

Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V – Bestimmung von ausgewählten Antibiotika in Urin mittels LC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

Keywords

Antibiotika; Ciprofloxacin; Enrofloxacin; Lincomycin; Penicillin G; Penicillin V; Biomonitoring; Urin; LC-MS/MS

S. Gerling¹

K. Blümlein¹

M. Berger²

J. Neuhoff²

T. Göen^{3,*}

A. Hartwig^{4,*}

MAK Commission^{5,*}

- ¹ Methodenentwicklung, Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Arbeitsgruppe Bio- und Umweltanalytik, Nikolai-Fuchs-Straße 1, 30625 Hannover
- ² Methodenprüfung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA), Fachbereich 4 Gefahrstoffe und biologische Arbeitsstoffe, Nöldnerstraße 40–42, 10317 Berlin
- ³ Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen
- ⁴ Vorsitz der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe
- ⁵ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

* E-Mail: T. Göen (thomas.goeen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Citation Note:

Gerling S, Blümlein K, Berger M, Neuhoff J, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V – Bestimmung von ausgewählten Antibiotika in Urin mittels LC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2022 Dez;7(4):Doc085. https://doi.org/10.34865/bi9310660d7_4or

Manuskript abgeschlossen:
11 Apr 2019

Publikationsdatum:
19 Dez 2022

Lizenz: Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area developed and verified the presented biomonitoring method. This method allows for the sensitive and precise determination of selected antibiotics (ciprofloxacin, enrofloxacin, lincomycin, penicillin G, and penicillin V) in human urine. Sample preparation includes extracting the analytes by solid-phase extraction on Oasis HLB cartridges, followed by concentrating the eluates under a stream of nitrogen. The analytes are separated from matrix compounds by liquid chromatography and subsequently detected with tandem mass spectrometry using electrospray ionisation. Quantitative evaluation is carried out via external calibration in urine.

The good precision data and accuracy data show that the method provides reliable and accurate measurement values. Any matrix effects are effectively compensated for by the use of isotope-labelled internal standards. This finding holds similarly true for ciprofloxacin, for which isotope-labelled enrofloxacin was used as internal standard (ISTD). With quantitation limits of 0.1 µg/l for ciprofloxacin, enrofloxacin, and lincomycin as well as 0.3 µg/l for penicillin G and penicillin V, this method is very sensitive and enables the reliable quantitation of occupational exposure to the selected antibiotics.

1 Kenndaten der Methode

Matrix	Urin		
Analytisches Messprinzip	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)		
Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe			
Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Ciprofloxacin	85721-33-1	Ciprofloxacin	85721-33-1
Enrofloxacin	93106-60-6	Enrofloxacin	93106-60-6
		Ciprofloxacin	85721-33-1
Lincomycin	154-21-2	Lincomycin	154-21-2
Penicillin G	61-33-6	Penicillin G	61-33-6
Penicillin V	87-08-1	Penicillin V	87-08-1

Zuverlässigkeitskriterien

Ciprofloxacin

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 5,43-6,98\%$ bzw. $3,25-15,8\%$
	Streubereich	$u = 15,1-19,4\%$ bzw. $9,02-43,9\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $0,15\ \mu\text{g}$ bzw. $0,55\ \mu\text{g}$ Ciprofloxacin pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,62\%$ bzw. $14,3\%$
	Streubereich	$u = 32,8\%$ bzw. $61,5\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $0,15\ \mu\text{g}$ bzw. $0,55\ \mu\text{g}$ Ciprofloxacin pro Liter Urin und $n = 3$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Mittlere Richtigkeit (rel.)	$r = 90,8-106\%$ bzw. $88,9-116\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $0,15\ \mu\text{g}$ bzw. $0,55\ \mu\text{g}$ Ciprofloxacin pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	$0,038\ \mu\text{g}$ Ciprofloxacin pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze (theoretisch):	$0,064\ \mu\text{g}$ Ciprofloxacin pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze (angewendet):	$0,1\ \mu\text{g}$ Ciprofloxacin pro Liter Urin	

