

Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 93 (2002)
Heft: 5

Artikel: Quantitativer Nachweis von mehreren Makrolid-Antibiotika in Fleisch, Leber und Niere mit LC-MS/MS nach einer teilweisen automatisierten Aufreinigung
Autor: Guggisberg, Dominik / Mooser, André E. / Koch, Herbert
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-981730>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 11.05.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Quantitativer Nachweis von mehreren Makrolid-Antibiotika in Fleisch, Leber und Niere mit LC-MS/MS nach einer teilweisen automatisierten Aufreinigung

Dominik Guggisberg, André E. Mooser und Herbert Koch,
Bundesamt für Veterinärwesen, Liebefeld-Bern

Eingegangen 10. Juli 2002, angenommen 27. August 2002

Einleitung

Makrolid-Antibiotika (MA), mit Erythromycin und Spiramycin als wichtigste Vertreter (Abb. 1), haben in den letzten Jahren für die Behandlung von Atemwegserkrankungen und Infektionen im HNO-Bereich als Alternative zu den Penicillinen deutlich an Bedeutung zugenommen. Die seit 1952 bekannten von *Streptomyces*-Arten produzierten Antibiotika vom Strukturtyp der makrocyclischen Lactone mit meist 14-, 15- oder 16-gliedrigem Lactonring werden sowohl in der Human- als

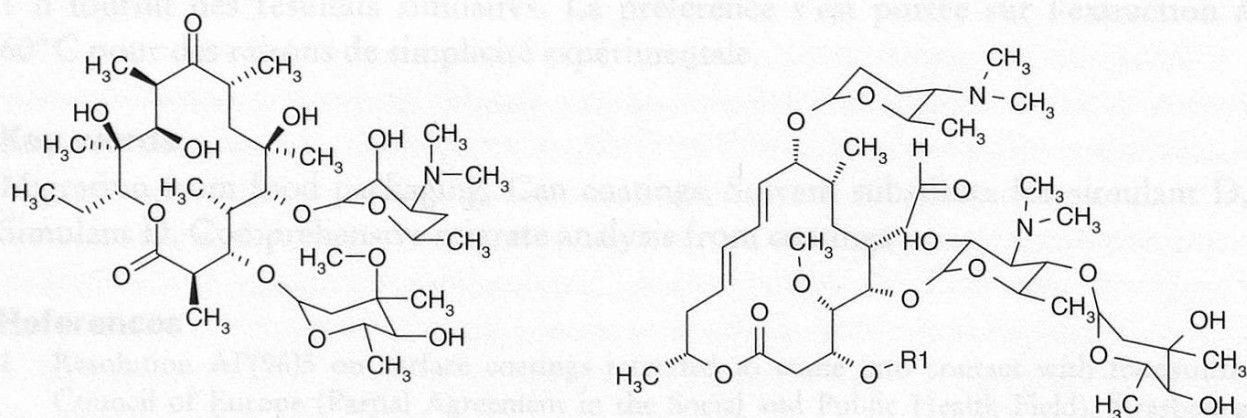


Abbildung 1 Chemische Strukturen von Erythromycin (links) und Spiramycin (rechts)

auch in der Veterinärmedizin häufig gegen Bakterien eingesetzt. Grössere Lactonringe (26–40 Ringglieder) wirken praktisch ausschliesslich gegen Pilze und Hefen (1).

Kennzeichnend für die Struktur ist das ringförmige Grundgerüst mit 10 bis über 40 Ringgliedern und mindestens einem inneren Ester (Lacton). Häufig enthält der Ring auch Doppelbindungen und Epoxidgruppen. Stark variieren die Substituenten am Ring, die neben Resten wie Hydroxylgruppen auch aus glykosidisch verknüpften Zuckern bzw. Aminoazuckern oder aromatischen Substituenten bestehen können.

Am 1. Januar 1999 wurden sämtliche Antibiotika als antimikrobielle Leistungsförderer in der Tiermast verboten (2). Der Einsatz als Tierarzneimittel zu therapeutischen Zwecken ist meldepflichtig und mit einem Behandlungsjournal zu belegen (2). Heute sind drei Makrolide als Tierarzneimittel in der Schweiz registriert, wobei folgende vier Grenzwerte gelten (Tabelle 1).

Tabelle 1

Grenzwerte nach FIV (3) der registrierten MA

Makrolid-Antibiotika (MA)	Grenzwert Fleisch/Muskelfleisch (FIV)	Typische Produkte (Auswahl)
Erythromycin	0,40 mg/kg	z.Z. kein Produkt im Handel
Spiramycin	0,30 mg/kg	B-SU, Spiramastin, Suanovil 20
Tilmicosin	0,05 mg/kg	Micotil 300, Pulmotil Prämix
Tylosin	0,10 mg/kg	Meliovet 3 wl, ufamed-S-202, Tylan soluble, Vetmix Chlor-Tetra Plus S

Für folgende MA, die möglicherweise in der Veterinärmedizin im Ausland eingesetzt werden, sind keine Grenzwerte in der FIV (3) festgelegt:

Oleandomycin, Josamycin, Kitasamycin, Roxithromycin und Troleandomycin.

Rückstände dieser Arzneimittel im Fleisch und in der Milch können für den Konsumenten eine potentielle gesundheitliche Gefahr darstellen (Resistenzbildung und Allergien).

Für «Micotil 300» gilt beispielsweise eine generelle Wartezeit von 28 Tagen für essbares Gewebe.

Damit eine möglichst grosse Anzahl von tierischen Gewebeproben auf Makrolid-Rückstände in Fleisch und Innereien überprüfbar ist, benötigten wir eine Analyse-methode mit genügender Empfindlichkeit und hohem Durchsatz.

Die Analyse von MA in Lebensmitteln tierischer Herkunft ist durch zwei Umstände erschwert:

- die Wirkstoffe sind weder flüchtig noch lassen sie sich zu stabilen Derivaten für GC umsetzen;
- für den empfindlichen Nachweis nach der Auftrennung durch HPLC fehlen UV- oder Fluoreszenzabsorption. Deshalb werden MA häufig zwecks Nach-

weis im UV- oder Fluoreszenzdetektor vorsäulen- oder nachsäulenderivatisiert oder im Massenspektrometer detektiert.

Bisher sind einige Arbeiten erschienen, die aufzeigen, wie MA in Milch, Fleisch und Innereien bestimmt werden können.

I. Kanfer et al. (4) geben in einem Review-Artikel einen guten Überblick, wie Makrolide grundsätzlich aus biologischen Proben, Fermentationsmedien und pharmazeutischen Produkten extrahiert und analysiert werden können. *B. Shaikh et al.* (5) zeigen generell, wie Antibiotika, unter anderen auch MA, aus Blut, Gewebe und Milch extrahiert und analysiert werden.

Die von uns durchgesehenen Arbeiten wurden in sechs Kategorien unterteilt (Tabelle 2).

