein berechneter Matrixeffekt $> 0 \%$ besagt, dass das Analytsignal verstärkt wird.

13.5.4 Verschleppung von Phospholipiden

Eine mögliche chromatographische Verschleppung von Phospholipiden wurde bestimmt, indem eine extrahierte Leermatrixprobe fünfmal injiziert wurde. Anschließend wurde ein Lösungsmittel Blank fünfmal injiziert. Dabei wurden die Phospholipide mit Hilfe der in 4.3.3 beschriebenen SRM Methoden detektiert. Die Summe jeder Phospholipidklasse wurde durch Summieren der Peakflächen der jeweiligen Massenübergänge für jede Messung ermittelt. Die Verschleppung wurde berechnet indem die Summe der Peakfläche für jede Phospholipidklasse in den Lösungsmittel Blanks auf die Summe der Peakfläche für jede Phospholipidklasse in der Leermatrixprobe bezogen wurde.

13.6 Probenaufarbeitungsmethoden

13.6.1 Hühnerplasma

Strata X

Im Rahmen der Methodenoptimierung sowie bei der Minimierung und Evaluierung von Matrixeffekten in der Fluorchinolonanalytik von Hühnerplasma spielte die für Strata X entwickelte SPE-Methode eine wichtige Rolle (Abb. 13.2). Zudem wurde diese SPE-Methode zur Aufkonzentrierung sowie Reinigung von wässrigen Mikrowellenextrakten in der Methodenentwicklung von Hühnerfaeces eingesetzt.

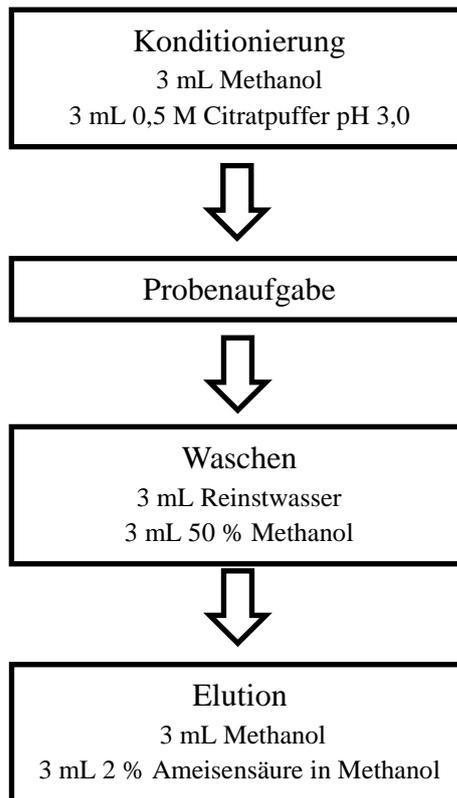


Abb. 13.2: SPE-Protokoll Strata X.

Kombination aus Oasis MAX/Oasis MCX

Für die Aufarbeitung von Hühnerplasmaproben (13.8.1) wurde eine Kombination aus Festphasenextraktionskartuschen (Abb. 13.3) bestehend aus einem Mixed-Mode-Anionenaustauscher (Oasis MAX) und einem Mixed-Mode-Kationenaustauscher (Oasis MCX) verwendet.

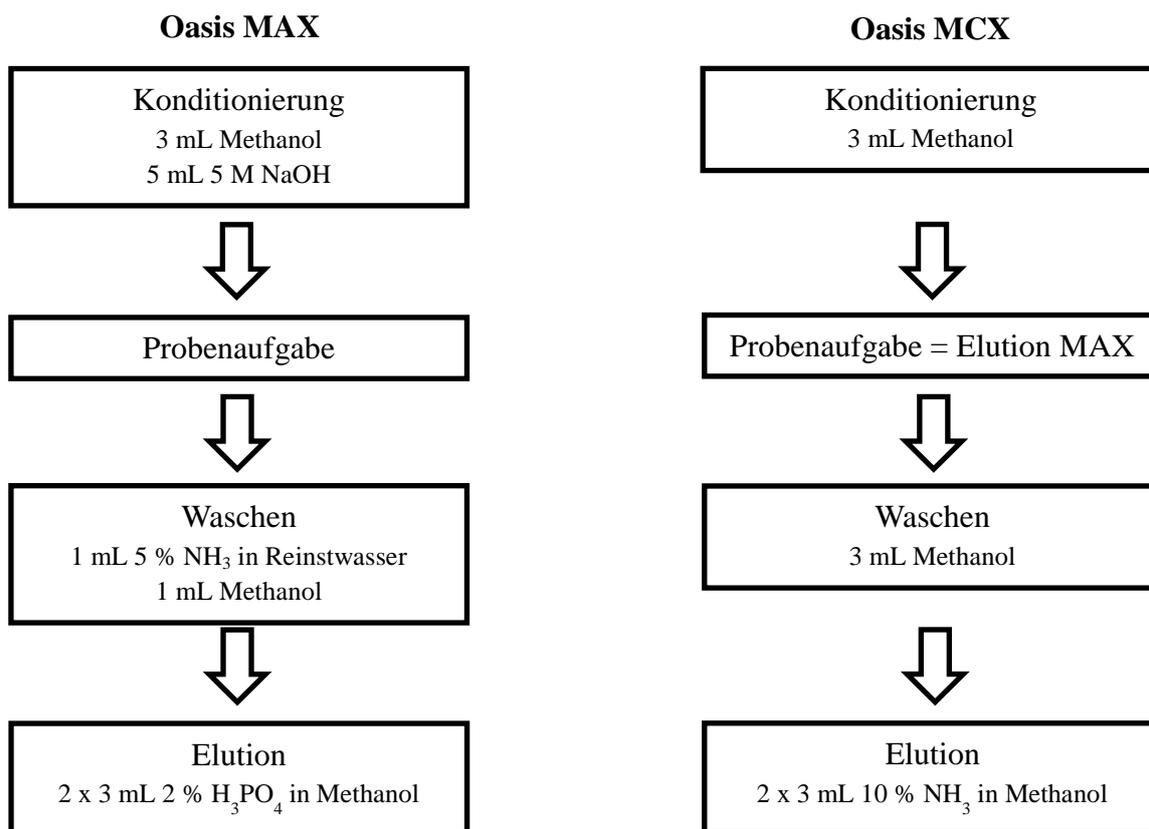


Abb. 13.3: SPE-Protokoll für die Kombination aus Oasis MAX und Oasis MCX.

13.6.2 Hühnerfaeces

Für die Extraktion wurden 1 g Hühnerfaeces in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 50 μL des internen Standards (1 $\text{ng}/\mu\text{L}$) versetzt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Anschließend wurden 2 mL 0,5 M EDTA (pH 7,0) als Puffer hinzugefügt und mit 15 mL Dichlormethan für 10 min unter Schütteln extrahiert. Das Extrakt wurde 10 min bei 3500 g zentrifugiert, die organische Phase in einen 50-mL-Spitzkolben überführt und die Extraktion zweimal mit jeweils 15 mL Dichlormethan wiederholt. Die vereinten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Wiederaufnahme der Analyten erfolgte in 500 μL Eluent A/Eluent B (1:1, v:v). Um Schwebstoffe und Partikel zu entfernen, wurde das Probenextrakt bei 13900 g für 10 min bei 10 $^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein HPLC-Vial überführt und 2 μL zur HPLC-ESI-MS/MS-Analytik eingesetzt. Diese Methode wurde zur Extraktion der Hühnerfaecesproben verwendet. Mit Ausnahme der Kontrollproben wurden alle Proben aus den vier Behandlungsszenarien 1:10 mit Eluent A/Eluent B (1:1, v:v) verdünnt.

13.6.3 Stallstaub

Zur Extraktion wurden 50 mg Stallstaub mit 20 µL des internen Standards (2,5 ng/µL) versetzt, homogenisiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 mL 0,5 M EDTA (pH 7,0) als Puffer hinzugegeben und mit 10 mL Dichlormethan für 15 min unter Schütteln extrahiert. Das Extrakt wurde bei 3500 g für 2 min zentrifugiert und die organische Phase in einen 50-mL-Spitzkolben überführt. Die Extraktion wurde zweimal mit 10 mL Dichlormethan wiederholt. Die vereinten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Die Wiederaufnahme der Analyten erfolgte in 500 µL Eluent A/Eluent B (1:1, v:v). Diese Methode wurde zur Extraktion der Stallstaubproben verwendet. Um Schwebstoffe und Partikel zu entfernen, wurde das Probenextrakt bei 13900 g für 10 min bei 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein HPLC-Vial überführt und 4 µL zur HPLC-ESI-MS/MS-Analytik eingesetzt.

13.7 Methodvalidierung

Die Methodvalidierung umfasste für die drei untersuchten Matrices (Hühnerplasma, Hühnerfaeces und Stallstaub) die Ermittlung folgender analytischer Parameter: Intra-Day Präzision, Inter-Day Präzision, Wiederfindung (Berechnung siehe 3.1), Linearität, Lagerungsstabilität, Matrixeffekte (Berechnung siehe 13.5.3), Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

13.7.1 Hühnerplasma

Für die Bestimmung der Intra- und Inter-Day Präzision wurden drei Konzentrationen (2, 40 und 2000 µg/L) mit jeweils sechs Replikaten verwendet. Die Inter-Day Präzision wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Der Linearitätsbereich wurde im Rahmen einer In-Matrix-Kalibrierung mit 10 Konzentrationen (0,08; 0,4; 2; 4; 20, 40, 200, 400, 1000 und 2000 µg/L) à drei Replikaten ermittelt. Die Linearität wurde zusätzlich durch eine Residuenanalyse überprüft. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde für jeden Analyten unter Verwendung der unten aufgeführten Formel separat ermittelt:

$$NWG = \frac{3.3 \times s_{Blank}}{s}$$

$$BG = \frac{10 \times s_{Blank}}{s}$$

s_{Blank} : Standardabweichung von sechs Leermatrix Blanks

s: Steigung der In-Matrix-Kalibrierung

Die rechnerisch ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde zudem verifiziert indem eine Plasmaprobe mit der entsprechenden Konzentration vor der Extraktion dotiert wurde. Damit der Analyt als nachgewiesen galt, durfte sich das Verhältnis der beiden Massenübergänge jedes Analyten nur in dem in Tab. 7.2 angegebenen Variationsbereich befinden (Kommission der Europäischen Gemeinschaften 2002).

Matrixeffekte wurden für gepooltes Plasma sowie für Hühnerplasma von drei verschiedenen Einzeltieren für drei Konzentrationen (2, 40 und 2000 µg/L) bestimmt. Die Lagerungsstabilität von Plasmaextrakten (400 µg/L) wurde an folgenden Zeitpunkten bestimmt: 0, 1, 3, 7, 21 und 28 Tage. Plasmaextrakte wurden bei - 20 °C und 4 °C gelagert.

13.7.2 Hühnerfaeces

Die Methodvalidierung der Flüssig-Flüssig-Extraktion von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces wurde wie in 13.7.1 beschrieben durchgeführt. Die drei gewählten Konzentrationen zur Bestimmung der Intra-Day und Inter-Day Präzision sowie der Matrixeffekte waren 2,5, 50 und 2500 µg/kg. Matrixeffekte wurden nur für gepoolte Faeces bestimmt. Der Linearitätsbereich wurde mit Hilfe einer In-Matrix-Kalibrierung mit neun Konzentration (0,5; 2,5; 5; 25; 50; 250; 500; 2500 und 5000 µg/kg) à drei Replikaten ermittelt. Zusätzlich wurde eine Residuenanalyse durchgeführt. Die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte wie in 12.8.1 beschrieben. Die Stabilität von Faecesextrakten unter Lagerung bei - 20 °C wurde nach 0, 24, 48, 96, 168 und 336 Stunden ermittelt.

13.7.3 Stallstaub

Es wurde eine reduzierte Methodvalidierung für die Flüssig-Flüssig-Extraktions-Methode zur Bestimmung von Fluorchinolonen in Stallstaub durchgeführt. Gründe hierfür sind zum einen die beschränkte Menge an Probenmaterial sowie Leermatrix und die niedrig zu erwartenden Konzentrationen in Stallstaubproben.

Für die Bestimmung der Intra- und Inter-Day Präzision wurden zwei Konzentrationen (50 und 1000 µg/kg) mit jeweils fünf Replikaten verwendet. Der Linearitätsbereich wurde durch eine In-Matrix-Kalibrierung mit sechs Konzentrationen (5, 10, 50, 100, 500 und 1000 µg/kg) à zwei Replikaten ermittelt. Zusätzlich wurde eine Residuenanalyse durchgeführt. Matrixeffekte wurden für zwei Konzentration bestimmt (50 und 1000 µg/kg). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden zum einen über das Signal zu Rauschverhältnis (NWG: S/N > 3

und BG: $S/N > 10$) sowie durch Ermittlung des Verhältnisses der beiden Massenübergänge für die niedrigste Konzentration der In-Matrix-Kalibrierung berechnet und verifiziert. Die Lagerungsstabilität wurde für zwei Konzentrationen (50 und 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) nach 0, 24, 48, 96, 168 und 336 Stunden unter Lagerung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ermittelt.

13.8 Tierstudien

Die Tierstudien wurden am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt. Der Versuchsplan umfasste insgesamt vier verschiedene Behandlungsszenarien mit unterschiedlichen Enrofloxacin-Konzentrationen. Hühner wurden zum einen mit der vom Hersteller empfohlenen Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht (KG) Enrofloxacin behandelt aber auch mit Verschleppungsdosen von 0,3; 1 und 3 mg/kg KG Enrofloxacin. Die Applikation der vom Hersteller empfohlenen Dosis erfolgte über das Tränkwasser. Hierzu wurde Enrofloxacin (orale Lösung Baytril 10 %, Bayer, Leverkusen, D) im Abstand von 24 Stunden neu angesetzt und das alte Tränkwasser ausgetauscht. Die Verabreichung der Verschleppungsdosen erfolgte über das Futter. Dazu wurde das Futter ebenfalls alle 24 Stunden neu mit Baytril 10 % versetzt. Die Temperatur des Versuchsraums wurde auf $18\text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt. Das Lichtregime betrug 14 Stunden.