Enrofloxacin

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 10,8-20,4\%$ bzw. $3,67-10,1\%$
	Streubereich	$u = 30,0-56,6\%$ bzw. $10,2-28,0\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $0,15\ \mu\text{g}$ bzw. $0,55\ \mu\text{g}$ Enrofloxacin pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 9,87\%$ bzw. $3,33\%$
	Streubereich	$u = 31,4\%$ bzw. $10,6\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $0,15\ \mu\text{g}$ bzw. $0,55\ \mu\text{g}$ Enrofloxacin pro Liter Urin und $n = 4$ Bestimmungen	

Richtigkeit:	Mittlere Richtigkeit (rel.)	$r = 76,0\text{--}99,1\%$ bzw. $98,0\text{--}106\%$ bei einer dotierten Konzentration von $0,15\ \mu\text{g}$ bzw. $0,55\ \mu\text{g}$ Enrofloxacin pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen
Nachweisgrenze:		$0,043\ \mu\text{g}$ Enrofloxacin pro Liter Urin
Bestimmungsgrenze (theoretisch):		$0,072\ \mu\text{g}$ Enrofloxacin pro Liter Urin
Bestimmungsgrenze (angewendet):		$0,1\ \mu\text{g}$ Enrofloxacin pro Liter Urin

Lincomycin

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 5,44\text{--}9,65\%$ bzw. $1,89\text{--}15,0\%$
	Streubereich	$u = 15,1\text{--}26,8\%$ bzw. $5,25\text{--}41,6\%$ bei einer dotierten Konzentration von $0,15\ \mu\text{g}$ bzw. $0,55\ \mu\text{g}$ Lincomycin pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 11,8\%$ bzw. $4,24\%$
	Streubereich	$u = 50,8\%$ bzw. $18,2\%$ bei einer dotierten Konzentration von $0,15\ \mu\text{g}$ bzw. $0,55\ \mu\text{g}$ Lincomycin pro Liter Urin und $n = 3$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Mittlere Richtigkeit (rel.)	$r = 90,3\text{--}113\%$ bzw. $96,3\text{--}105\%$ bei einer dotierten Konzentration von $0,15\ \mu\text{g}$ bzw. $0,55\ \mu\text{g}$ Lincomycin pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen
Nachweisgrenze:		$0,0015\ \mu\text{g}$ Lincomycin pro Liter Urin
Bestimmungsgrenze (theoretisch):		$0,0035\ \mu\text{g}$ Lincomycin pro Liter Urin
Bestimmungsgrenze (angewendet):		$0,1\ \mu\text{g}$ Lincomycin pro Liter Urin

Penicillin G

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 2,40\text{--}4,15\%$ bzw. $1,00\text{--}6,27\%$
	Streubereich	$u = 6,66\text{--}11,5\%$ bzw. $2,78\text{--}17,4\%$ bei einer dotierten Konzentration von $0,25\ \mu\text{g}$ bzw. $1,00\ \mu\text{g}$ Penicillin G pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,19\%$ bzw. $6,50\%$
	Streubereich	$u = 18,0\%$ bzw. $28,0\%$ bei einer dotierten Konzentration von $0,25\ \mu\text{g}$ bzw. $1,00\ \mu\text{g}$ Penicillin G pro Liter Urin und $n = 3$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Mittlere Richtigkeit (rel.)	$r = 99,4\text{--}108\%$ bzw. $90,0\text{--}102\%$ bei einer dotierten Konzentration von $0,25\ \mu\text{g}$ bzw. $1,00\ \mu\text{g}$ Penicillin G pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen
Nachweisgrenze:		$0,0036\ \mu\text{g}$ Penicillin G pro Liter Urin
Bestimmungsgrenze (theoretisch):		$0,0081\ \mu\text{g}$ Penicillin G pro Liter Urin
Bestimmungsgrenze (angewendet):		$0,1\ \mu\text{g}$ Penicillin G pro Liter Urin