Tabelle 2

Nachweismethoden von MA und weiterführende Literatur

Kategorie	Analysenmethode	Literatur
1	Analyse mit UV, ohne Derivatisation	(6–18)
2	Analyse mit elektrochemischer Detektion	(19–23)
3	Analyse mit Vorsäulenderivatisation	(24–27)
4	Analyse mit Nachsäulenderivatisation	(28–29)
5	Analyse mit LC-MS	(30–37)
6	Analyse mit ELISA	(38–40)

Nachdem in unserem Laboratorium diverse Versuche unternommen wurden, möglichst viele MA durch Vorsäulen- bzw. auch Nachsäulenderivatisation quantitativ nachzuweisen und diese «Multi»-Methoden zu keinem akzeptablen Resultat geführt haben, hat man sich auf den Nachweis der wichtigsten Makrolide mit LC-MS/MS konzentriert.

Wir berichten in der folgenden Arbeit von einer LC-MS/MS-Methode für sieben Makrolide in Fleisch, Leber und Niere vom Rind, Kalb, Pferd, Schaf, Huhn und vom Schwein mit internem Standard. Es geht in der Methode darum, die Makrolide mit Ionenaustausch auf einer starken Kationentauscher-Säule (SCX) möglichst rein und quantitativ anzureichern, sie dann mit HPLC möglichst vollständig von der Fleischmatrix abzutrennen und durch Massenspektrometrie sehr selektiv nachzuweisen. Die Probenvorbereitung wurde auf einen hohen Probendurchsatz optimiert und weitgehend automatisiert. Zudem wurden weitere Fragmentierungionen zur Bestätigung überprüft. Die Methode kann auch als Bestätigungsmethode nach ELISA-Tests (38–40) dienen.

Kurzbeschreibung der Methode

Rind-, Kalb-, Pferde-, Schaf-, Poulet- und Schweinefleisch: Die Probe wird homogenisiert (5 g), mit wässriger Perchlorsäurelösung (20 ml) mittels Polytron behandelt und zentrifugiert. Der Überstand wird eingengt und über SPE (SCX)

aufgereinigt. Die Analyse erfolgt mit LC-MS/MS. Die Quantifizierung wird mit dem internen Standard Roxithromycin durchgeführt.

Material und Methode

Standardsubstanzen und Bezugsquellen

Tylosin, Roxithromycin, Oleandomycin	Sigma-Aldrich
Spiramycin, Erythromycin, Josamycin	Fluka
Kitasamycin	ICN
Tilmicosin	Eli Lilly

Herstellung der Stammlösung und der Verdünnungslösungen gemäss Tabelle 3. (Die Wirkstoffkonzentration kann je nach Charge geringfügig schwanken, deshalb ist die Gehaltsangabe des Lieferanten wenn möglich zu beachten!)

Tabelle 3
Herstellung der Stamm- und Verdünnungslösungen

Stammlösung	
Spiramycin	12 mg Spiramycin einwiegen und in 10 ml MeOH lösen
Tylosin	12,8 mg Tylosin einwiegen und in 10 ml MeOH lösen
Roxithromycin	11 mg Roxithromycin einwiegen und in 10 ml MeOH lösen
Oleandomycin	12 mg Oleandomycin einwiegen und in 10 ml MeOH lösen
Erythromycin	10,2 mg Erythromycin einwiegen und in 10 ml MeOH lösen
Josamycin	10 mg Josamycin einwiegen und in 10 ml MeOH lösen
Kitasamycin	10 mg Kitasamycin einwiegen und in 10 ml MeOH lösen
Tilmicosin	10 mg Tilmicosin einwiegen und in 10 ml MeOH lösen
Standard I	je 100 µl der Stammlösungen werden mit Milli-Q-Wasser auf 10 ml aufgefüllt (=je 10 ng/µl)
Standard II	1000 µl des Standards I werden mit Milli-Q-Wasser auf 10 ml aufgefüllt (=je 1 ng/µl)
Standard III (LC-MS)	100 µl des Standards II mit Milli-Q-Wasser auf 1 ml aufgefüllt (=je 0,1 ng/µl)

Chemikalien und Material für die Probenvorbereitung

- Milli-Q-Wasser
- Perchlorsäure (Merck z. A. 518, 60 %), c(Perchlorsäure)=0,01 mol/l: 1+899 mit Wasser verdünnt
- NH₃ (Merck, z. A., 25 %)
- NaOH (Merck, z. A.)
- Zitronensäure (Fluka, 27490); c(Zitronensäure)=0,1 mol/l; 21 g/l, mit 30 % NaOH auf pH=4 stellen
- Methanol (Merck z. A.)
- Ameisensäure (z. A. Merck 1.00264)
- SPE SCX-500 mg, 3 ml (IST)

Reagenzien LC-MS

Mobile Phase: Acetonitril/Ameisensäure (0,1 %)=20/80 (Gradient bis 70 % Acetonitril)

- Acetonitril (LiChrosolv, Merck)
- Milli-Q-Wasser mit 0,1 % Ameisensäure

Geräte und Hilfsmittel

- Analysenwaage (0,1 mg, Mettler)
- Probenzerkleinerungsgerät Moulinette (Moulinex)
- Glaszentrifugengläser (90 ml, mit Deckel)
- Zentrifugengläser (50 ml, Polycarbonat, Nalgene)
- Laborschnellwaage (Mettler)
- Polytron-Homogenisiergerät mit 12-mm-Mixstab
- Laborzentrifuge (Heraeus, Hettich bis 4000 U/min)
- Vakuumeinheit für spe-Trennsäulen oder Gilson ASPEC XL
- Spitzkolben (100 ml)
- Vortex
- 100-, 250-, 1000- μ l-Spritzen (Hamilton)
- 10-ml-Reagenzglas
- 1,5-ml-Autosampler-Vials mit Insert
- Turbovap
- HPLC-Apparatur, z.B. Waters 2690
- Massenspektrometer, z.B. Micromass

Probenaufbereitung

Extraktion der Probe

Die Probe wird wenn möglich ohne Fett mit der Moulinette homogenisiert. 5 g der aufgetauten und homogenen Muskelprobe werden im Zentrifugenglas mit internem Standard (25 μ l $\times$ 10 ng/ μ l), 14 ml $c(\text{HClO}_4)=0,01$ mol/l und mit 6 ml Methanol versetzt und polytronisiert. Nach 15 min Zentrifugieren (4000 U/min; 2950 g) wird in einen Spitzkolben dekantiert und 15 min bei 45°C und 115 mbar ($\pm$ 15 mbar) eingengt. Es wird mit Wasser auf 20 ml aufgefüllt, nochmals 10 min zentrifugiert (4000 U/min; 2950 g) oder falls möglich ultrazentrifugiert (18000 U/min; 37600 g) und über SCX-SPE gereinigt.

Reinigung der Probe¹

Eine IST-SPE SCX (500 mg) wird mit 5 ml Methanol, 5 ml H_2O und 5 ml $c(\text{Zitronensäure})=0,1$ mol/l konditioniert. Die Probe wird appliziert und wenn möglich ohne Vakuum durchgesaugt. Nachgewaschen wird mit 5 ml H_2O und 1 ml

¹ Dieser Teil der Methode wird im BVET mit einem Gilson Aspec XL komplett automatisch durchgeführt. Detaillierte Angaben sind beim Autor auf Anfrage erhältlich.