13.8.1 Hühnerplasma

Für die Entnahme von Plasmaproben wurden die Versuchstiere in vier Gruppen mit jeweils 12 Tieren eingeteilt. Alle vier Gruppen wurden wie in 4.8 beschrieben über einen Zeitraum von 5 Tagen mit Enrofloxacin behandelt. Die Entnahme von Plasmaproben erfolgte an den Zeitpunkten: 0, 2, 4, 8, 24, 48, 50, 52, 56, 72, 96, 98, 100 und 104 Stunden. Pro Zeitpunkt wurden jeweils nur drei Tiere beprobt, um tierschutzrechtliche Anforderungen bezüglich der maximal erlaubten Blutabnahmemenge pro Woche einzuhalten.

13.8.2 Hühnerfaeces

Die Hühner wurden für diese Versuchsreihe entsprechend ihres Gewichtes in vier Gruppen mit jeweils drei Tieren eingeteilt. Für die Gruppe, die Enrofloxacin über das Futter verabreicht bekamen, konnte das Medikament pro Gruppe dosiert werden, da sie ähnliche Gewichte aufwiesen. Für die Versuchsgruppe, die über das Tränkwasser behandelt wurde, wurde Enrofloxacin für jedes Tier separat eingewogen. Die Medikation erfolgte über einen Zeitraum von 3 Tagen. Faecesproben wurden zu folgenden Zeitpunkten entnommen: 0, 2, 4, 6, 8, 26, 28, 30, 32, 48, 50, 52, 54, 56, 72, 80 und 96 Stunden. Für die Versuchsgruppe, die

mit der empfohlenen Dosis behandelt wurde, wurden zusätzlich nach 98, 100, 102 und 104 Stunden Faecesproben entnommen.

13.9 Methodenvergleich

Die in dieser Arbeit entwickelte Festphasenextraktionsmethode (Kombination aus Oasis MAX und Oasis MCX 13.6.1) zur Analytik von Fluorchinolonen in Hühnerplasma wurde mit einer am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover angewandten Flüssig-Flüssig-Extraktion mit anschließender HPLC-Fluoreszenzdetektion (FLD) verglichen. Als Vergleich dienten hierzu Plasmaproben, die wie in 13.8.1 beschrieben gewonnen wurden. Die Bestimmung der mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnenen Plasmaextrakte erfolgte mittels HPLC-FLD am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

HPLC-FLD

Das verwendete HPLC-System besteht aus einer Pumpe (Model 126, Beckman Coulter, Brea, USA), einem Autosampler (Model 508, Beckman Coulter, Brea, USA), einem Säulenofen (SPH 99, Spark, Emmen, NL) und einem Fluoreszenzdetektor (Model RF535, Shimadzu Kyoto, JP). Als Software wurde 32 Karat von Beckman Coulter (Brea, USA) verwendet. Die chromatographische Trennung erfolgte unter Verwendung einer LiChrospher 100 RP-18e 5 µm (LiChroCART 250-4) Säule von Merck (Darmstadt, D). Als Vorsäule wurde eine LiChrospher 100 RP-18e 5 µm (LiChroCART 4-4) von Merck (Darmstadt, D) eingesetzt.

Als isokratischer Eluent wurde 0,01 M Citratpuffer/Acetonitril (85:15, v:v) verwendet. Die Flussrate betrug 1,5 mL/min. Der Säulenofen wurde auf 40 °C temperiert. Zur Detektion wurde der Fluoreszenzdetektor auf eine Anregungswellenlänge von 280 nm eingestellt. Die Emissionswellenlänge betrug 450 nm.

Flüssig-Flüssig-Extraktion

Zur Extraktion wurden 300 µL Plasma mit 30 µL internem Standard (10 ng/mL Marbofloxacin) in einem 2 mL Reaktionsgefäß versetzt und kurz geschüttelt. Anschließend wurde 1 mL Dichlormethan hinzugefügt, 5 min geschüttelt und zentrifugiert (5 min, 23000 g). Danach wurden 850 µL der organischen Phase überführt und eingedampft. Die Wiederaufnahme der Analyten erfolgte in 300 µL 0,01 M Citratpuffer/Acetonitril (85:15, v:v). Als Injektionsvolumen wurden 100 µL eingesetzt.

Literaturverzeichnis

Al-Ahmad, A., Daschner, F.D., Kümmerer, K. (1999) Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37 (2): 158-163.

Annesley, T.M. (2003) Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 49 (7): 1041-1044.

Appelbaum, P.C., Hunter, P.A. (2000) The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16 (1): 5-15.

Ardrey, B. (2004) Liquid chromatography-mass spectrometry: An introduction. West Sussex, England: *John Wiley & Sons Ltd.*

Bailac, S., Ballesteros, O., Jimenez-Lozano, E., Barron, D., Sanz-Nebota, V., Navalon, A., Vilchez, J.L., Barbosa, J. (2004) Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A* 1029 (1-2): 145-151.

Bailac, S., Barron, D., Barbosa, J. (2006) New extraction procedure to improve the determination of quinolones in poultry muscle by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 580 (2): 163-169.

Ball, P. (2000) Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46 (1): 17-24.

Ballesteros, O., Toro, I., Sanz-Nebot, V., Navalon, A., Vilchez, J.L., Barbosa, J. (2003) Determination of fluoroquinolones in human urine by liquid chromatography coupled to pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 798 (1): 137-144.

Blondeau, J.M. (2004) Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology* 49 (Supplement 2): 73-78.

Bonfiglio, R., King, R.C., Olah, T.V., Merkle, K. (1999) The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 13 (12): 1175-1185.

Boxall, A.B., Johnson, P., Smith, E.J., Sinclair, C.J., Stutt, E., Levy, L.S. (2006) Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (6): 2288-2297.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2008) GERMAP 2008 Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch – Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland, Forschungsbericht, ISBN 978-3-00-025097-2.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2012) Erstmals Zahlen über die Antibiotika-Abgabe in der Tiermedizin erfasst, Pressemitteilung (http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/05_Tierarzneimittel/2012/2012_abgabemengenregister/2012_09_11_pi_abgabemengenregister.html?nn=1461380, letzter Zugriff 07.07.2013).

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2013) Zweite Datenerhebung zur Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin, Presseinformation (<http://www.mailing-power.de/11656/201311/veanop5tiwttts88feq2vgy3.pdf>, letzter Zugriff 10.12.2013)

Bundesverband für Tiergesundheit e. V. (2013) Tierarzneimittelmarkt 2012 in Deutschland, *Bft Spezial* 59.

Burgmann, M. (2007) Chinolone 2007 - Ein Update. *Antibiotika Monitor* 6: 79-90.

Burhenne, J., Ludwig, M., Spittler, M. (1999) Polar photodegradation products of quinolones determined by HPLC/MS/MS. *Chemosphere* 38 (6): 1279-1286.

Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R. (2003) Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environmental Science & Technology* 37 (7): 1241-1248.

Carlucci, G. (1998) Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 812 (1-2): 343-367.

Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D.M., Lu, Z., Mazzeo, J.R. (2007) Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B* 852 (1-2): 22-34.

Christian, T., Schneider, R.J., Färber, H.A., Skutlarek, D., Meyer, M.T., Goldbach, H.E. (2003) Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 31 (1): 36-44.

Christie, W.W., Moore, J.H. (1972) The lipid components of the plasma, liver and ovarian follicles in the domestic chicken (*Gallus gallus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 41 (2): 287-295.

Cinquina, A.L., Roberti, P., Giannetti, L., Longo, F., Draisci, R., Fagiolo, A., Brizioli, N.R. (2003) Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection: optimization and validation. *Journal of Chromatography A* 987 (1-2): 221-226.

Clemente, M., Hermo, M.P., Barrón, D., Barbosa, J. (2006) Confirmatory and quantitative analysis using experimental design for the extraction and liquid chromatography-UV, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry determination of quinolones in turkey muscle. *Journal of Chromatography A* 1135, 170-178.

Commission of the European Communities (1990) Council Regulation (EEC) No 2377/90 - Laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits for veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*, 224/1-224/8.

Ervik, A., Thorsen, B., Eriksen, V., Lunestad, B., Samuelsen, O. (1994) Impact of administering antibacterial agents on wild fish and blue mussels *Mytilus edulis* in the vicinity of fish farms. *Diseases of Aquatic Organisms* 18 (1): 45-51.

FEDESA (2001) Antibiotic use in farm animals does not threaten human health, Pressemitteilung (<http://www.simv.org/Communiqués/2001/Visby.pdf> letzter Zugriff 02.08.2013).

Food and Drug Administration (2001) Guidance for industry - Bioanalytical method validation. *U.S. Department of Health and Human Services*, online verfügbar (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> letzter Zugriff 10.12.2013).

Frey, H.-H., Löscher, W. (2002) Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Stuttgart, Deutschland, *Enke Verlag*, 3. Auflage.

Garcés, A., Zerzaňová, A., Kučera, R., Barrón, D., Barbosa, J. (2006) Determination of a series of quinolones in pig plasma using solid-phase extraction and liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection: application to pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography A* 1137 (1): 22-29.

Golet, E.M., Alder, A.C., Giger, W. (2002) Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt valley watershed, Switzerland. *Environmental Science & Technology* 36 (17): 3645-3651.

Golet, E.M., Strehler, A., Alder, A.C., Giger, W. (2002) Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry* 74 (21): 5455-5462.

González, C., Moreno, L., Small, J., Jones, D.G., Bruni, S.F.S. (2006) A liquid chromatographic method, with fluorometric detection, for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in plasma and endometrial tissue of mares. *Analytica Chimica Acta* 560 (1-2): 227-234.

Gootz, T.D., Brighty, K.E. (1996) Fluoroquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance, and clinical aspects. *Medicinal Research Reviews* 16 (5): 433-486.

Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., Gennaro, M.C. (2010) Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217 (25): 3929-3937.

- Grote, M., Meric, D.H., Langenkamper, G., Hayen, H., Betsche, T., Freitag, M.** (2009) Investigations for the transfer of pharmacological efficient substances from keeping of farm animals in leek and white cabbage. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 4 (3-4): 287-304.
- Guillarme, D., Ruta, J., Rudaz, S., Veuthey, J.-L.** (2010) New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: A critical comparison of existing approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (3): 1069-1082.
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Sczesny, S., Nau, H., Hartung, J.** (2003) Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: a new source of health hazard for farmers? *Environmental Health Perspective* 111 (13): 1590-1594.
- Hassouan, M.K., Ballesteros, O., Zafra, A., Vilchez, J.L., Navalon, A.** (2007.) Multiresidue method for simultaneous determination of quinolone antibacterials in pig kidney samples by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 859 (2): 282-288.
- Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V., Yndestad, M.** (1995) Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133 (3): 175-184.
- Hensel, A., Helmuth, R.** (2005) Aktuelles zur Antibiotikaresistenz: Das Problem aus veterinärmedizinischer Sicht, *Bundesinstitut für Risikobewertung*, online verfügbarer Vortrag (http://www.bfr.bund.de/cm/343/aktuelles_zur_antibiotikaresistenz_das_problemaus_veterinaermedizinischer_sicht.pdf, letzter Zugriff 26.07.2013).
- Hermo, M.P., Barron, D., Barbosa, J.** (2005) Determination of residues of quinolones in pig muscle comparative study of classical and microwave extraction techniques. *Analytica Chimica Acta* 539 (1-2): 77-82.
- Hermo, M. P., Nemutlu, E., Barbosa, J., Barron, D.** (2011) Multiresidue determination of quinolones regulated by the European Union in bovine and porcine plasma. Application of chromatographic and capillary electrophoretic methodologies. *Biomedical Chromatography* 25 (5): 559-569.
- Hernandez, M., Aguilar, C., Borrull, F., Calull, M.** (2002) Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B* 772 (1): 163-172.
- Holm, J.V., Ruegge, K., Bjerg, P.L., Christensen, T.H.** (1995) Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environmental Science & Technology* 29 (5): 1415-1420.
- Hoof, N.V., Wasch, K.D., Okerman, L., Reybroeck, W., Poelmans, S., Noppe, H., Brabander, H.D.** (2005) Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. *Analytica Chimica Acta* 529 (1-2): 265-272.

- Horie, M., Saito, K., Nose, N., Nakazawa, H.** (1994) Simultaneous determination of benfloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 653 (1): 69-76.
- Hu, X., Luo, Y., Zhou, Q.** (2010) Simultaneous analysis of selected typical antibiotics in manure by microwave-assisted extraction and LC-MS. *Chromatographia* 71 (3): 217-223.
- Hunter, R.P., Koch, D.E., Coke, R.L., Carpenter, J.W., Isaza, R.** (2007) Identification and comparison of marbofloxacin metabolites from the plasma of ball pythons (*Python regius*) and blue and gold macaws (*Ara ararauna*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 30 (3): 257-262.
- Ismaiel, O.A., Halquist, M. S., Elmamly, M. Y., Shalaby, A., Karnes, H. T.** (2008) Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations. *Journal of Chromatography B* 876 (2): 333-343
- Jimenez-Lozano, E., Roy, D., Barron, D., Barbosa, J.** (2004) Effective sorbents for solid-phase extraction in the analysis of quinolones in animal tissues by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 25 (1): 65-73.
- Karci, A., Balcioglu, I.A.** (2009) Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science of the Total Environment* 407 (16): 4652-4664.
- Käsbohrer, A.** (2012) Resistenzmonitoring in der Veterinärmedizin. *Bundesinstitut für Risikobewertung*, Fachgruppe Epidemiologie und Zoonosen, Nationales Referenzlaboratorium für Antibiotikaresistenz, online verfügbarer Vortrag (http://www.lgl.bayern.de/aus_fort_weiterbildung/veranstaltungen/kongresse_veranstaltungen/doc/symposium_antibiotikaresistenz_kaesbohrer.pdf, letzter Zugriff 26.07.2013).
- Kemper, N.** (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* 8 (1): 1-13.
- Kietzmann, M., Markus, W., Chavez, J., Bollwahn, W.** (1995) Drug residues in unmedicated pigs. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 102 (11): 441-442.
- Kommission der Europäischen Gemeinschaften** (2002) 2002/657/EG: Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* 221: 8-36.
- Kumar, K., Gupta, S.C., Baidoo, S.K., Chander, Y., Rosen, C.J.** (2005) Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality* 34 (6): 2082-2085.
- Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V.** (2000) Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40 (7): 701-710.