Penicillin V

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,50 µg bzw. 2,50 µg Penicillin V pro Liter Urin und n = 5 Bestimmungen	$s_w = 1,99\text{--}5,46\%$ bzw. $2,52\text{--}7,31\%$ $u = 5,52\text{--}15,2\%$ bzw. $7,00\text{--}20,3\%$
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,50 µg bzw. 2,50 µg Penicillin V pro Liter Urin und n = 3 Bestimmungen	$s_w = 7,59\%$ bzw. $7,76\%$ $u = 32,7\%$ bzw. $33,4\%$
Richtigkeit:	Mittlere Richtigkeit (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,50 µg bzw. 2,50 µg Penicillin V pro Liter Urin und n = 5 Bestimmungen	$r = 87,0\text{--}99,7\%$ bzw. $90,5\text{--}106\%$
Nachweisgrenze:	0,031 µg Penicillin V pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze (theoretisch):	0,071 µg Penicillin V pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze (angewendet):	0,3 µg Penicillin V pro Liter Urin	

2 Allgemeine Informationen zu den ausgewählten Antibiotika

Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V werden als gängige Antibiotika in der Geflügelmast eingesetzt (Paul et al. 2019), wobei die Verabreichung dieser Antibiotika für gewöhnlich über das Trinkwasser erfolgt. Die Strukturformeln von Enrofloxacin (inkl. seines Hauptmetaboliten Ciprofloxacin), Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V sind in [Abbildung 1](#) dargestellt. Eine berufliche Exposition ist sowohl bei der Isolierung bzw. Herstellung der Wirkstoffe, bei der Zubereitung und der Verpackung der Medikamente sowie bei der Verwendung im human- und tiermedizinischen Bereich möglich. In der Geflügelmast kann es sowohl bei der Zubereitung des Trinkwassers während einer Antibiotikabehandlung als auch durch Einatmen des kontaminierten Stallstaubs zu einer beruflichen Exposition kommen. Die systemische Antibiotikabelastung der Beschäftigten kann durch Biomonitoring erfasst werden.

Enrofloxacin war das erste synthetische Breitbandantibiotikum aus der Klasse der Fluorchinolone, das in der Veterinärmedizin eingesetzt wurde. Fluorchinolone unterbinden die DNA-Replikation in Bakterien durch Interaktion mit den bakteriellen DNA-Topoisomerasen II und IV (Trouchon und Lefebvre 2016; Wolfson und Hooper 1989). Enrofloxacin wurde im Jahr 1991 erstmals durch die Bayer AG unter dem Namen Baytril® für die orale Anwendung bei Geflügel auf den Markt gebracht und wird aktuell oral oder intravenös zur Behandlung von Haus- und Nutztieren eingesetzt.

Enrofloxacin wird abhängig von Verabreichungsform und Rezipient größtenteils zu dem ebenfalls antibakteriell wirksamen Hauptmetaboliten Ciprofloxacin umgesetzt. Beide Substanzen werden u. a. über den Urin ausgeschieden. Ciprofloxacin selbst, das ebenfalls zur Klasse der Fluorchinolone gehört, wird als Antibiotikum in der Humanmedizin eingesetzt.

Basierend auf der antibakteriellen Aktivität und dem damit einhergehenden Risiko für die menschliche Gesundheit bei Aufnahme von Enrofloxacin, beispielsweise durch Nahrungsmittel, wurde eine zulässige tägliche Aufnahmemenge (engl. ADI, *Acceptable Daily Intake*) von 0–2 µg/kg Körpergewicht pro Tag (WHO 1998) bzw. von 6,2 µg/kg Körpergewicht pro Tag (EMA 2002) festgelegt. Die Eliminationshalbwertszeit von Enrofloxacin beträgt ca. 2–4 Stunden (Paul et al. 2019).

Lincomycin ist ein Antibiotikum aus der Klasse der Lincosamide und wird in Deutschland ausschließlich in der Veterinärmedizin eingesetzt. Lincomycin wird hauptsächlich gegen anaerobe grampositive und gramnegative Bakterien eingesetzt. Die Wirkung beruht auf Inhibierung der bakteriellen Proteinsynthese (Spížek und Řezanka 2004). Die zulässige tägliche Aufnahmemenge für Lincomycin, das beispielsweise über Nahrungsmittel aufgenommen werden

kann, wurde auf 0–30 µg/kg Körpergewicht festgelegt (WHO 2004). Die Eliminationshalbwertszeit von Lincomycin beträgt ca. 2–4 Stunden (Paul et al. 2019).