Methanol. Es wird mit 5 ml 5 % NH₃ in Methanol eluiert². Am Turbovap wird bei 40°C eingengt, mit 0,5 ml Methanol/H₂O (1:1) aufgenommen, gut aufgerührt, 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und in ein Insert Vial abgefüllt. Davon werden 5 µl in das LC-MS/MS injiziert.

Analyse mit HPLC: Bedingungen, Vorgehen und Auswertung

Bedingungen, Parameter LC-MS/MS

Gerät:	Waters 2690 gekoppelt mit einem QuattroLC (Micromass)
Vorsäule:	XTerra MS C18, 3×20 mm (Waters, Part. Nr. 186000656)
Säule:	Stahlkartusche, 150 mm×3 mm (Waters, Part. Nr. 186000562)
Stationäre Phase:	XTerra, MS C18, 3,5 µm
Mobile Phase:	A: 20 % Acetonitril, B: 80 % 0,1 % Ameisensäure, Gradient
Flussrate:	0,4 ml/min
Maximaldruck:	300 bar
Ofentemperatur:	25°C
Einspritzvolumen:	5 µl
Elutionsdauer gesamt:	22 min (Peaks ab ca. 5 min)
Detektor:	QuattroLC Massenspektrometer, MRM-Mode ³
Auswertesoftware:	MassLynx

Die Parameter für die HPLC und die Massenspektrometrie sind in den Tabellen 4 bis 6 zusammengefasst.

Die Gasflüsse (Stickstoff und Argon) sind jeweils auf den MRM-Mode optimiert.

Die «Dwell-time» wurde auf 0,5 Sekunden gesetzt. Das erstgenannte Tochterion ist jeweils das intensivere Fragment und wird für die Quantifizierung verwendet. Für Kitasamycin, Spiramycin II und III werden je nur ein Tochterion aufgezeichnet (Tabelle 6).

Tabelle 4
Gradient des HPLC

Zeit (min)	% Acetonitril	Ameisensäure (0,1 %)
0–1	20	80
1–4	45	55
4–7	70	30
7–11	70	30
11–22	20	80

² Immer frisch herstellen.

³ MRM-Mode bedeutet «Multiple Reaction Monitoring» und entspricht dem MS-MS-Modus, bei dem die beiden Quadrupole MS1 und MS2 statisch betrieben werden.

Tabelle 5
Die Tune-Parameter des LC-MS

<i>Parameter</i>	<i>Wert</i>	<i>Parameter</i>	<i>Wert</i>
Capillary	3,25 kV	Extractor	3 V
RF-Lens	0,20 V	Source Block Temp.	135° C
Desolv. Temp.	350° C	LM Res1	12
HM Res1	12	I Energy1	0,5
Entrance	0	Exit	0
LM Res2	12	HM Res2	12
I Energy2	2	Multiplier	650

Tabelle 6
Mutterionen, Tochterionen

<i>Macrolid</i>	<i>Mutterionen</i>	<i>Tochterionen</i>	<i>Cone (V)</i>	<i>Kollisions- energie</i>	<i>Bemerkung: (Ladungszustand)</i>
Spiramycin I	422,5	174, 540,5	32	16	(M+2H) ²⁺
Spiramycin II	443,6	174	30	16	(M+2H) ²⁺
Spiramycin III	450,6	174	25	16	(M+2H) ²⁺
Tilmicosin	869,7	174, 696	70	41	(M+H) ⁺
Tilmicosin	435,6	174, 696	35	19	(M+2H) ²⁺
Tylosin	916,6	174,2, 772,5	70	38	(M+H) ⁺
Roxithromycin	837,5	679,5, 158,1	45	24	(M+H) ⁺
Josamycin	828,5	174, 229	65	32	(M+H) ⁺
Kitasamycin	772,5	174,2	70	35	(M+H) ⁺
Erythromycin	734,5	158,2, 576,5	40	26	(M+H) ⁺
Oleandomycin	688,4	544,3, 158,1	38	18	(M+H) ⁺

Validierung der Methode

Die Methode wurde für 25, 50 und 100 ppb validiert. Die Resultate können der Tabelle 7 entnommen werden.

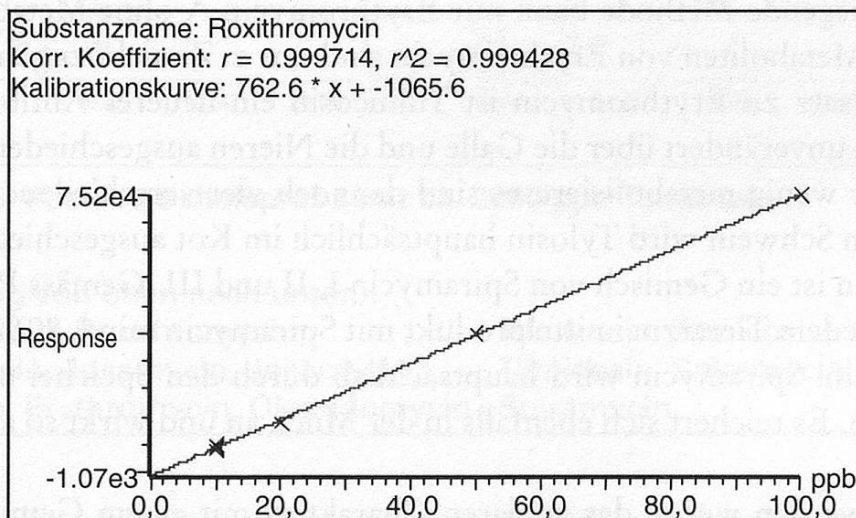
Zu beachten ist der «positive» Matrixeffekt bei doppelt geladenen «Parent»-Ionen von Spiramycin und Tilmicosin. Die Methode ist wegen des Matrixeffektes empfindlicher, allerdings ist das gefundene Resultat durch den entsprechenden Faktor (2,3 für Spiramycin und 3 für Tilmicosin) zu dividieren.

Aus der Abbildung 2 geht die Linearität der Standards hervor.

Tabelle 7

Wiederfindungen bei dotiertem Rindfleisch

<i>Rindfleisch: Dotierter Gehalt (ppb)⁴</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert (ppb)</i>	<i>Standard- abweichung (ppb)</i>	<i>Relative Standard- abweichung</i>	<i>Mittlere Wiederfindung (%)</i>
100 ppb Roxithromycin	5	83,7	3,8	4,51	83,7
100 ppb Spiramycin	5	234	51	25,3	234 ⁵
100 ppb Tilmicosin	5	307	19,6	6,4	307 ⁶
100 ppb Oleandomycin	5	83,2	2,26	2,7	83,2
100 ppb Erythromycin	5	61,4	4,5	7,4	61,4
100 ppb Tylosin	5	105,4	4,4	4,2	105,4
100 ppb Josamycin	5	96,4	4,8	5,0	96,4
100 ppb Kitasamycin	5	106,7	4,6	4,3	106,7

**Abbildung 2 Kalibrierkurve von Roxithromycin zur Auswertung über internen Standard**

⁴ Die Validierung wurde auch bei 25 und 50 ppb wiederholt ($n=5$). Die Regressionskoeffizienten sind alle $>0,99$ für alle MA, ausgenommen für Spiramycin mit einem Wert von 0,92.