- Küng, K., Riond, J.L., Wanner, M.** (1993) Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 16 (4): 462-468.
- Lahaie, M., Mess, J.N., Furtado, M., Garofolo, F.** (2010) Elimination of LC-MS/MS matrix effect due to phospholipids using specific solid-phase extraction elution conditions. *Bioanalysis* 2 (6): 1011-1021.
- Le Bizec, B., Pinel, G., Antignac, J.P.** (2009) Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (46): 8016-8034.
- Lillenberg M., L.S.V., Nei L., Roasto M., Sepp K.** (2010) Enrofloxacin and ciprofloxacin uptake by plants from soil. *Agronomy Research* 8 (1): 807-814.
- Little, J.L., Wempe, M.F., Buchanan, C.M.** (2006) Liquid chromatography mass spectrometry mass spectrometry method development for drug metabolism studies: examining lipid matrix ionization effects in plasma. *Journal of Chromatography B* 833 (2): 219-230.
- Lode, H., Hoffken, G., Boeckk, M., Deppermann, N., Borner, K., Koeppe, P.** (1990) Quinolone pharmacokinetics and metabolism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 26 (Supplement B): 41-49.
- Löscher, W., Ungemach, F.R., Kroker, R.** (2006) Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Stuttgart, Deutschland, *Enke Verlag*, 8. Auflage.
- Lykkeberg, A.K.** (2006) Identifikation og bakterielle effekter af antibiotikametabolitter. Dissertation, Institut für Pharmazie, Universität Kopenhagen, Dänemark, online verfügbares Abstract (<http://www.farma.ku.dk/index.php/Anne-Kongsbak-Kruse-Lykkeberg/3059/0/>, letzter Zugriff 26.07.2013).
- Manceau, J., Gicquel, M., Laurentie, M., Sanders, P.** (1999) Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high-performance liquid chromatography: Application in pharmacokinetic studies in pig and rabbit. *Journal of Chromatography B* 726 (1-2): 175-184.
- Marengo, J., Kok, R., Burrows, L., Velagaleti, R., Stamm, J.** (2001) Biodegradation of C-14-sarafloxacin hydrochloride, a fluoroquinolone antimicrobial by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Scientific and Industrial Research* 60 (2): 121-130.
- Marengo, J.R., Kok, R.A., O'Brien, K., Velagaleti, R.R., Stamm, J.M.** (1997) Aerobic biodegradation of (14C)-sarafloxacin hydrochloride in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (3): 462-471.
- Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., Gans, O.** (2007) Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148 (2): 570-579.

- Martinez, M., McDermott, P., Walker, R.** (2006) Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal* 172 (1): 10-28.
- Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M.** (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 75 (13): 3019-3030.
- Mevius, D.J., Breukink, H.J., van Miert, A.S.J.P.A.M.** (1990) In vitro activity of flumequine in comparison with several other antimicrobial agents against five pathogens isolated in calves in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* 12 (4): 212-220.
- Migliore, L., Cozzolino, S., Fiori, M.** (2003.) Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* 52 (7): 1233-1244.
- Mills, G.B., Moolenaar, W.H.** (2003) The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nature Reviews Cancer* 3 (8): 582-591.
- Mokrushina, G.A., Charushin, V.N., Chupakhin, O.N.** (1995) Relationship between structure and antibacterial activity in the fluoroquinolone series of compounds. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 29 (9): 590-606.
- Montforts, M.H.M.M.** (2005) The trigger values in the environmental risk assessment for (veterinary) medicines in the European Union: a critical appraisal., *National Institute for Public Health and the Environment*, Expert Center for Substances, Bilthoven, Niederlande, online verfügbarer Forschungsbericht (RIVM report 601500002/2005: <http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/7379/1/601500002.pdf>, letzter Zugriff 30.07.2013).
- Moolenaar, W.H., van Meeteren, L.A., Giepmans, B.N.G.** (2004) The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays* 26 (8): 870-881.
- Nakata, H., Kannan, K., Jones, P.D., Giesy, J.P.** (2005) Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography-mass spectrometry and fluorescence detection. *Chemosphere* 58 (6): 759-766.
- Pang, L.Q., Liang, Q.L., Wang, Y.M., Ping, L., Luo, G.A.** (2008) Simultaneous determination and quantification of seven major phospholipid classes in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry and the application in diabetes nephropathy. *Journal of Chromatography B* 869 (1-2): 118-125.
- Panseri, S., D'Imporzano, G., Pognani, M., Cavalli, M., Chiesa, L., Adani, F.** (2013) Effect of veterinary antibiotics on biogas and bio-methane production. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85: 205-209.
- Parshikov, I.A., Freeman, J.P., Lay, J.O., Beger, R.D., Williams, A.J., Sutherland, J.B.** (1999) Regioselective transformation of ciprofloxacin to N-acetylciprofloxacin by the fungus *Mucor ramannianus*. *FEMS microbiology letters* 177 (1): 131-135.

- Pena, A., Chmielova, D., Lino, C.M., Solich, P.** (2007) Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column. *Journal of Separation Science* 30 (17): 2924-2928.
- Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.** (2009) Resistenzdaten der Arbeitsgemeinschaft „Empfindlichkeitsprüfungen und Resistenz“. <http://www.p-e-g.org/resistenz/database/index.php> (letzter Zugriff 26.07.2013).
- Peng, X., Tan, J., Tang, C., Yu, Y., Wang, Z.** (2008) Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (1): 73-79.
- Phenomenex** (2010) Strata-X outperforms Oasis HLB. Produktbroschüre (<https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/fc8d5713-fc4e-4890-afa6-f41f640320d0.pdf>, letzter Zugriff 30.07.2013).
- Pierini, E., Famiglini, G., Mangani, F., Cappiello, A.** (2004) Fate of enrofloxacin in swine sewage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (11): 3473-3477.
- Pozo, O.J., Guerrero, C., Sancho, J.V., Ibáñez, M., Pitarch, E., Hogendoorn, E., Hernández, F.** (2006) Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1103 (1): 83-93.
- Prescott, J.F., Yielding, K.M.** (1990) In vitro susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. *Canadian Journal of Veterinary Research* 54: 195-197.
- Pulfer, M., Murphy, R.C.** (2003) Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews* 22 (5): 332-364.
- Samanidou, V.F., Christodoulou, E.A., Papadoyannis, I.N.** (2005) Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. *Journal of Separation Science* 28 (6): 555-565.
- Samuelson, O.B., Lunestad, B.T., Ervik, A., Fjelde, S.** (1994) Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture* 126 (3-4): 283-290.
- Sasagawa, T., Suzuki, K., Shiota, T., Kondo, T., Okita, M.** (1998) The significance of plasma lysophospholipids in patients with renal failure on hemodialysis. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 44 (6): 809-818.
- Scherz, G.** (2013) Verschleppung subtherapeutischer antibakterieller Konzentrationen von Enrofloxacin und ihr Einfluss auf die Resistenzentwicklung kommensaler Escherichia coli im Darm beim Huhn. Dissertation, Stiftung *Tierärztliche Hochschule Hannover*.

- Scholar, E.M.** (2003) Fluoroquinolones: Past, present and future of a novel group of antibacterial agents. *American Journal of Pharmaceutical Education* 66, 10.
- Scholl, H., Schmidt, K., Weber, B.** (1987) Sensitive and selective determination of picogram amounts of ciprofloxacin and its metabolites in biological samples using high-performance liquid chromatography and photothermal post-column derivatization. *Journal of Chromatography B* 416: 321-330.
- Schröder, H.** (2010) Antibiotika: Solange sie noch wirken... – Aktuelle Verordnungsanalysen – *Wissenschaftliches Institut der AOK*, online verfügbarer Vortrag (http://www.wido.de/fileadmin/wido/downloads/pdf_arzneimittel/wido_arz_antib_praes_091_0.pdf, letzter Zugriff 30.07.2013).
- Senta, I., Terzić, S., Ahel, M.** (2008) Simultaneous determination of sulfonamides, fluoroquinolones, macrolides and trimethoprim in wastewater and river water by LC-Tandem-MS. *Chromatographia* 68 (9-10): 747-758.
- Shi, L., Zhou, X., Zhang, Y., Gu, G.** (2009) Simultaneous determination of 8 fluoroquinolone antibiotics in sewage treatment plants by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Water Science and Technology* 59 (4): 805-813.
- Siegmann, O.** (2005) Kompendium der Geflügelkrankheiten. Hannover, Deutschland, *Schlütersche Verlagsgesellschaft*, 7. Auflage.
- Sigal, Y.J., McDermott, M.I., Morris, A.J.** (2005) Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochemical Journal* 387 (Part 2): 281.
- Sörgel, F., Kinzig, M.** (1993) Pharmacokinetics of gyrase inhibitors, Part 2: Renal and hepatic elimination pathways and drug interactions. *The American Journal of Medicine* 94 (3A): 56.
- Sturini, M., Speltini, A., Pretali, L., Fasani, E., Profumo, A.** (2009) Solid-phase extraction and HPLC determination of fluoroquinolones in surface waters. *Journal of Separation Science* 32 (17): 3020-3028.
- Sukul, P., Spiteller, M.** (2007) Fluoroquinolone antibiotics in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 191: 131-162.
- Sutphen, R., Xu, Y., Wilbanks, G.D., Fiorica, J., Grendys, E.C., LaPolla, J.P., Arango, H., Hoffman, M.S., Martino, M., Wakeley, K.** (2004) Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 13 (7): 1185-1191.
- Thiele-Bruhn, S.** (2003) Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166 (2): 145-167.
- Tolls, J.** (2001) Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environmental Science & Technology* 35 (17): 3397-3406.

Turiel, E., Martín-Esteban, A., Tadeo, J.L. (2006) Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. *Analytica Chimica Acta* 562 (1): 30-35.

Tyczkowska, K., Hedeem, K.M., Aucoin, D.P., Aronson, A.L. (1989) High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in canine serum and prostatic tissue. *Journal of Chromatography* 493 (2): 337-346.

Uran, S., Larsen, A., Jacobsen, P.B., Skotland, T. (2001) Analysis of phospholipid species in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 758 (2): 265-275.

Vázquez, M.M.P., Vázquez, P.P., Galera, M.M., García, M.D.G. (2012) Determination of eight fluoroquinolones in groundwater samples with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction prior to high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 748: 20-27.

Vieno, N.M., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2006) Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 1134 (1-2): 101-111.

Wallmann, J., Preuss, J., Bender, A. (2012) Erfassung von Antibiotika-Abgabemengen gemäß DIMDI-AMV, *Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, Biologische Untersuchungen und Antibiotikaresistenz, online verfügbarer Vortrag (http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Bundesamt/Veranstaltungen/Infotag_vortrag_wallmann.pdf?__blob=publicationFile&v=2, letzter Zugriff 25.07.2013)

Walter, A., Korth, U., Hilgert, M., Hartmann, J., Weichel, O., Hilgert, M., Fassbender, K., Schmitt, A., Klein, J. (2004) Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiology of Aging* 25 (10): 1299-1303.

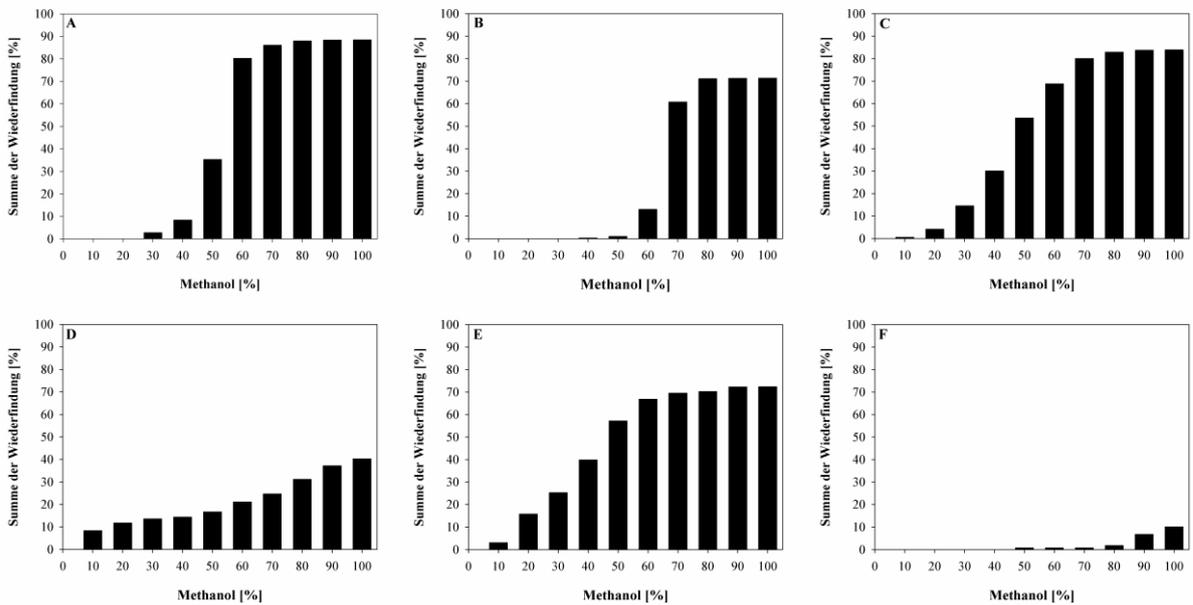
Waters (2011) A universal approach to a complex analytical challenge. Produktbroschüre (<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/lcSP.pdf>, letzter Zugriff 30.07.2013).

Wegener, H., Aarestrup, F., Jensen, L., Hammerum, A., Bager, R. (1998) The association between the use of antimicrobial growth promoters and development of resistance in pathogenic bacteria towards growth promoting and therapeutic antimicrobials. *Journal of Animal and Feed Sciences* 7 (Supplement 1): 7-14.