Penicillin G war das erste Penicillin, das im Jahr 1943 in großem Maßstab produziert und eingesetzt wurde. Während Penicillin G durch Fermentierung gewonnen wurde, konnte kurze Zeit später, im Jahr 1957, Penicillin V als erstes Penicillin auf synthetischem Weg hergestellt werden (Arnaud 2005; Gaynes 2017).

Penicillin V und Penicillin G werden insbesondere gegen grampositive Bakterien eingesetzt. Ihre Wirkung beruht darauf, den Aufbau der bakteriellen Zellwand zu stören. Für beide Penicilline gilt die Empfehlung, dass die tägliche Aufnahmemenge jeweils unter 30 µg bleiben sollte (EMA 1999). Die Eliminationshalbwertszeit von Penicillin V und Penicillin G ist geringer als 1 Stunde (Brodthorn und Smollich 2013).

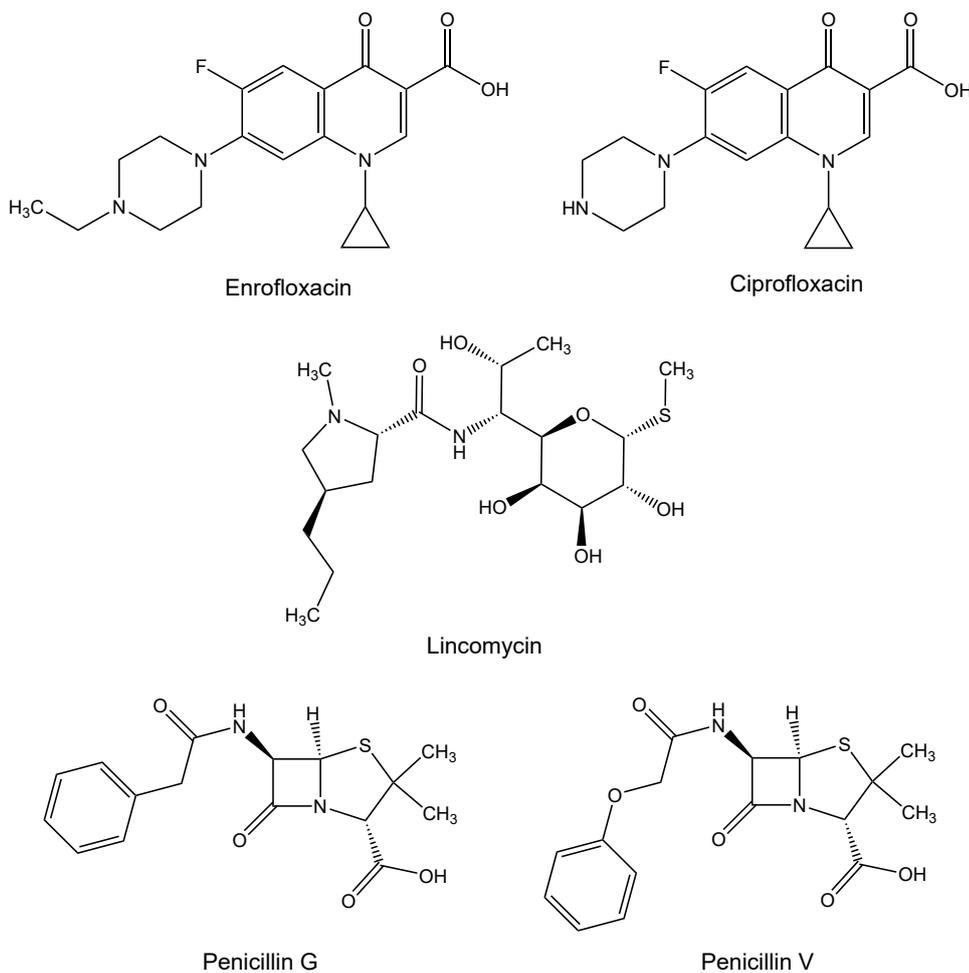


Abb. 1 Strukturformeln von Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V

Die im Folgenden beschriebene Methode wurde zur Erfassung einer beruflichen Belastung mit Veterinärantibiotika in der Geflügelzucht eingesetzt. Die Ausscheidung der einzelnen Antibiotika mit dem Urin innerhalb von 24 Stunden betrug 0,23 bis 18,4 µg/24 h (Summe aus Enrofloxacin und Ciprofloxacin; n = 4), 0,80 bis 1,9 µg/24 h (Lincomycin; n = 2) sowie 0,44 bis 14,4 µg/24 h (Penicillin V; n = 2) (Paul et al. 2019).