⁵ Infolge der Messung von $(M+2H)^{2+}$ werden zu hohe Wiederfindungen festgestellt (positiver Matrixeffekt!). Das Resultat ist durch den Faktor 2,3 zu dividieren.

⁶ Infolge der Messung von $(M+2H)^{2+}$ werden zu hohe Wiederfindungen festgestellt (positiver Matrixeffekt!). Das Resultat ist durch den Faktor 3,0 zu dividieren.

Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze/Auswertung

Die probenbezogene Bestimmungsgrenze für Spiramycin beträgt 5 ppb. Angesichts des hohen Grenzwertes von 300 ppb für Spiramycin ist die Methode völlig ausreichend. Für sämtliche anderen MA ist die Bestimmungsgrenze noch kleiner als 5 ppb.

Die Auswertung der Resultate erfolgt über den internen Standard Roxithromycin. Dabei entsprechen $5 \mu\text{l} \times 0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (Standard III) genau 10 ppb des entsprechenden MA bei 100 % Wiederfindung.⁷

Diskussion

Erythromycin ist ein Gemisch von verschiedenen Derivaten. Die Hauptkomponente wird als Erythromycin A bezeichnet. Die Stabilität von Erythromycin ($\text{pK}_s=8,8$ (1)) ist vom pH-Wert und von der Temperatur abhängig (Stabilitätsoptimum bei pH 8,5 (1)). Im schwach sauren Bereich tritt innerhalb von Stunden Wirkverlust auf. Deshalb ist darauf zu achten, dass die Extraktion in verdünnter Perchlorsäure zügig vorangeht und die Proben nicht über Nacht stehen gelassen werden.

Wie in (1) beschrieben, werden z. T. Salze oder Ester von Erythromycin hergestellt und eingesetzt, die einerseits stabiler sind und andererseits eine höhere Bioverfügbarkeit haben. Offensichtlich hat Erythromycin eine kurze Plasmahalbwertszeit (2 h) und es wird überwiegend in Form von Metaboliten mit der Galle ausgeschieden. Die vorliegende Methode kann nur Erythromycin A ohne Metaboliten nachweisen. (Die Metaboliten von Erythromycin sind uns z. Z. nicht zugänglich.)

Im Gegensatz zu Erythromycin ist Tilmicosin ein neueres Antibiotikum, das hauptsächlich unverändert über die Galle und die Nieren ausgeschieden wird. Tylosin wird zwar wenig metabolisiert, es sind dennoch vier verschiedene Metaboliten bekannt. Beim Schwein wird Tylosin hauptsächlich im Kot ausgeschieden.

Spiramycin ist ein Gemisch von Spiramycin I, II und III. Gemäss Pharmakopöe (41) sollte in jedem Tierarzneimittelprodukt mit Spiramycin mind. 80 % Spiramycin I enthalten sein. Spiramycin wird hauptsächlich durch den Speichel und die Galle ausgeschieden. Es reichert sich ebenfalls in der Milch an und wirkt so auf die Mastitisreger.

Die MA werden wegen des apolaren Charakters mit einem Gemisch von verdünnter Säure und Methanol extrahiert. Die Anreicherung erfolgt in saurem Milieu auf einer Kationentauschersäule. Anschliessend werden die MA mit alkalischem Methanol eluiert.

⁷ Umrechnungsbeispiel:

100 ppb entsprechen 100 ng Spiramycin pro Gramm Fleisch oder 500 ng Spiramycin pro 5 Gramm Fleisch. Dies entspricht nach der Aufarbeitung von 5 Gramm Fleisch einer gesamten Flüssigkeitsmenge von 500 μl . Davon werden 5 μl direkt ins HPLC-System eingespritzt.

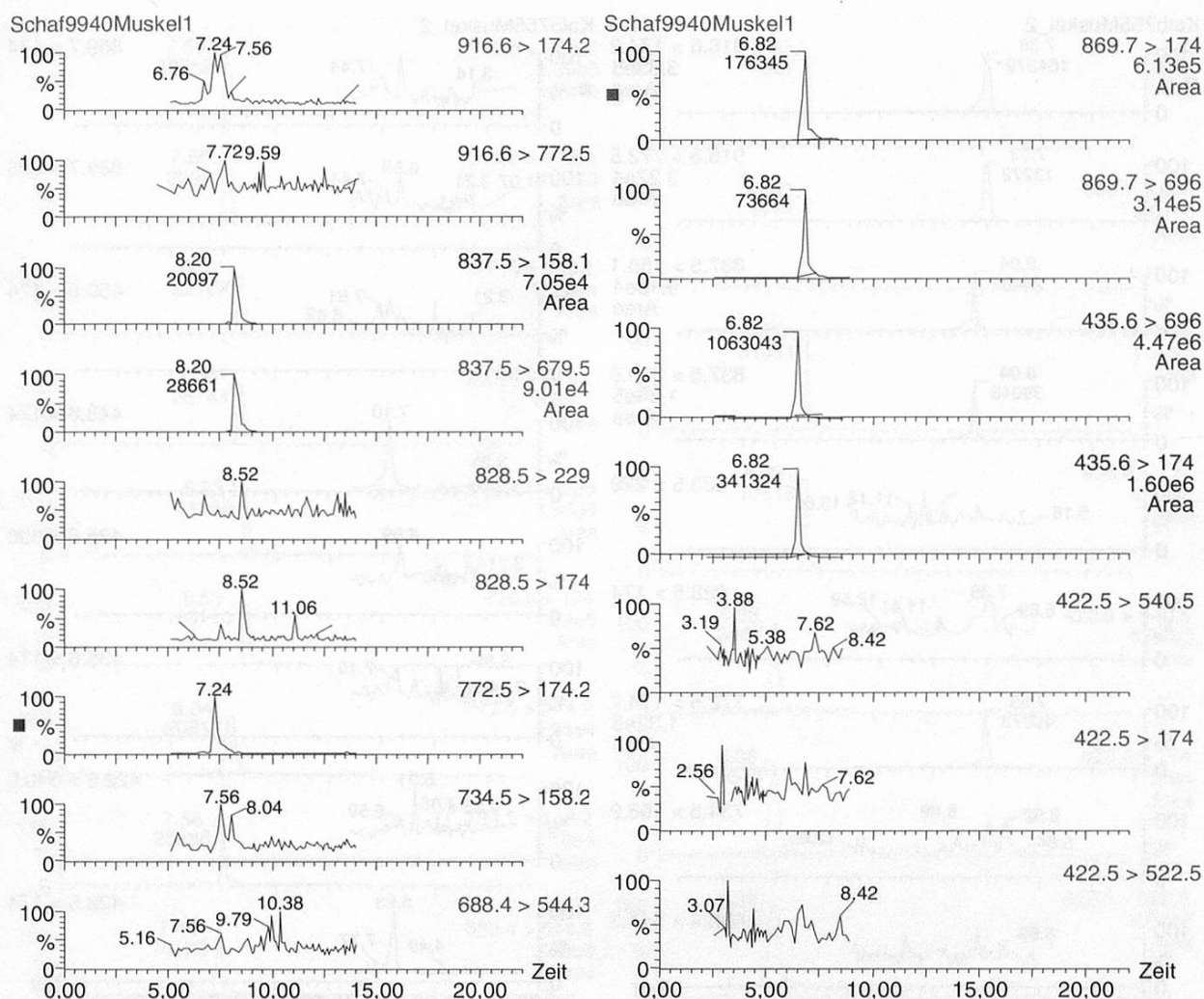


Abbildung 3 Positive Schafsprobe mit ca. 2000 ppb Tilmicosin

Legende:

(Bezeichnung von oben nach unten):

Tylosin, Tylosin, Roxithromycin,

Roxithromycin, Josamycin, Josamycin,

Kitasamycin, Erythromycin, Oleandomycin

Tilmicosin, Tilmicosin, Tilmicosin,

Tilmicosin, Spiramycin, Spiramycin,

Spiramycin

Die Messung und Quantifizierung in dieser Methode geschieht über den internen Standard Roxithromycin, der bereits vor der Extraktion zugegeben wird. Infolge des «positiven» Matrixeffektes bei doppelt geladenen Mutterionen von Spiramycin und Tilmicosin sind die gefundenen Resultate mit dem jeweiligen Faktor (2,3 bzw. 3) zu dividieren. Dieser Matrixeffekt kommt offenbar dadurch zustande, dass doppelt geladene Mutterionen gemessen werden. Die fünf anderen MA erzielen eine sehr gute Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit. Einzig Troleandomycin, ein weiteres MA, das in der Studie verwendet wurde, konnte aus Stabilitätsgründen nicht in die Methode einbezogen werden. Bereits die Standardlösung von

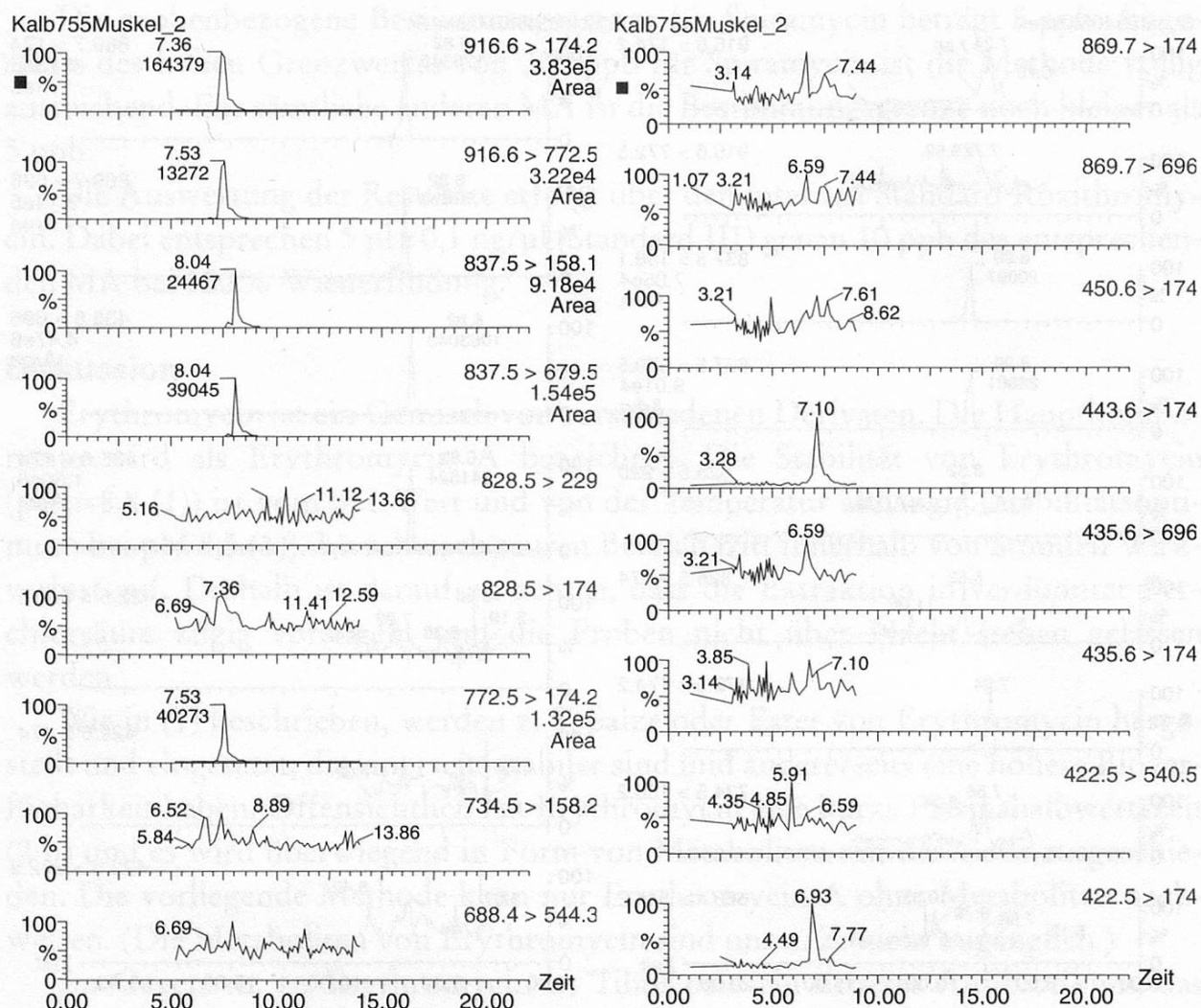


Abbildung 4 Positive Kalbsprobe mit 258 ppb Tylosin

Legende:

(Bezeichnung von oben nach unten):

Tylosin, Tylosin, Roxithromycin,	Tilmicosin, Tilmicosin, Spiramycin III,
Roxithromycin, Josamycin, Josamycin,	Spiramycin II, Tilmicosin, Tilmicosin,
Kitasamycin, Erythromycin, Oleandomycin	Spiramycin, Spiramycin

Troleandomycin war bei 20°C nicht genügend stabil. Diese Instabilität (Hydrolyse) in wässriger Lösung wurde bereits von *Chepkwony et al.* beobachtet (42).

Zur zusätzlichen Bestätigung der MA (ausgenommen Kitasamycin⁸) wird ein zweites Tochterion aufgenommen und die Verhältnisse in Standardlösungen verglichen. Zur Überprüfung der Methode konnten zwei positive Proben analysiert

⁸ Kitasamycin enthält übrigens ein Fragmention von Tylosin. Dies führt im Chromatogramm zu einem Doppelpeak. Die Unterscheidung von Kitasamycin und Tylosin ist aber problemlos über die Retentionszeit möglich.