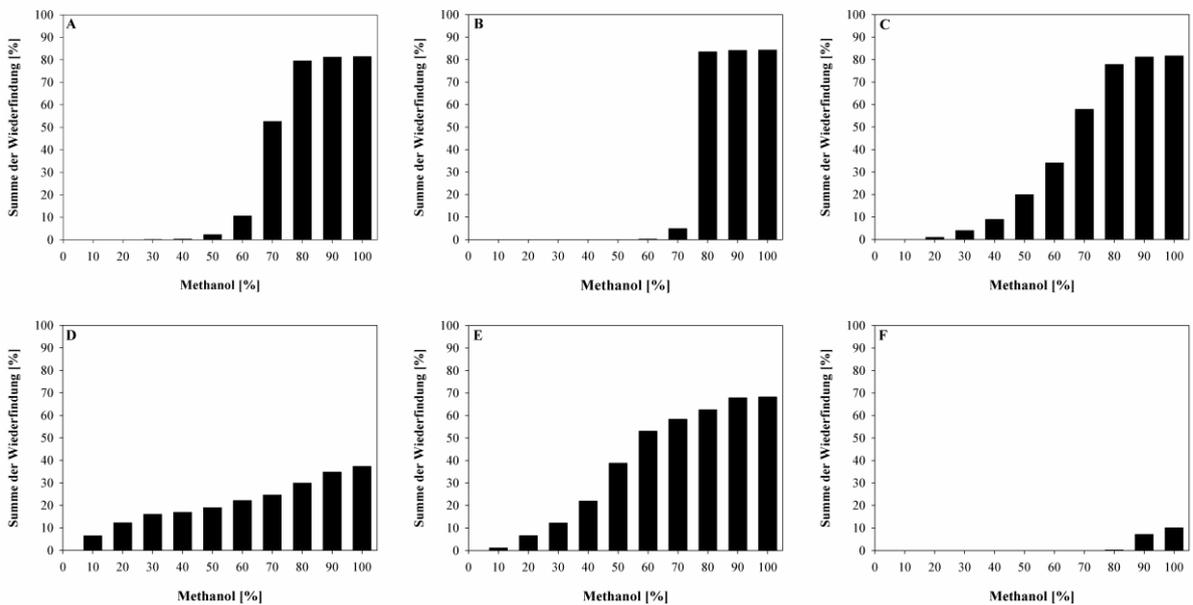
Wetzstein, H.-G., Schmeer, N., Karl, W. (1997) Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*: identification of metabolites. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (11): 4272-4281.

- Wetzstein, H.-G., Stadler, M., Tichy, H.-V., Dalhoff, A., Karl, W.** (1999) Degradation of ciprofloxacin by basidiomycetes and identification of metabolites generated by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (4): 1556-1563.
- Wetzstein, H., Schneider, J., Karl, W.** (2006) Patterns of metabolites produced from the fluoroquinolone enrofloxacin by basidiomycetes indigenous to agricultural sites. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71 (1): 90-100.
- Wiedemann, B., Heisig, P.** (2001) Wirkungs- und Resistenzmechanismen der Chinolone: Actio und Reactio. *Pharmazie in unserer Zeit* 30 (5): 382-393.
- Wright, D.H., Brown, G.H., Peterson, M.L., Rotschafer, J.C.** (2000) Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46 (5): 669-683.
- Wu, S.T., Schoener, D., Jemal, M.** (2008) Plasma phospholipids implicated in the matrix effect observed in liquid chromatography/tandem mass spectrometry bioanalysis: evaluation of the use of colloidal silica in combination with divalent or trivalent cations for the selective removal of phospholipids from plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (18): 2873-2881.
- Xia, Y.Q., Jemal, M.** (2009) Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (14): 2125-2138.
- Yorke, J.C., Froc, P.** (2000) Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 882 (1-2): 63-77.
- Zemski Berry, K.A., Murphy, R.C.** (2004) Electrospray ionization tandem mass spectrometry of glycerophosphoethanolamine plasmalogen phospholipids. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 15 (10): 1499-1508.
- Zhao, L., Dong, Y.H., Wang, H.** (2010) Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of the Total Environment* 408 (5): 1069-1075.
- Zhou, X., Chen, C., Yue, L., Sun, Y., Ding, H., Liu, Y.** (2008) Excretion of enrofloxacin in pigs and its effect on ecological environment. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26 (3): 272-277.

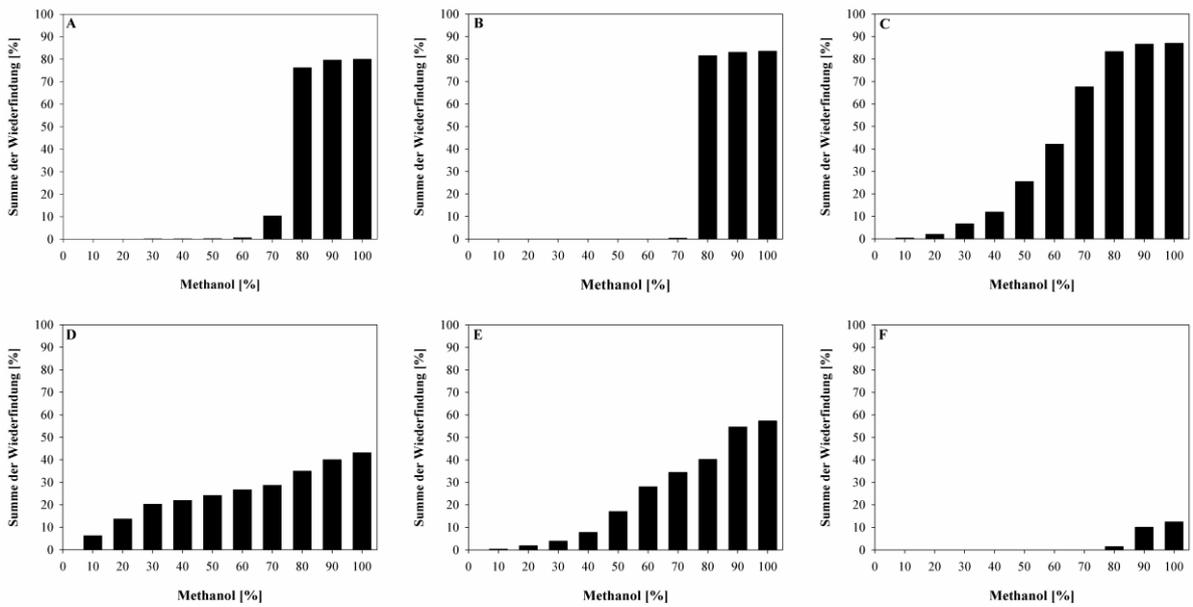
Anhang



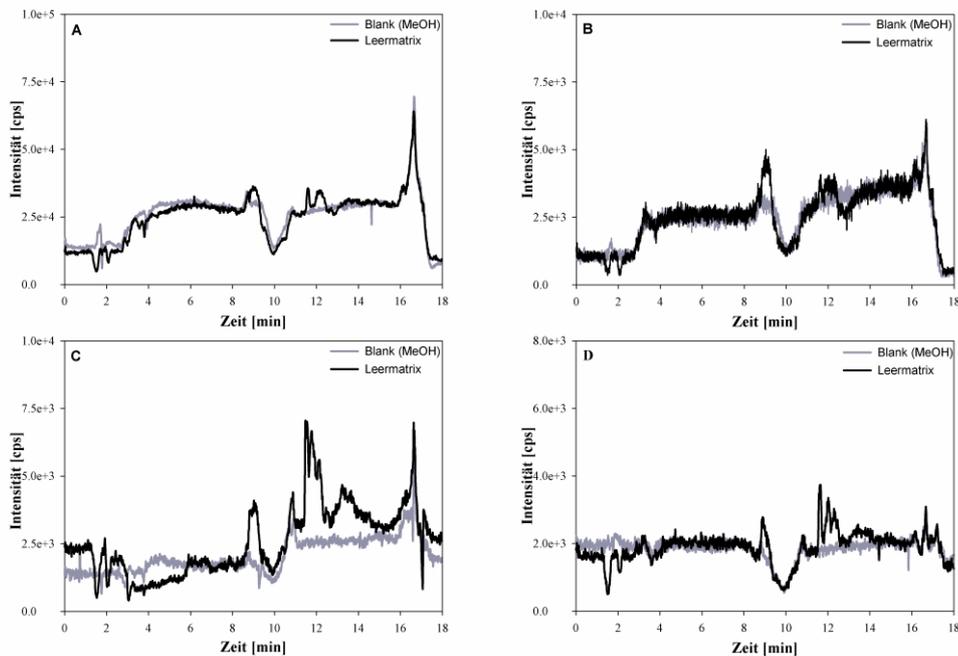
Anhang 1: Sequentielle Elution für Marbofloxacin für die SPE Säulen Oasis HLB (A), Strata X (B), HyperSep Retain PEP (C), Easy (D), HR-XA (E) und SDB (F).



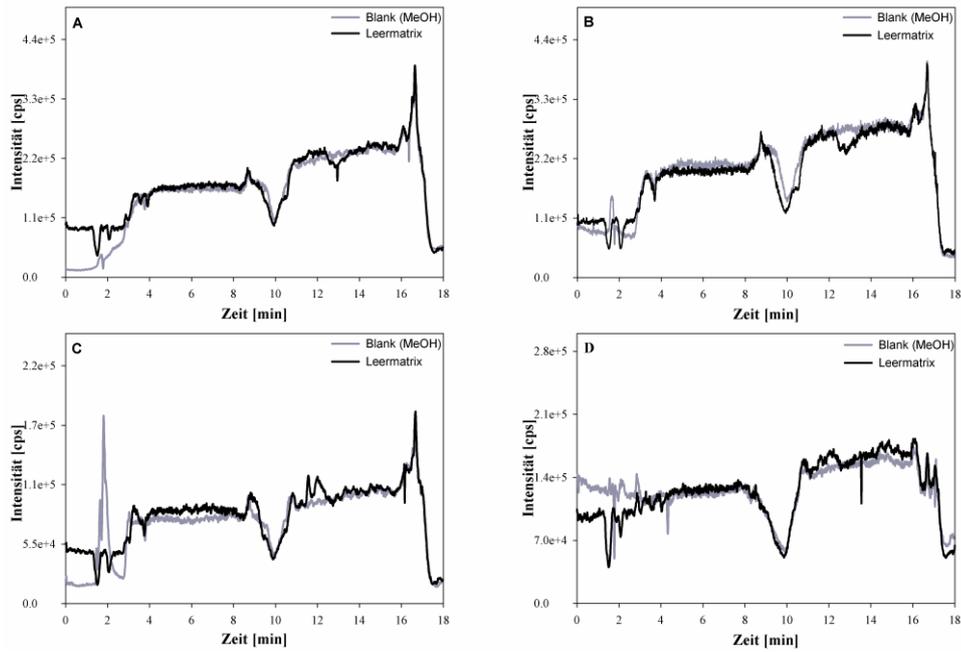
Anhang 2: Sequentielle Elution für Enrofloxacin für die SPE Säulen Oasis HLB (A), Strata X (B), HyperSep Retain PEP (C), Easy (D), HR-XA (E) und SDB (F).



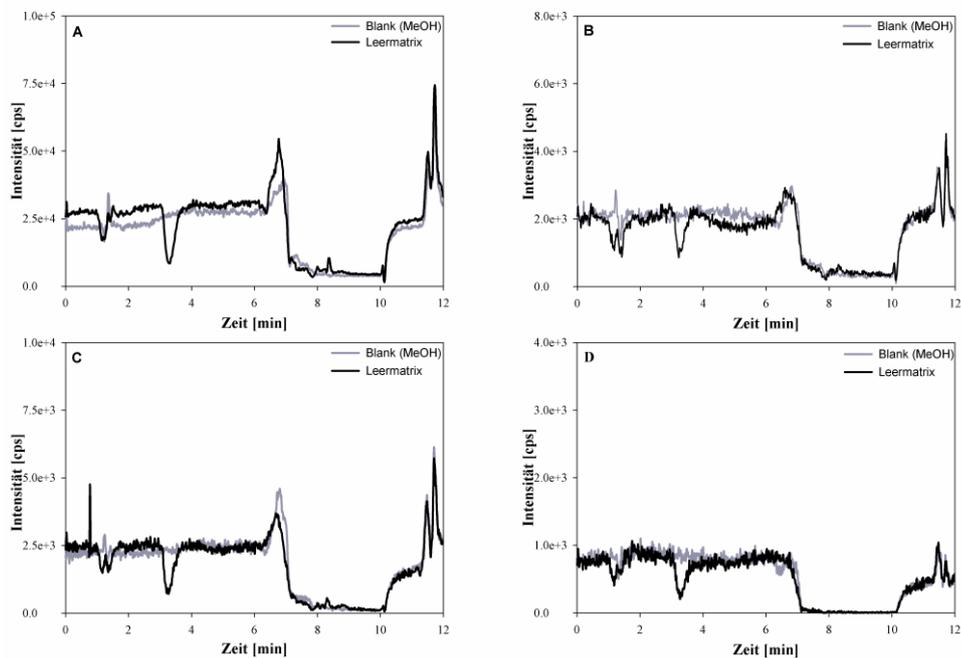
Anhang 3: Sequentielle Elution für Difloxacin für die SPE Säulen Oasis HLB (A), Strata X (B), HyperSep Retain PEP (C), Easy (D), HR-XA (E) und SDB (F).



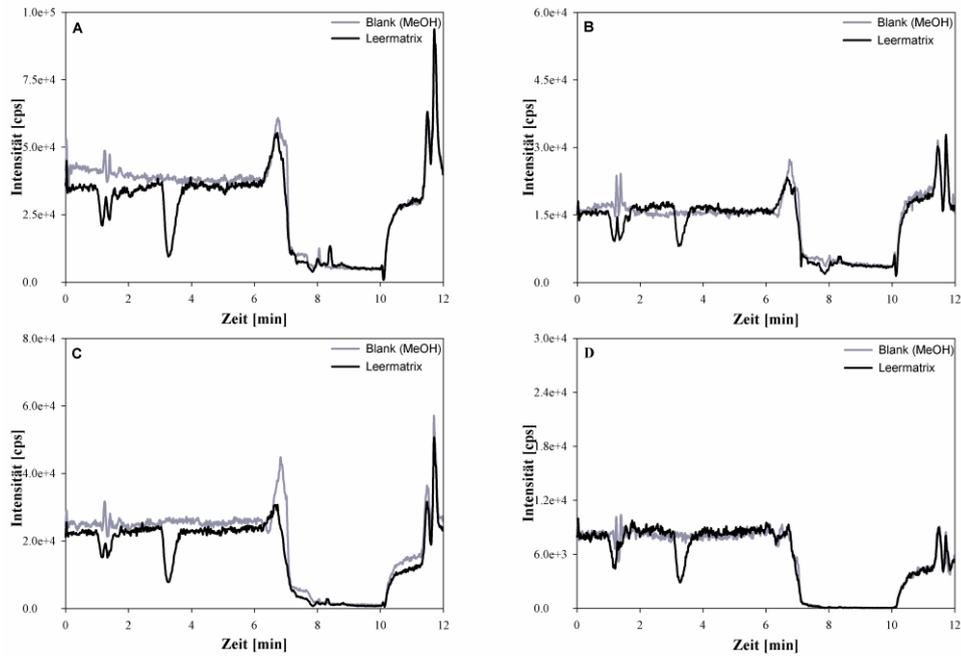
Anhang 4: Post-column-Infusionsprofile einer infundierten Analytkonzentration von 0,1 ng/μL für Marbofloxacin (A), Ciprofloxacin (B), Enrofloxacin (C) und Difloxacin (D) bei Injektion einer mittels Strata X aufgearbeiteten Leermatrixprobe unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.