3 Grundlage des Verfahrens

Ausgewählte Antibiotika (Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V) werden in humanem Urin bestimmt. Die Probenaufbereitung umfasst die Extraktion der Analyten mittels Festphasenextraktion, gefolgt von einer Aufkonzentrierung der Eluate im Stickstoffstrom. Die Analyten werden mittels Flüssigkeitschromatographie von Begleitkomponenten getrennt und anschließend mittels Tandem-Massenspektrometrie unter Verwendung von Elektrospray-Ionisierung detektiert. Die quantitative Auswertung erfolgt mittels externer Kalibrierung in Urin.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- HPLC-System (z. B. Agilent 1260) bestehend aus einem Degasser, einer binären Pumpe, einem Autosampler, einem Thermostat und einem Säulenofen (TCC) (z. B. Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Tandem-Massenspektrometer (z. B. QTRAP 5500, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt)
- HPLC-Säule: Kinetex C18 (2,6 µm; 50 × 2,1 mm) (z. B. Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)
- Vorrichtung für die Festphasenextraktion (z. B. VisiPrep™ SPE-Vakuumverteiler, Merck KGaA, Darmstadt)
- Abblasstation (z. B. TurboVap® LV, Biotage Sweden AB, Uppsala, Schweden)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- pH-Meter (z. B. Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Vortexmischer (z. B. Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH + Co. KG, Schwabach)
- SPE-Kartuschen (Oasis HLB, 6 ml, 150 mg) (z. B. Waters GmbH, Eschborn)
- Spritzenfilter mit Membran aus regenerierter Cellulose (ø 13 mm, 0,45 µm) (z. B. MULTOCLEAR-13, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe)
- 60-ml-SPE-Kartuschen aus Polypropylen mit 20-µm-Fritten aus Polyethylen (z. B. Supelco, Merck KGaA, Darmstadt)
- 15-ml-Polypropylen-Röhrchen (z. B. Kuhnle GmbH, Karlsruhe)
- 1,5-ml-Polypropylen-Vials (z. B. CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe)
- Schraubkappen (z. B. CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe)
- Verschiedene Messkolben (z. B. witeg Labortechnik GmbH, Wertheim)
- Verschiedene Bechergläser (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- Verschiedene Pipetten und Multipipetten® mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Urinbecher (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

4.2 Chemikalien

- Acetonitril, LC-MS Reinheit (z. B. Nr. 9821, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen)
- Ameisensäure, 98–100 % (z. B. Nr. 5.33002, Merck KGaA, Darmstadt)
- Ciprofloxacin (z. B. Nr. 17850, Merck KGaA, Darmstadt)
- Dichlormethan für HPLC (z. B. Nr. 34856, Merck KGaA, Darmstadt)
- Enrofloxacin (z. B. Nr. 17849, Merck KGaA, Darmstadt)
- Enrofloxacin-d₅ Hydrochlorid (z. B. Nr. CH005, WITEGA Laboratorien Berlin-Adlershof GmbH, Berlin)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat (z. B. Nr. E4884, Merck KGaA, Darmstadt)

- Hochreines Wasser, LC-MS Reinheit (z. B. Nr. 9825, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen)
- Isopropanol für die Flüssigkeitschromatographie (z. B. Nr. R34965-1L, Honeywell International Inc., Morristown, USA)
- Lincomycin (z. B. Nr. L0650000, Merck KGaA, Darmstadt)
- Lincomycin-d₃ (z. B. Nr. L466202, Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada)
- Methanol, LC-MS Reinheit (z. B. Nr. 34860, Merck KGaA, Darmstadt)
- Penicillin G Kaliumsalz (z. B. Nr. 46609, Merck KGaA, Darmstadt)
- Penicillin G-d₇ N-Ethylpiperidiniumsalz (z. B. Nr. 32985, Merck KGaA, Darmstadt)
- Penicillin V Kaliumsalz (z. B. Nr. 46616, Merck KGaA, Darmstadt)
- Penicillin V-d₅ (z. B. Nr. P223502, Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada)
- 1 mol/l Salzsäure (z. B. Nr. 109970, Merck KGaA, Darmstadt)