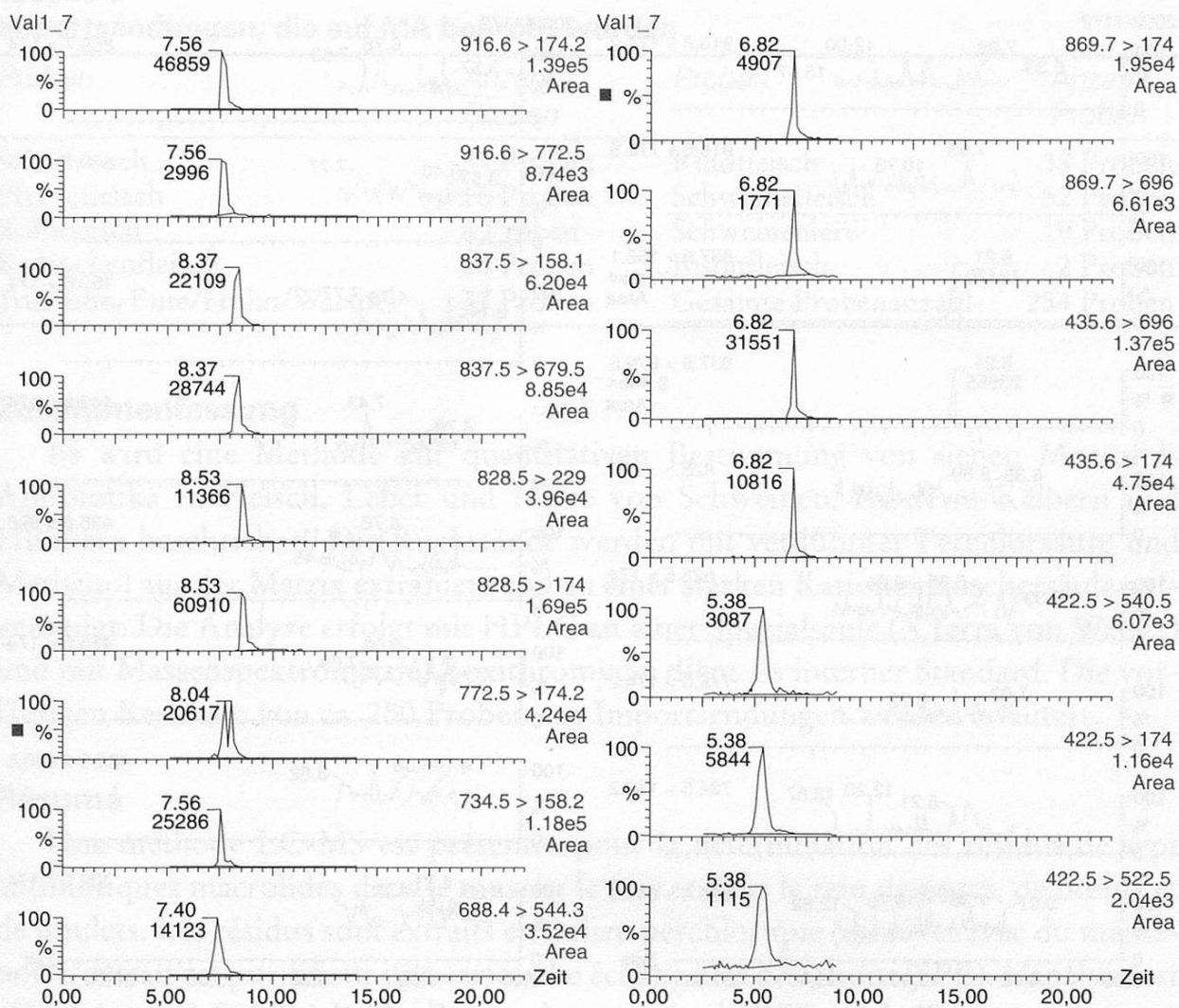


Abbildung 5 «Gespikete» Probe mit 50 ppb

Legende:

(Bezeichnung von oben nach unten):

Tylosin, Tylosin, Roxithromycin,
Roxithromycin, Josamycin, Josamycin,
Kitasamycin, Erythromycin, Oleandomycin

Tilmicosin, Tilmicosin, Tilmicosin,
Tilmicosin, Spiramycin, Spiramycin
Spiramycin

werden, die zu je einem positiven Resultat führten und in der Abbildung 3 (Tilmicosin) bzw. in der Abbildung 4 (Tylosin) dargestellt sind. In der Abbildung 5 ist eine «gespikete» Probe mit 50 ppb der MA dargestellt. Die Abbildung 6 zeigt eine negative Probe mit internem Standard Roxithromycin.