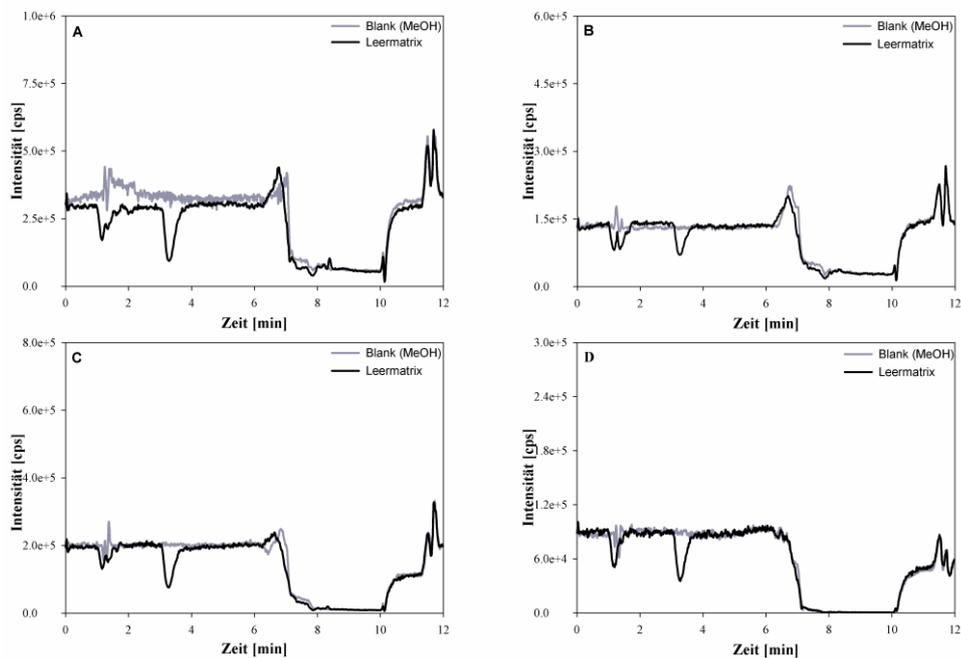
Anhang 5: Post-column-Infusionsprofile einer infundierten Analytkonzentration von 10 ng/μL für Marbofloxacin (A), Ciprofloxacin (B), Enrofloxacin (C) und Difloxacin (D) bei Injektion einer mittels Strata X aufgearbeiteten Leermatrixprobe unter Verwendung des ursprünglichen Gradienten.



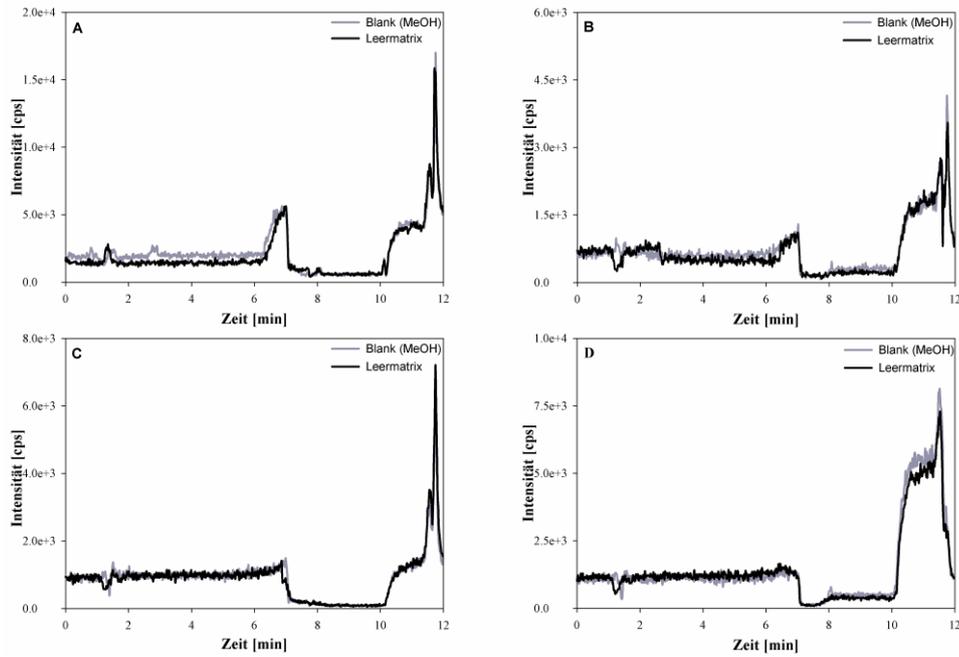
Anhang 6: Post-column-Infusionsprofile einer infundierten Analytkonzentration von 0,1 ng/μL für Marbofloxacin (A), Ciprofloxacin (B), Enrofloxacin (C) und Difloxacin (D) bei Injektion einer mittels Strata X aufgearbeiteten Leermatrixprobe unter Verwendung des modifizierten Gradienten.



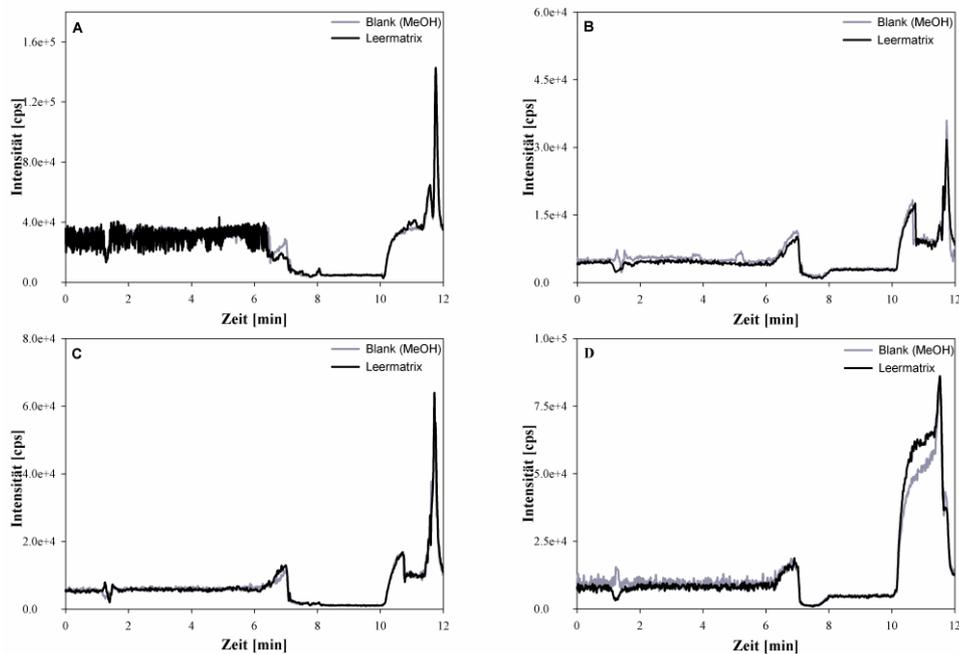
Anhang 7: Post-column-Infusionsprofile einer infundierten Analytkonzentration von 1 ng/μL für Marbofloxacin (A), Ciprofloxacin (B), Enrofloxacin (C) und Difloxacin (D) bei Injektion einer mittels Strata X aufgearbeiteten Leermatrixprobe unter Verwendung des modifizierten Gradienten.



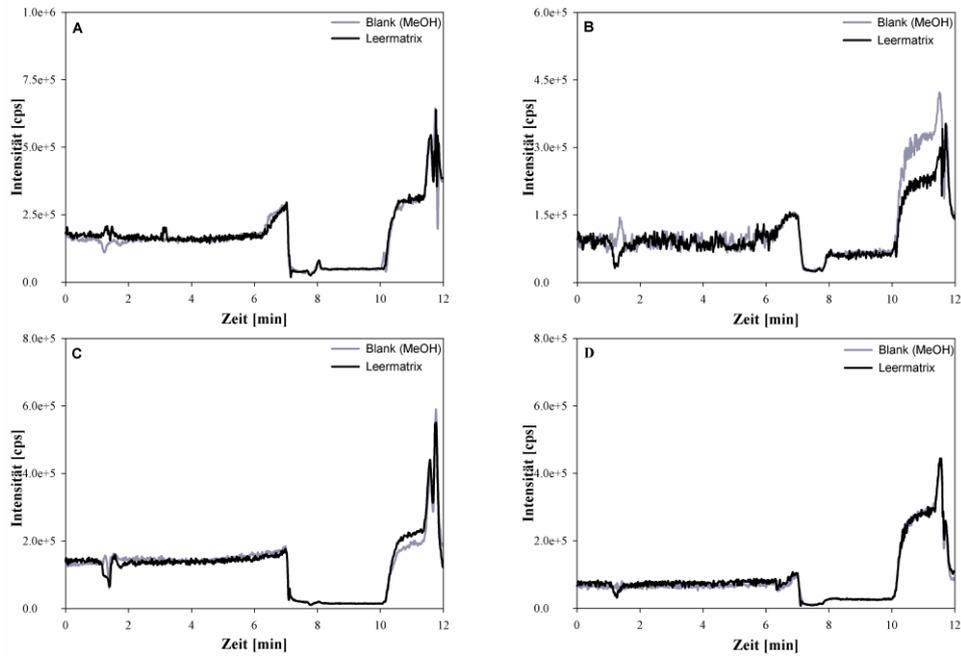
Anhang 8: Post-column-Infusionsprofile einer infundierten Analytkonzentration von 10 ng/μL für Marbofloxacin (A), Ciprofloxacin (B), Enrofloxacin (C) und Difloxacin (D) bei Injektion einer mittels Strata X aufgearbeiteten Leermatrixprobe unter Verwendung des modifizierten Gradienten.



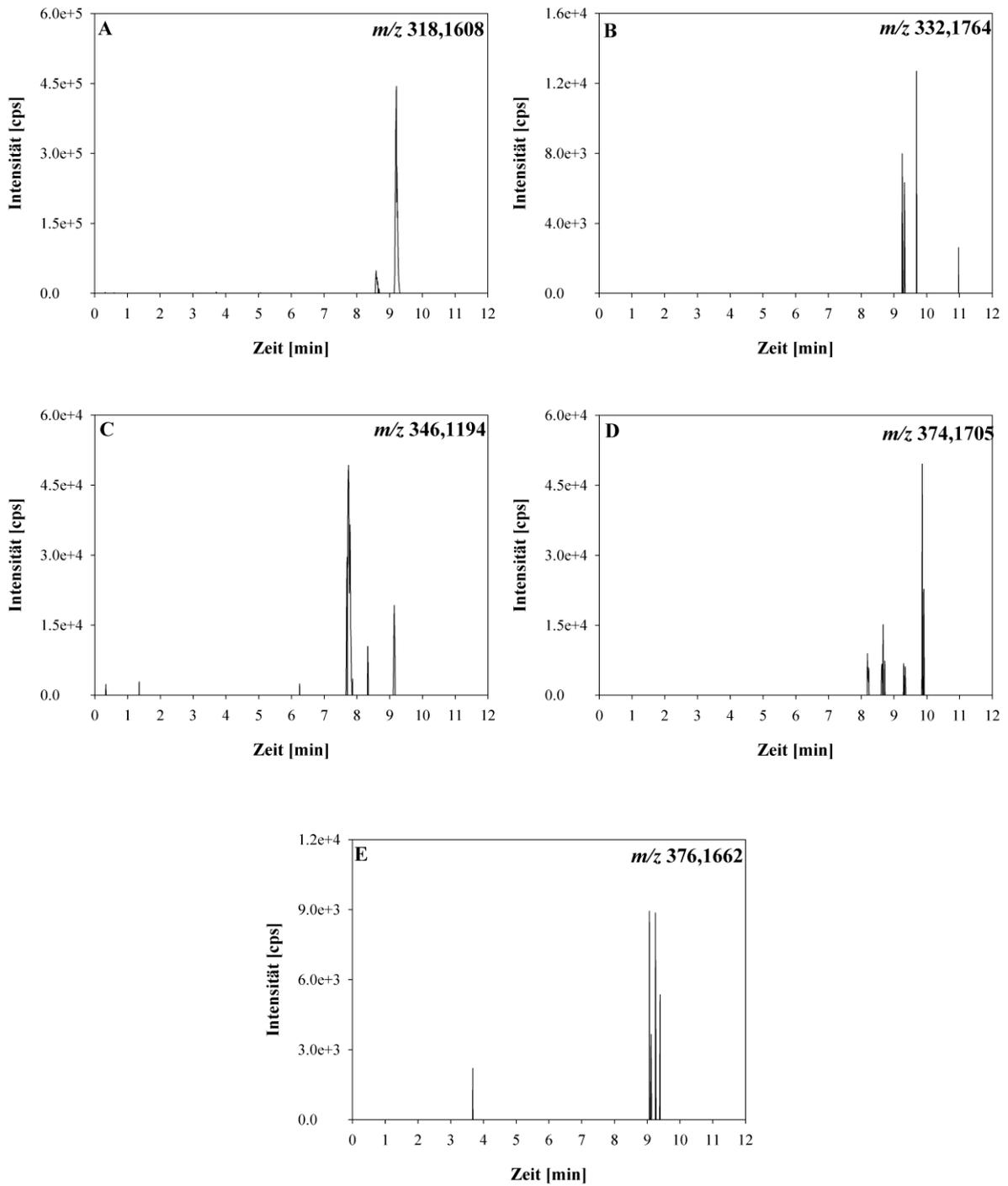
Anhang 9: Post-column-Infusionsprofile einer infundierten Analytkonzentration von 0,1 ng/μL für Marbofloxacin (A), Ciprofloxacin (B), Enrofloxacin (C) und Difloxacin (D) bei Injektion einer mittels Kombination aus Oasis MAX/Oasis MCX aufgearbeiteten Leermatrixprobe unter Verwendung des modifizierten Gradienten.