4.3 Lösungen

- EDTA-Lösung (0,05 g/l)
In einen 1000-ml-Messkolben werden 50 mg EDTA eingewogen und in 900 ml hochreinem Wasser gelöst. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Wasser (pH = 4,0)
In einem 1000-ml-Becherglas wird ein Liter hochreines Wasser mit 1 mol/l Salzsäure auf pH = 4,0 eingestellt. Das angesäuerte Wasser wird in einer Laborstandflasche aufbewahrt.
- 2 % Methanol (V/V)
In einem 100-ml-Messkolben werden 2 ml Methanol vorgelegt. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Methanol:Wasser (10 : 90, V/V)
In einem 500-ml-Messkolben werden 50 ml Methanol vorgelegt. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Methanol:Wasser (50 : 50, V/V)
In einem 500-ml-Messkolben werden 250 ml Methanol vorgelegt. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Acetonitril:Wasser (10 : 90, V/V)
In einem 500-ml-Messkolben werden 50 ml Acetonitril vorgelegt. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Mobile Phase A (0,1% Ameisensäure in Wasser)
In einen 2-l-Messkolben werden 2 ml Ameisensäure pipettiert. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Mobile Phase B (0,1% Ameisensäure in Methanol)
In einen 2-l-Messkolben werden 2 ml Ameisensäure pipettiert. Der Messkolben wird anschließend mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.

- Spüllösung für die Nadel (Acetonitril: Methanol: Isopropanol: 0,1% Ameisensäure in Wasser (1:1:1:1; V/V/V/V))
In einem 1000-ml-Messkolben werden 250 ml Acetonitril, 250 ml Methanol und 250 ml Isopropanol vorgelegt. Der Messkolben wird anschließend mit 0,1%iger Ameisensäure in Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

4.4 Interne Standards (ISTDs)

- ISTD-Stammlösungen (1000 mg/l)
Die ISTD-Stammlösungen werden als Einzelstandards angesetzt. Dazu werden 10 mg des jeweiligen deuterierten Standards in einen 10-ml-Messkolben eingewogen und in Methanol: Wasser (50:50; V/V) gelöst. Die Messkolben werden jeweils mit Methanol: Wasser (50:50; V/V) bis zur Markierung aufgefüllt und die Lösungen durchmischt.
Zur Verbesserung der Löslichkeit des deuterierten Standards des Enrofloxacin können gegebenenfalls 100 µl 1 mol/l HCl zugegeben werden.
Die Stammlösungen werden in 15-ml-Polypropylen-Röhrchen umgefüllt und bei -20 °C gelagert.
- ISTD-Arbeitslösungen I (10 mg/l)
Die ISTD-Arbeitslösungen I werden als Einzelstandards angesetzt. Dazu werden 100 µl der jeweiligen Stammlösung in 10-ml-Messkolben pipettiert. Die Messkolben werden jeweils mit Methanol: Wasser (10:90; V/V) bis zur Markierung aufgefüllt.
Die ISTD-Arbeitslösungen I werden in 15-ml-Polypropylen-Röhrchen umgefüllt und bei -20 °C gelagert.
- ISTD-Arbeitslösung II (Enrofloxacin-d₅ und Lincomycin-d₃; 1 mg/l)
Für die ISTD-Arbeitslösung II werden jeweils 100 µl der ISTD-Arbeitslösungen I von Enrofloxacin-d₅ und Lincomycin-d₃ in einem 1,5-ml-Vial mit 800 µl Methanol: Wasser (10:90; V/V) versetzt.
Die ISTD-Arbeitslösung II für Enrofloxacin-d₅ und Lincomycin-d₃ wird im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösungen (1000 mg/l)
Die Stammlösungen werden als Einzelstandards angesetzt. Dazu werden 10 mg der Reinsubstanz des jeweiligen Analyten in einen 10-ml-Messkolben eingewogen und in Methanol: Wasser (50:50; V/V) gelöst. Die Messkolben werden jeweils mit Methanol: Wasser (50:50; V/V) bis zur Markierung aufgefüllt und die Lösungen durchmischt.
Bei Enrofloxacin und Ciprofloxacin können zur Verbesserung der Löslichkeit der Reinsubstanzen gegebenenfalls 100 µl 1 mol/l HCl zugegeben werden.
Die Stammlösungen werden in 15-ml-Polypropylen-Röhrchen umgefüllt und bei -20 °C gelagert.
- Arbeitslösungen I (10 mg/l)
Die Arbeitslösungen I werden als Einzelstandards angesetzt. Dazu werden 100 µl der jeweiligen Stammlösung in 10-ml-Messkolben pipettiert und die Messkolben im Falle von Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Lincomycin mit Methanol: Wasser (10:90; V/V), im Falle von Penicillin G und Penicillin V mit Acetonitril: Wasser (10:90; V/V) bis zur Markierung aufgefüllt.
Die Arbeitslösungen I werden in 15-ml-Polypropylen-Röhrchen umgefüllt und bei -20 °C gelagert.
- Arbeitslösung II für Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Lincomycin (1 mg/l)
Für die Arbeitslösung II (Multisubstanzstandard für Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Lincomycin) werden jeweils 100 µl der Arbeitslösungen I von Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Lincomycin in einem 1,5-ml-Vial mit 700 µl Methanol: Wasser (10:90; V/V) versetzt.