Key words

Macrolide antibiotics, Tylosin, Erythromycin, Spiramycin, MA, MS/MS

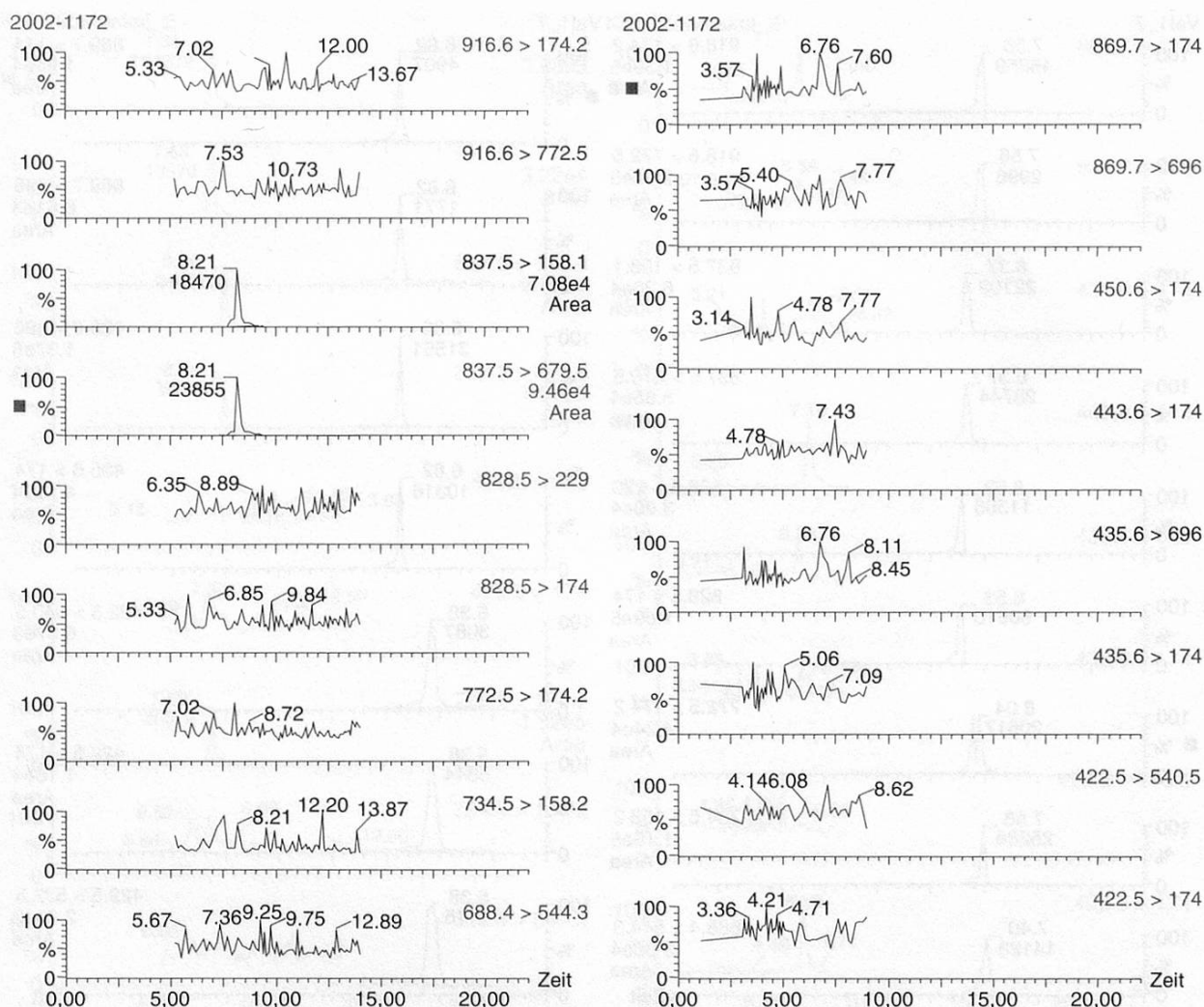


Abbildung 6 Negative Schweinefleischprobe mit Int. Standard Roxithromycin

Legende:

(Bezeichnung von oben nach unten):

Tylosin, Tylosin, Roxithromycin,
Roxithromycin, Josamycin, Josamycin,
Kitasamycin, Erythromycin, Oleandomycin

Tilmicosin, Tilmicosin, Spiramycin III,
Spiramycin II, Tilmicosin, Tilmicosin,
Spiramycin, Spiramycin

Vorläufige Resultate 2001/2002

Im Zeitraum von Oktober 2001 bis Juli 2002 wurden diverse Sendungen von Importfleisch auf MA beprobt. Ausser einer Kalbfleischprobe mit ca. 139 ppb Spiramycin III und einer Kaninchenprobe mit Spuren von Tilmicosin wurden bisher keine Grenzwertüberschreitungen festgestellt (Tabelle 8).

Tabelle 8

Importsendungen, die auf MA beprobt wurden

<i>Proben</i>	<i>Anzahl Proben</i>	<i>Proben</i>	<i>Anzahl Proben</i>
Schafffleisch	34 Proben	Rindfleisch	38 Proben
Pferdefleisch	16 Proben	Schweinefleisch	52 Proben
Kalbfleisch	6 Proben	Schweineniere	19 Proben
Kaninchenfleisch	10 Proben	Bisonfleisch	2 Proben
Truthahn/Ente/Huhn/Wachtel	77 Proben	Gesamte Probenanzahl	254 Proben

Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung von sieben Macrolid-Antibiotika in Fleisch, Leber und Niere von Schweinen, Rindern, Kälbern und Hühnern beschrieben. Die Rückstände werden mit verdünnter Perchlorsäure und Methanol aus der Matrix extrahiert und an einer starken Kationentauschersäule aufgereinigt. Die Analyse erfolgt mit HPLC an einer Spezialsäule (XTerra von Waters) und mit Massenspektrometrie, Roxithromycin dient als interner Standard. Die vorläufigen Resultate von ca. 250 Proben aus Importsendungen werden erläutert.

Résumé

Une méthode LC-MS est présentée pour la détermination des résidus de sept antibiotiques macrolides dans le muscle, le foie et dans le rein de porcs, de bœufs et de poulets. Les résidus sont extraits en milieu perchlorique (dilué) et avec du méthanol. L'extrait est purifié sur une cartouche échangeuse de cations (SPE). L'analyse est effectuée par LC-MS à l'aide d'une colonne spéciale (XTerra de Waters) et avec un détecteur de spectrométrie de masse. La roxithromycine est utilisée comme standard interne. Les premiers résultats d'environ 250 échantillons sont présentés.

Summary "Quantitative Determination of Several Macrolide Antibiotics in Meat, Liver and Kidney by LC-MS/MS after a partly Automated Clean up"

A method is presented for the quantitative determination of seven macrolide antibiotics in meat, liver and kidney from swine, beef and chicken. Residues are extracted from the matrix with diluted perchloric acid and methanol. Further clean up was achieved by solid-phase extraction on a strong cation-exchanger column. The macrolide antibiotics are analysed by LC-MS on a special column (XTerra from Waters). Roxithromycin was used as an internal standard. The first results of about 250 imported meat samples are presented.