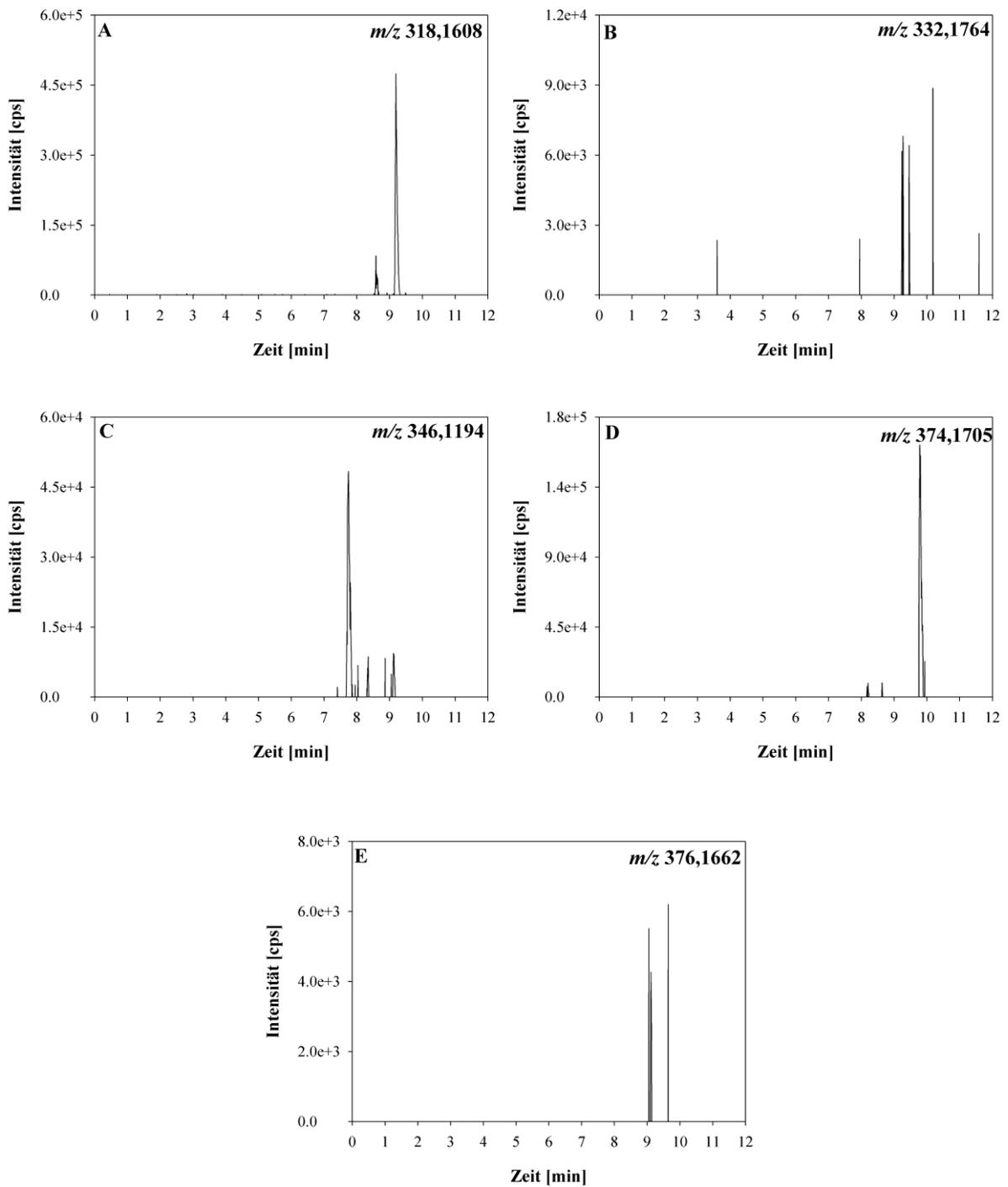
Anhang 10: Post-column-Infusionsprofile einer infundierten Analytkonzentration von 1 ng/μL für Marbofloxacin (A), Ciprofloxacin (B), Enrofloxacin (C) und Difloxacin (D) bei Injektion einer mittels Kombination aus Oasis MAX/Oasis MCX aufgearbeiteten Leermatrixprobe unter Verwendung des modifizierten Gradienten.



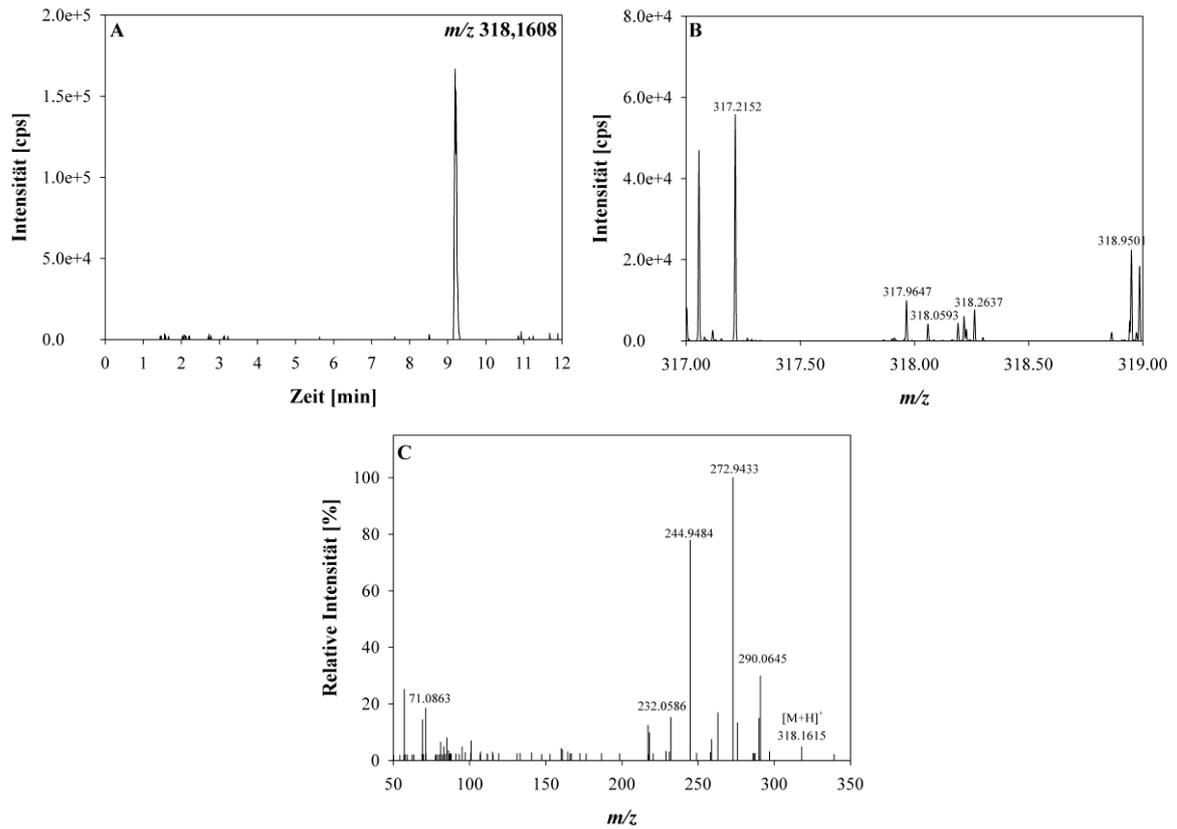
Anhang 11: Post-column-Infusionsprofile einer infundierten Analytkonzentration von 10 ng/ μ L für Marbofloxacin (A), Ciprofloxacin (B), Enrofloxacin (C) und Difloxacin (D) bei Injektion einer mittels Kombination aus Oasis MAX/Oasis MCX aufgearbeiteten Leermatrixprobe unter Verwendung des modifizierten Gradienten.



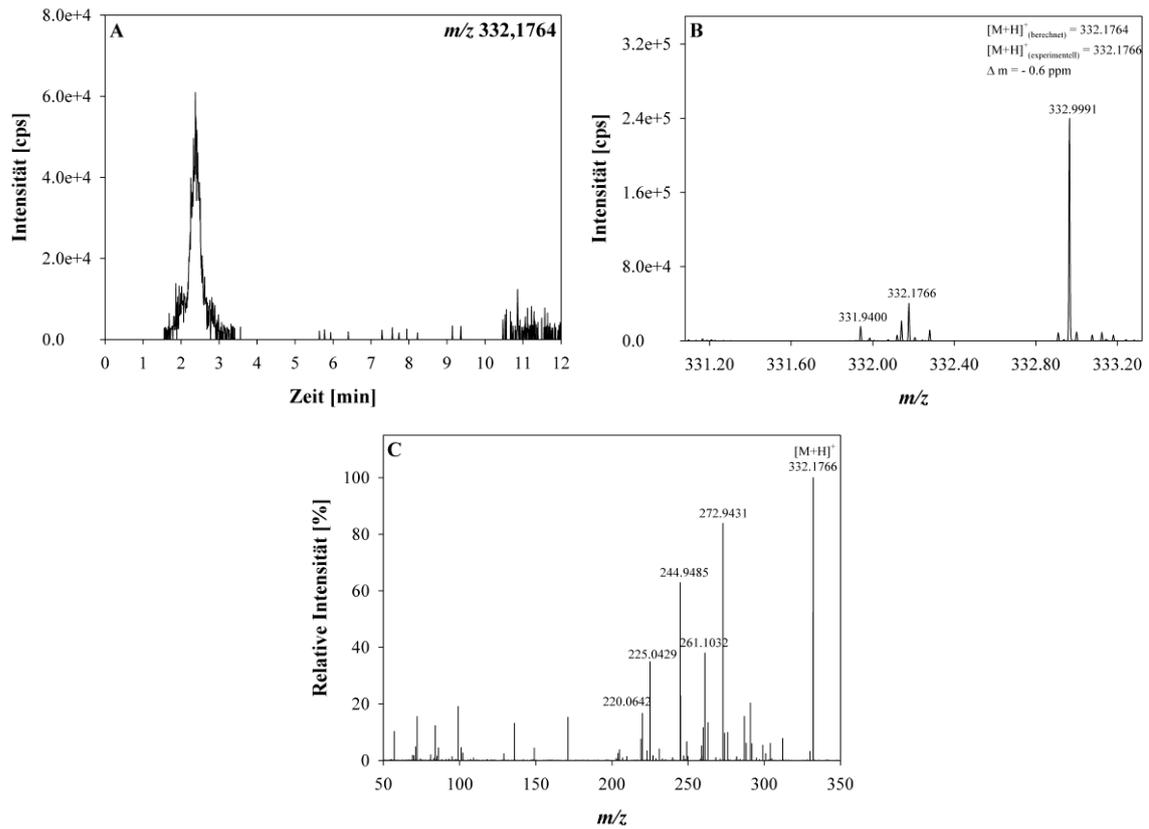
Anhang 12: Extracted Ion Chromatogramme einer extrahierten Leermatrixprobe (Hühnerfaeces) für die möglichen Metaboliten m/z 318,1608 \pm 0,0050 (A), m/z 332,1764 \pm 0,0050 (B), m/z 346,1194 \pm 0,0050 (C), m/z 374,1705 \pm 0,0050 (D) sowie m/z 376,1662 \pm 0,0050 (E).



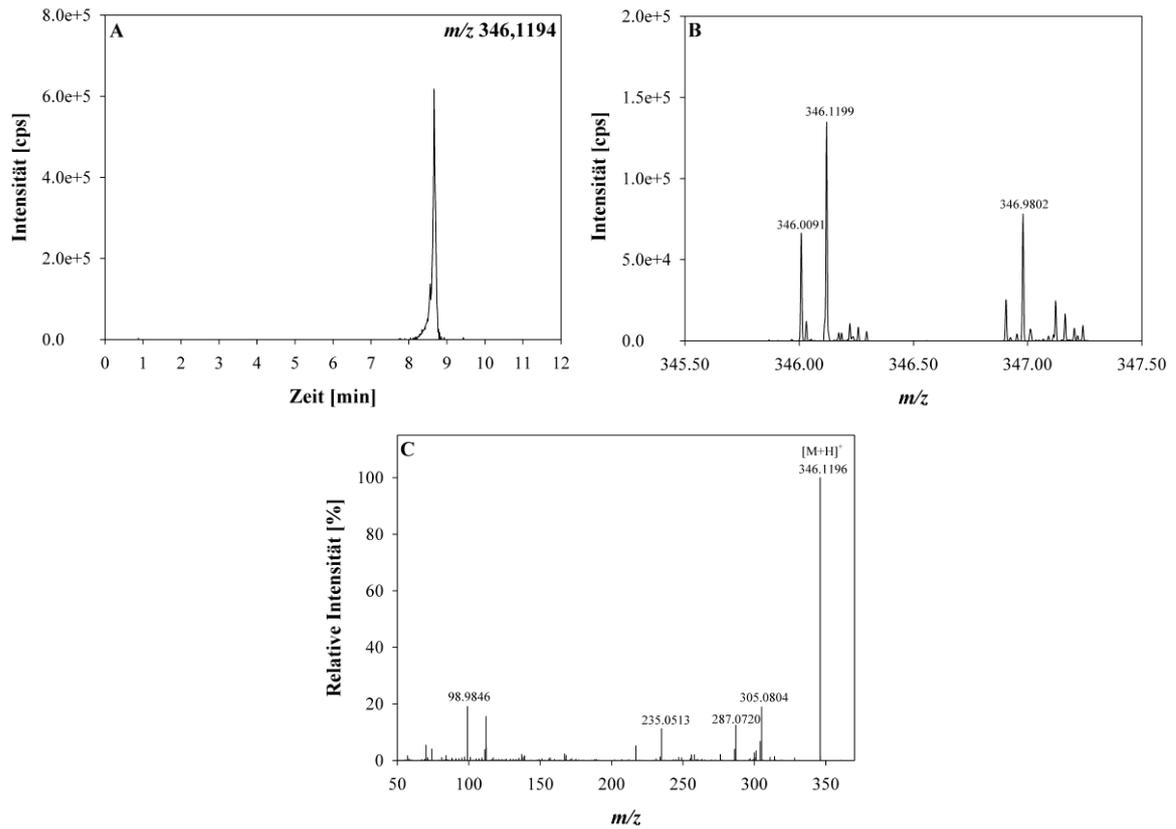
Anhang 13: Extracted Ion Chromatogramme eines Matrix Standards (mit 1 ng/ μ L Enrofloxacin und Ciprofloxacin dotierte Leermatrixprobe) für die möglichen Metaboliten m/z 318,1608 \pm 0,0050 (A), m/z 332,1764 \pm 0,0050 (B), m/z 346,1194 \pm 0,0050 (C), m/z 374,1705 \pm 0,0050 (D) sowie m/z 376,1662 \pm 0,0050 (E).



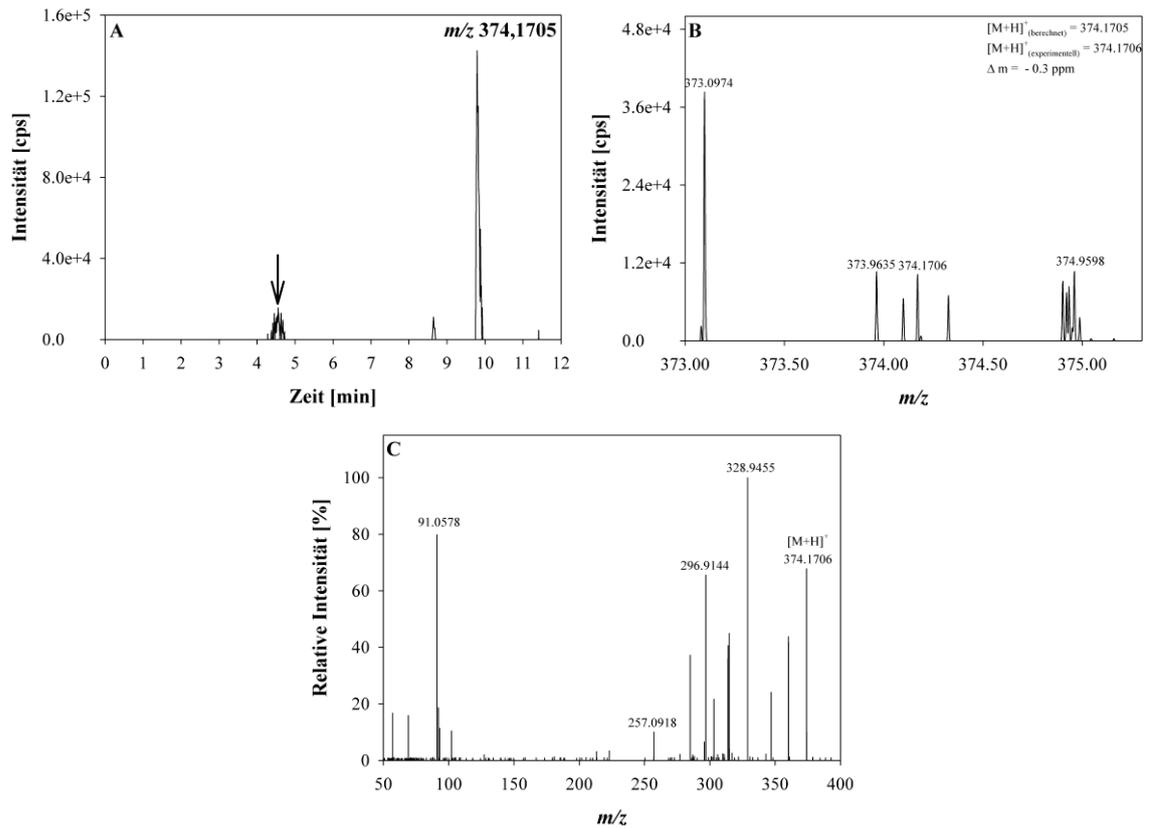
Anhang 14: Extracted Ion Chromatogramm m/z 318,1608 \pm 0,0032 (A), Massenspektrum m/z 318,1608 \pm 1 amu (B) sowie Fragmentierungsspektrum zwischen 2,25 und 2,90 min (C) für den möglichen Metaboliten m/z 318,1608 (gemessene Probe: Huhn 1, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 52 h).



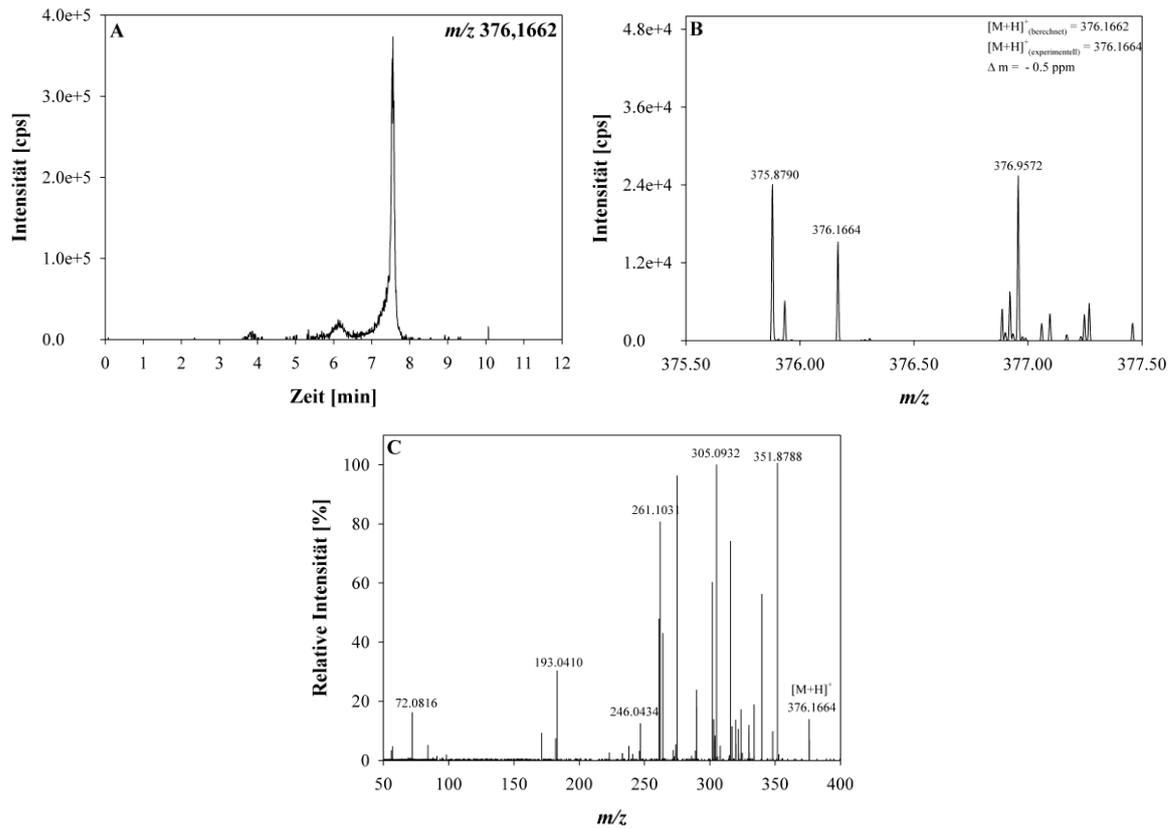
Anhang 15: Extracted Ion Chromatogramm m/z 332,1764 \pm 0,0033 (A), Massenspektrum m/z 332,1764 \pm 1 amu (B) sowie Fragmentierungsspektrum zwischen 1,70 und 1,95 min (C) für den möglichen Metaboliten m/z 332,1764 (gemessene Probe: Huhn 1, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 52 h).



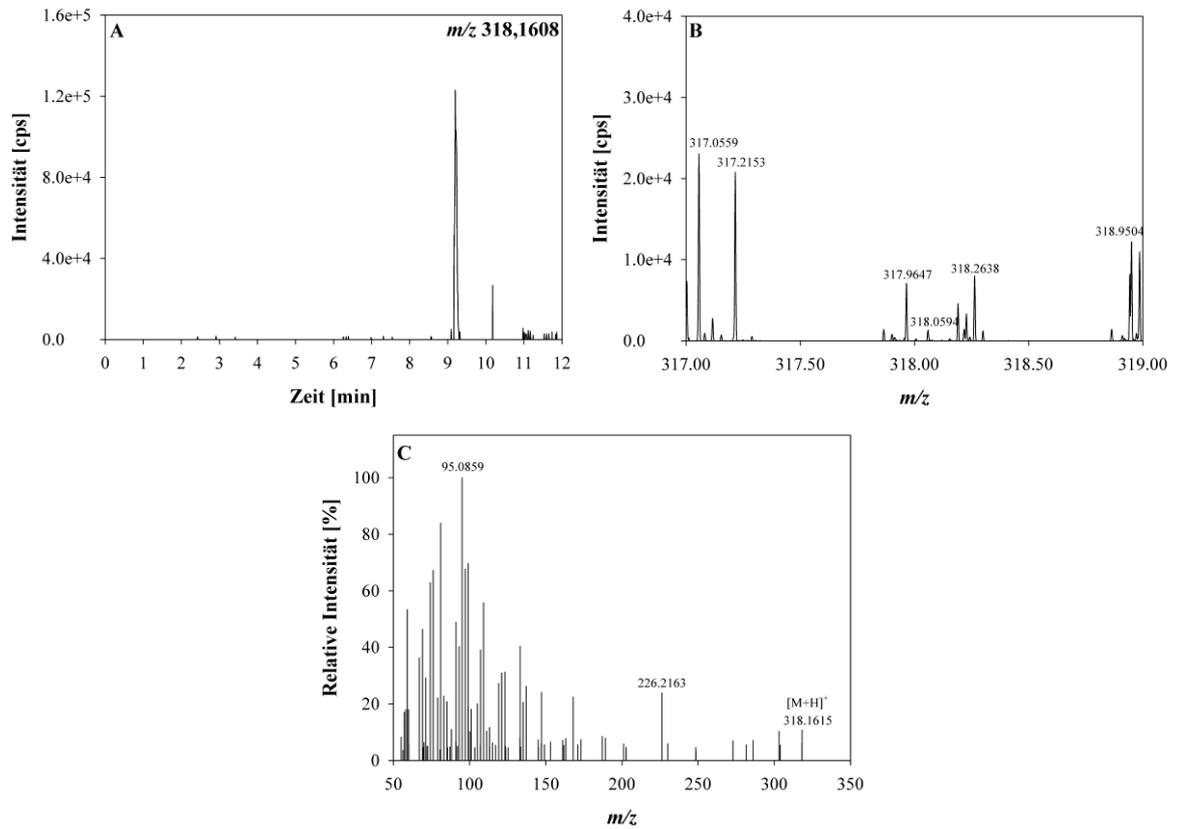
Anhang 16: Extracted Ion Chromatogramm m/z 346,1194 \pm 0,0035 (A), Massenspektrum m/z 346,1194 \pm 1 amu (B) sowie Fragmentierungsspektrum zwischen 8,50 und 8,90 min (C) für den möglichen Metaboliten m/z 346,1194 (gemessene Probe: Huhn 1, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 52 h).



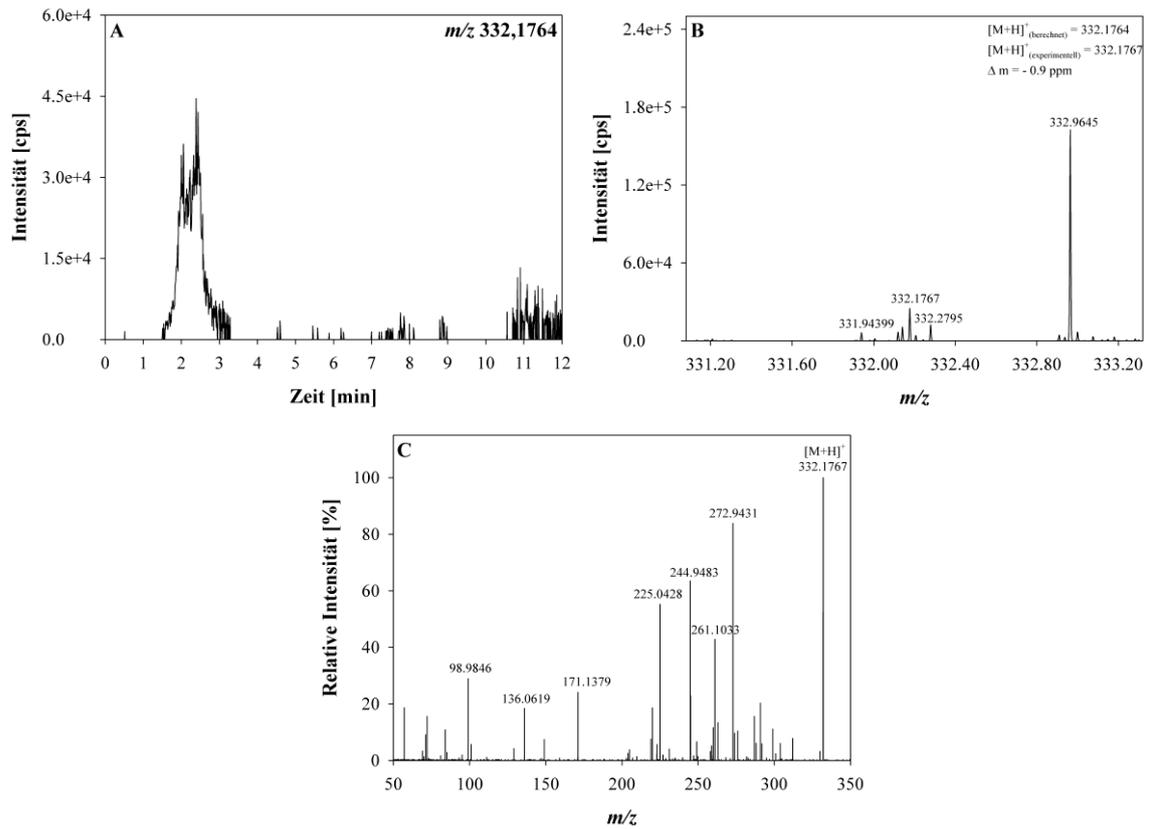
Anhang 17: Extracted Ion Chromatogramm m/z 374,1705 \pm 0,0037 (A), Massenspektrum m/z 374,1705 \pm 1 amu (B) sowie Fragmentierungsspektrum zwischen 4,23 und 4,71 min (C) für den möglichen Metaboliten m/z 374,1705 (gemessene Probe: Huhn 1, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 52 h).