Key words

Macrolide antibiotics, Tylosin, Erythromycin, Spiramycin, Meat, LC-MS/MS

Literatur

- 1 Roth, H., Eger, K. und Troschütz, R.: Pharmazeutische Chemie II, Arzneistoffanalyse, 3. Auflage, Seite 175–178. Thieme-Verlag, Stuttgart 1990
Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 4. Auflage, Seite 673–676. Verlag Chemie, Weinheim 1974
Roth, H. und Fenner, H.: Pharmazeutische Chemie III, Arzneistoffe, 1. Auflage, Seite 70–72. Thieme-Verlag, Stuttgart 1988
- 2 Bundesgesetz über die Landwirtschaft, Artikel 160, Absatz 8.
- 3 Verordnung über Fremd- und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln vom 26. Juni 1995, SR 817.21.23. Eidg. Drucksachen und Materialzentrale, Bern 1995.
- 4 Kanfer, I., Skinner, M. and Walker, R.: Analysis of macrolide antibiotics. J. Chromatogr. A **812**, 255–286 (1998).
- 5 Shaikh, B. and Moats, W.A.: Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. J. Chromatogr. **643**, 369–378 (1993).
- 6 Chan, W., Gerhardt, G. and Salisbury, C.: Determination of tylosin and tilmicosin residues in animal tissues by RP HPLC. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **77**, 331–333 (1994)
- 7 Parker, R.M. and Patel, R.K.P.: Determination of tilmicosin in ovine milk using HPLC. Analyst **119**, 2577–2579 (1994)
- 8 Renard, L., Henry, P., Sanders, P., Laurentie, M. and Delmas, J.-M.: Determination of spiramycin and neospiramycin in plasma and milk of lactating cows by reversed-phase HPLC. J. Chromatogr. B **657**, 219–226 (1994)
- 9 Petersen, H.W., Nielsen, M.B., Orntoft, I., Rasmussen, A.S. and Piechnik, V.: Method validation of a new HPLC method for the detection of spiramycin and tylosin in pigs muscle. EuroResidue **III**, 791–794 (1996)
- 10 Keukens, H.J., Tomassen, M.J.H. and Boekestein, A.: Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of spiramycin and tylosin in milk. EuroResidue **III**, 616–619 (1996)
- 11 Ngoh, M.A.: Determination of tilmicosin in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **79**, 652–655 (1996)
- 12 Keng, L.J.-K. and Boison, J.O.: HPLC determination of tylosin in bovine muscle, kidney and liver. J. Liquid Chromatogr. **15**, 2025–2034 (1992)
- 13 Horie, M., Saito, K., Ishii, R., Yoshida, T., Haramaki, Y. and Nakazawa, H.: Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by HPLC. J. Chromatogr. A **812**, 295–302 (1998)
- 14 De Liguoro, M., Anfossi, P., Angeletti, R. and Montesissa, C.: Determination of tylosin residues in pig tissues using HPLC. Analyst **123**, 1279–1282 (1998)
- 15 Stobba-Wiley, C.M., Chang, J.P., Elsbury, D.T., Moran, J.W., Turner, J.M. and Readnour R.S.: Determination of tilmicosin residues in chicken, cattle, swine, and sheep tissues by liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **83**, 837–846 (2000)
- 16 Prats, C., Francesch, R., Arboix, M. and Pérez, B.: Determination of tylosin residues in different animal tissues by HPLC. J. Chromatogr. B **766**, 57–65 (2002)
- 17 Edder, P., Cominoli, A. et Corvi, C.: Dosage HPLC des résidus de spiramycine, tilmicosine et tylosine dans les denrées alimentaires d'origine animale. Mitt. Lebensm. Hyg. **91**, 172–185 (2000)
- 18 Leal, C., Codony, R., Compano, R., Granados, M. and Prat, M.D.: Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography. J. Chromatogr. A **910**, 285–290 (2001)
- 19 Janecek, M., Quilliam, M., Bailey, M. and North, D.: Determination of erythromycin A by liquid chromatography and electrochemical detection, with application to salmon tissue. J. Chromatogr. **619**, 63–69 (1993)

- 20 Hanada, E., Ohtani, H., Kotaki, H., Sawada, Y. and Iga, T.: Determination of erythromycin concentrations in rat plasma and liver by HPLC with amperometric detection. *J. Chromatogr. B* **692**, 478–482 (1997)
- 21 Moran, J.W., Turner, J.M. and Coleman, M.R.: Determination of tilmicosin in bovine and porcine sera by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **80**, 1183 (1997)
- 22 Kees, F., Spangler, S. and Wellenhofer, M.: Determination of macrolides in biological matrices by HPLC with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* **812**, 287–293 (1998)
- 23 Taninaka, C., Ohtani, H., Hanada, E., Kotaki, H., Sato, H. and Iga, T.: Determination of erythromycin, clarithromycin, roxithromycin, and azithromycin in plasma by HPLC with amperometric detection. *J. Chromatogr. B* **738**, 405–411 (2000)
- 24 Petz, M.: Erythromycin-Rückstände in Eiern nach Trinkwassermedikation von Legehennen. *Lebensm. Chem. Gerichtl. Chem.* **42**, 87–88 (1988)
- 25 Zierfels, G. und Petz, M.: Fluorimetrische Bestimmung von Erythromycin-Rückständen in Lebensmitteln tierischer Herkunft nach Derivatisierung mit FMOc und HPLC-Trennung. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **198**, 307–312 (1994)
- 26 Jubel-Gaugain, M., Anger, B. and Laurentie, M.: Multiresidue chromatographic method for the determination of macrolide residues in muscle by HPLC with UV detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **82**, 1046–1053 (1999)
- 27 Edder, P., Coppex, L., Cominoli, A. and Corvi, C.: Analysis of erythromycin and oleanomycin residues in food by HPLC with fluorometric detection. *Food Add. Contam.* **19**, 232–240 (2002)
- 28 Monji, H., Yamaguchi, M., Aoki, I. and Ueno, H.: Highly sensitive HPLC determination method for a new erythromycin derivative, EM523, and its major metabolites in human plasma and urine using post-column tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(III) chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. B* **690**, 305–313 (1997)
- 29 Tsuji, K.: Fluorimetric determination of erythromycin and erythromycin ethylsuccinate in serum by a HPLC post-column, on-stream derivatization and extraction method. *J. Chromatogr.* **158**, 337–348 (1978)
- 30 Delepine, B., Hurtaud, D. and Sanders, P.: Identification of tylosin in bovine muscle at the maximum residue limit level by LC-MS, using a particle beam interface. *Analyst* **119**, 2717–2721 (1994)
- 31 Delépine, B., Hurtaud-Pessel, D. and Sanders, P.: Multiresidue method for confirmation of macrolide antibiotics in bovine muscle by LC-MS. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **79**, 397–404 (1996)
- 32 Draisci, R., Palleschi, L., Ferretti, E., Achene, L. and Cecilia, A.: Confirmatory method for macrolide residues in bovine tissues by micro-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **926**, 97–104 (2001)
- 33 Lim, J.H., Jang, B.S., Lee, R.K., Park, S.C. and Yun, H.I.: Determination of roxithromycin residues in the flounder muscle with electrospray LC-MS. *J. Chromatogr. B* **746**, 219–225 (2000)
- 34 Hamscher, G., Sczesny, S., Abu-Quare, A. and Nau, H.: ESI-LC-MS-MS techniques and HPLC directly coupled to a micro-biological assay for the analysis of tetracyclines and tylosin in environmental samples. *EuroResidue* **IV**, 527–531 (2000)
- 35 Hows, M.E.P., Coldham, N.G. and Sauer, M.J.: Multi-residue analysis of macrolide antibiotics in bovine kidney tissue by LC-MSn. *EuroResidue* **IV**, 581–586 (2000)
- 36 Leal, C., Codony, R., Granados, M., Prat, M.D. and Compano, R.: Multiresidue determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation-mass spectrometry. *EuroResidue* **IV**, 723–727 (2000)
- 37 Dubois, M., Fluchard, D., Sior, E. and Delahaut, Ph.: Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **753**, 189–202 (2001)

- 38 Albrecht, U., Hammer, P. and Heesch W.: Chicken antibody based ELISA for the detection of spiramycin in raw milk. *Milchwiss.* **51**, 209–212 (1996)
- 39 Albrecht, U., Walte, H.-G. and Hammer, P.: Detection of erythromycin in raw milk by an antibody-capture-immunoassay. *Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsber.* **50**, 163–170 (1998)
- 40 Albrecht, U., Hammer, P. and Heesch, W.: Antibody-capture immunoassay for the detection of spiramycin in raw milk. *EuroResidue* **III**, 194–198 (1996)
- 41 European Pharmacopeia, supplement 2001, 1447–1449 (2001)
- 42 Chepkwony, H.K., Roets, E. and Hoogmartens, J.: Liquid chromatography of troleandomycin. *J. Chromatogr. A* **914**, 53–58 (2001)

Korrespondenzadresse (ab 1.9.02): Dr. Dominik Guggisberg, Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld, CH-3003 Bern