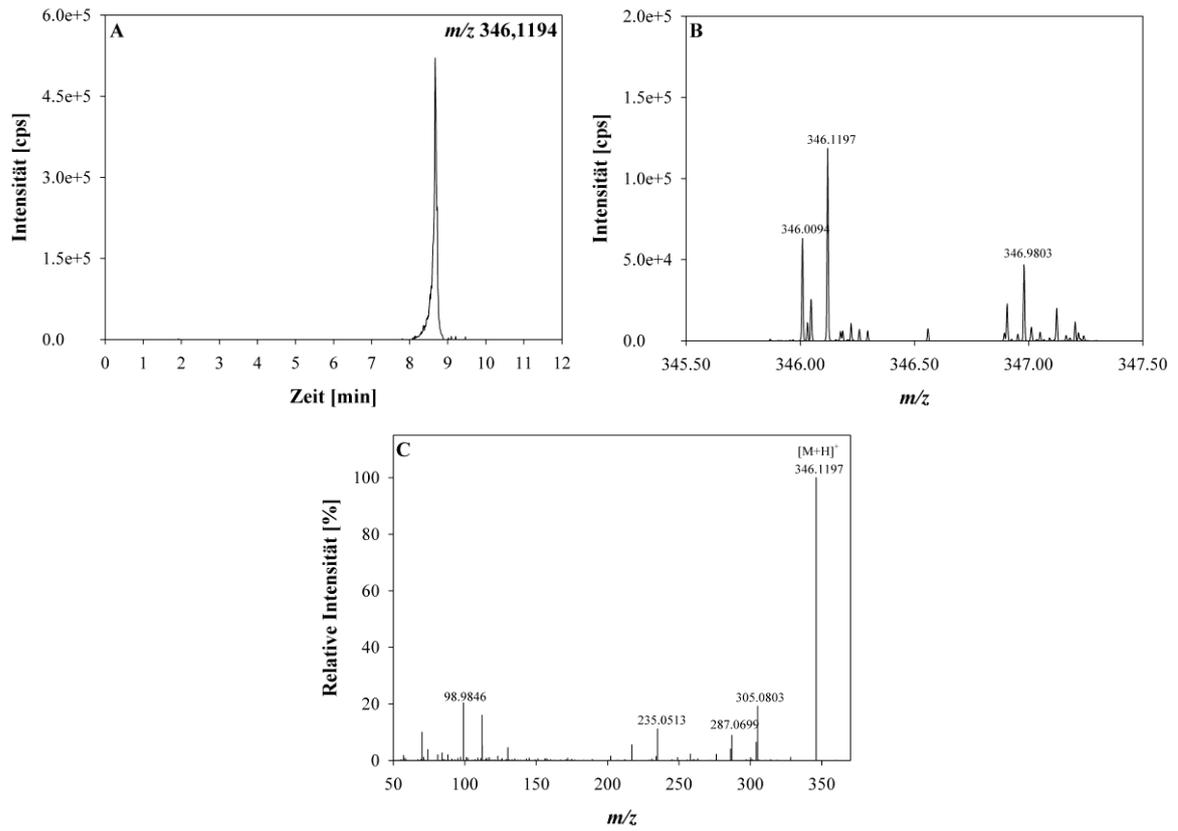
Anhang 18: Extracted Ion Chromatogramm m/z 376,1662 \pm 0,0038 (A), Massenspektrum m/z 376,1662 \pm 1 amu (B) sowie Fragmentierungsspektrum zwischen 5,55 und 6,21 min (C) für den möglichen Metaboliten m/z 376,1662 (gemessene Probe: Huhn 1, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 52 h).



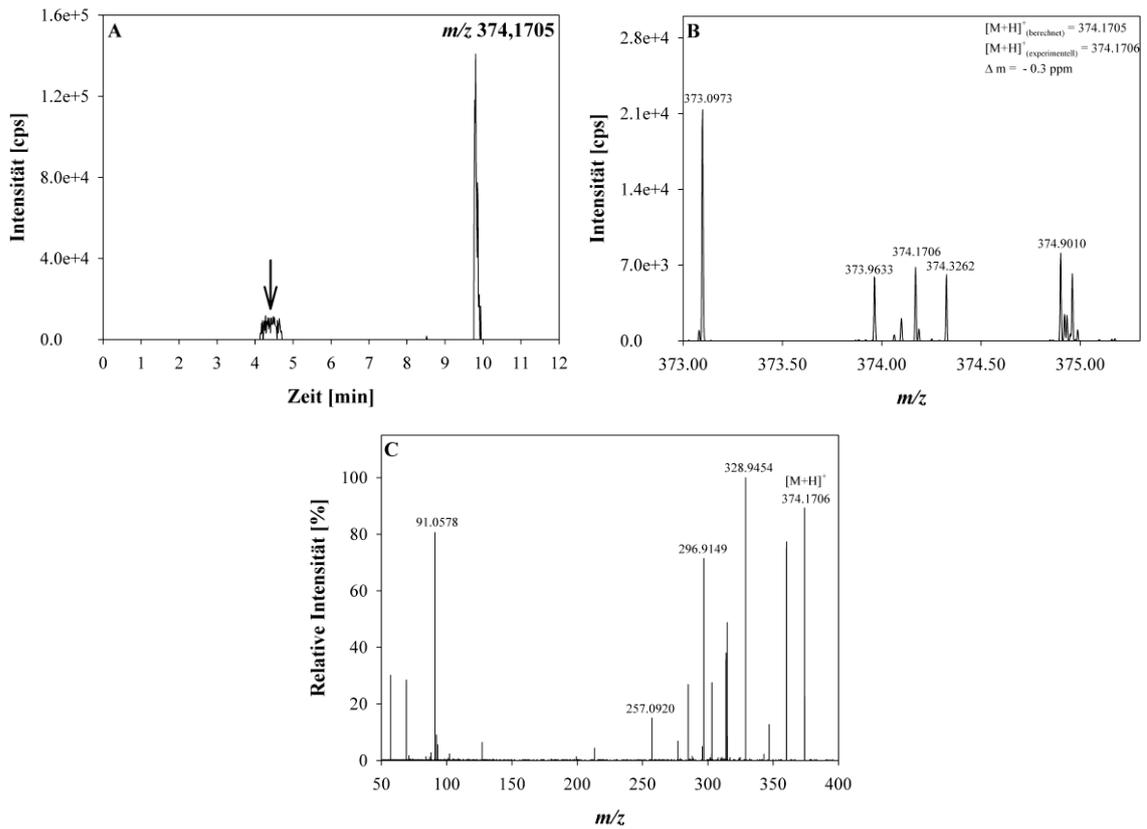
Anhang 19: Extracted Ion Chromatogramm m/z 318,1608 \pm 0,0032 (A), Massenspektrum m/z 318,1608 \pm 1 amu (B) sowie Fragmentierungsspektrum zwischen 2,35 und 2,80 min (C) für den möglichen Metaboliten m/z 318,1608 (gemessene Probe: Huhn 2, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 48 h).



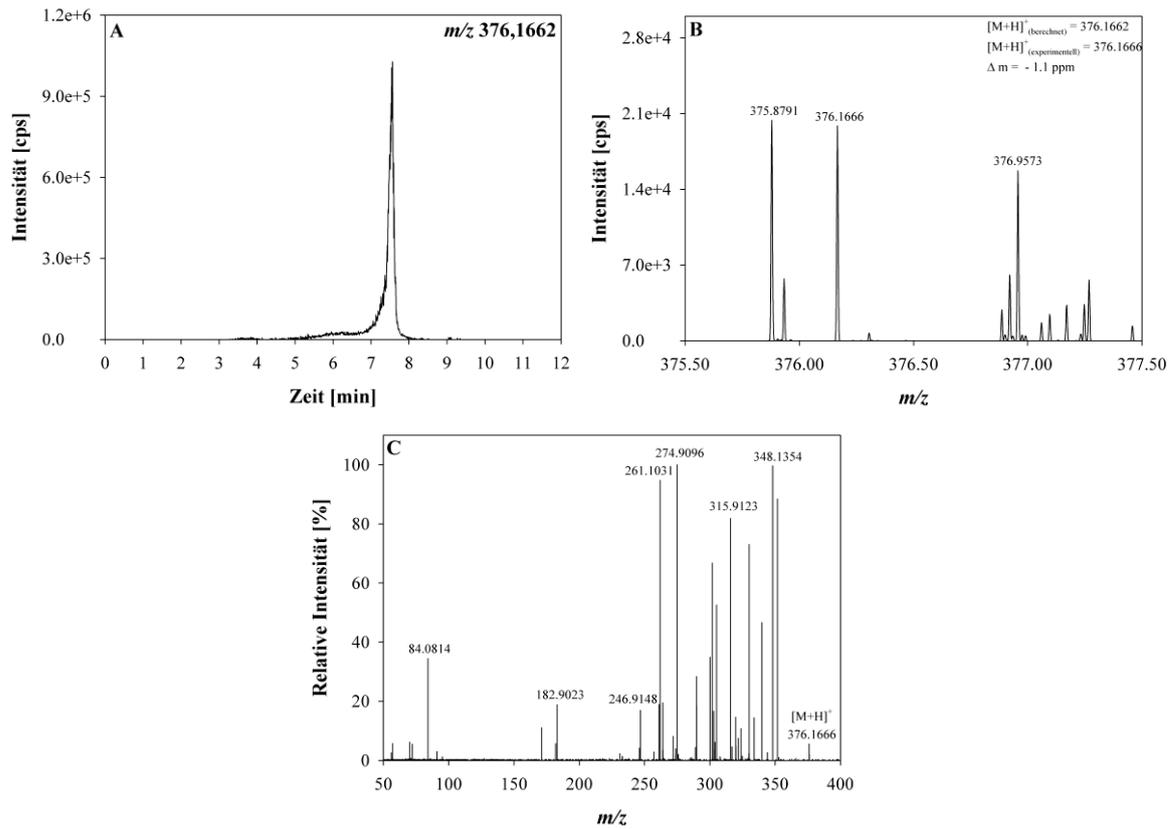
Anhang 20: Extracted Ion Chromatogramm m/z 332,1764 \pm 0,0033 (A), Massenspektrum m/z 332,1764 \pm 1 amu (B) sowie Fragmentierungsspektrum zwischen 1,65 und 1,90 min (C) für den möglichen Metaboliten m/z 332,1764 (gemessene Probe: Huhn 3, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 48 h).



Anhang 21: Extracted Ion Chromatogramm m/z 346,1194 \pm 0,0035 (A), Massenspektrum m/z 346,1194 \pm 1 amu (B) sowie Fragmentierungsspektrum zwischen 8,45 und 8,82 min (C) für den möglichen Metaboliten m/z 346,1194 (gemessene Probe: Huhn 3, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 48 h).



Anhang 22: Extracted Ion Chromatogramm m/z 374,1705 \pm 0,0037 (A), Massenspektrum m/z 374,1705 \pm 1 amu (B) sowie Fragmentierungsspektrum zwischen 4,21 und 4,76 min (C) für den möglichen Metaboliten m/z 374,1705 (gemessene Probe: Huhn 3, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 48 h).



Anhang 23: Extracted Ion Chromatogramm m/z 376,1662 \pm 0,0038 (A), Massenspektrum m/z 376,1662 \pm 1 amu (B) sowie Fragmentierungsspektrum zwischen 5,51 und 6,22 min (C) für den möglichen Metaboliten m/z 376,1662 (gemessene Probe: Huhn 3, Dosis: 10 mg/kg KG Enrofloxacin, Zeitpunkt 48 h).

Veröffentlichungen

Publikationen

Janusch, F., Kalthoff, L., Hamscher, G., Mohring, S. (2013) Evaluation and subsequent minimization of matrix effects caused by phospholipids in LC-MS analysis of biological samples. *Bioanalysis* 5 (17): 2101-2114.

Tagungsbeiträge

Janusch, F., Scherz, G., Mohring, S., Hamscher, G. (2013) Entwicklung einer Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode zur simultanen Bestimmung von Fluorchinolonen in Hühnerfaeces mittels HPLC-MS/MS. *Deutscher Lebensmittelchemikertag 2013* (Poster).

Janusch, F., Kalthoff, L., Mohring, S., Hamscher, G. (2013) Minimierung von Matrixeffekten in der LC-MS/MS Analyse von Fluorchinolonen in Blutplasma durch selektive Entfernung von Phospholipiden mittels Festphasenextraktion. *ANAKON 2013* (Vortrag).

Janusch, F., Mohring, S., Hamscher, G. (2012) Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Fluorchinolonen in Hühnerplasma. *Verbraucherschutz in DART: Forschungserkenntnisse und -perspektiven zu Antibiotikaresistenzen* (Poster).

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerd Hamscher für die Bereitstellung des Themas, die stets hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie die exzellenten Arbeitsbedingungen bedanken. Vielen Dank für diese lehrreiche Zeit!

Mein Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Bernhard Spengler für die Übernahme des Zweitgutachtens. Außerdem möchte ich mich bei ihm und insbesondere bei seinem Mitarbeiter Herrn Dr. Vladimir Gorshkov bedanken, die Messungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie in seinem Arbeitskreis durchführen zu dürfen.

Herrn PD Dr. Rolf Alexander Düring und Herrn Prof. Dr. Richard Göttlich danke ich für den Beitritt zur Prüfungskommission.

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Manfred Kietzmann von der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Gesine Scherz für die Bereitstellung von fluorochinolonfreiem Hühnerplasma sowie die kooperative Zusammenarbeit bedanken.

Für die Bereitstellung von fluorochinolonfreiem Hühnerplasma möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Matthias Voss von der Lohmann Tierzucht GmbH in Cuxhaven bedanken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Lierz von der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig Universität Gießen für die Bereitstellung von Leermatrixproben (Hühnerplasma und -faeces).

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Jörg Hartung für seinen unermüdlichen Einsatz bei der Bereitstellung von Sedimentationsstaubproben.

Für die finanzielle Förderung meiner Arbeit möchte ich mich recht herzlich beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) bedanken (RESET, Förderkennzeichen: 01KI1013A).

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein Dank gilt insbesondere Frau Dr. Siegrun Mohring für die zahlreichen und hilfreichen Ratschläge, die stets konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen und das schnelle Korrekturlesen. Bei Frau Dr. Astrid Spielmeyer möchte ich mich für ihr stets offenes

Ohr, ihr unendliches Wissen und ihre uneingeschränkte Hilfe bei den größeren und kleineren Reparaturen unseres Messgerätes bedanken.

Für die praktischen Arbeiten bei der Evaluierung und Minimierung von Matrixeffekten in der Analytik von Hühnerplasma bedanke ich mich bei Frau Lena Kalthoff.

Frau Katharina Böting und Frau Simone Dölfel danke ich für den Zusammenhalt und die Unterstützung in einer nicht immer einfachen Anfangszeit.

Mein größter Dank gilt den Menschen, die mir nahe stehen und mich immer unterstützt haben. Dabei möchte ich insbesondere meinen Eltern für ihre unendliche Geduld, Liebe, Rückhalt und Unterstützung – auch in schwierigen Zeiten – danken.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**