Die Arbeitslösung II für Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Lincomycin wird im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

- Arbeitslösungen II für Penicillin G bzw. Penicillin V (1 mg/l)

Für die Arbeitslösungen II (Einzelsubstanzstandards für Penicillin G bzw. Penicillin V) werden jeweils 100 µl der Arbeitslösungen I von Penicillin G bzw. Penicillin V in 1,5-ml-Vials mit jeweils 900 µl Acetonitril : Wasser (10 : 90; V/V) versetzt.

Die Arbeitslösungen II für Penicillin G bzw. Penicillin V werden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Kalibrierstandards werden nach den in den Tabellen 1–3 angegebenen Pipettierschemata hergestellt, indem Poolurin mit entsprechenden Volumina der Arbeitslösungen dotiert wird. Die so angesetzten Kalibrierstandards werden wie unter Abschnitt 5 beschrieben aufgearbeitet. In den Tabellen ist auch das Pipettierschema für die jeweiligen Qualitätskontrollproben (siehe Abschnitt 10) angegeben.

Tab. 1 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Lincomycin in Urin

Kalibrierstandard	Arbeitslösung I [µl]	Arbeitslösung II [µl]	ISTD-Arbeitslösung II [µl]	Poolurin [ml]	Analytkonzentration [µg/l]
00	–	–	–		0,00
0	–	–	50		0,00
1	–	10	50		0,10
2	–	20	50		0,20
3	–	30	50		0,30
4	–	40	50	ad 100	0,40
5	–	50	50		0,50
6	–	60	50		0,60
7	10	–	50		1,00
Q _{low}	–	15	50		0,15
Q _{high}	–	55	50		0,55

Tab. 2 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von Penicillin G in Urin

Kalibrierstandard	Arbeitslösung I [µl]	Arbeitslösung II [µl]	ISTD-Arbeitslösung I [µl]	Poolurin [ml]	Analytkonzentration [µg/l]
00	–	–	–		0,00
0	–	–	10		0,00
1	–	10	10		0,10
2	–	25	10		0,25
3	–	50	10		0,50
4	10	–	10	ad 100	1,00
5	20	–	10		2,00
6	30	–	10		3,00
Q _{low}	–	25	10		0,25
Q _{high}	10	–	10		1,00

Tab. 3 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von Penicillin V in Urin

Kalibrierstandard	Arbeitslösung I [µl]	Arbeitslösung II [µl]	ISTD-Arbeitslösung I [µl]	Poolurin [ml]	Analytkonzentration [µg/l]
00	–	–	–		0,00
0	–	–	10		0,00
1	–	30	10		0,30
2	–	50	10		0,50
3	10	–	10	ad 100	1,00
4	20	–	10		2,00
5	30	–	10		3,00
6	40	–	10		4,00
Q _{low}	–	50	10		0,50
Q _{high}	25	–	10		2,50

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in verschließbaren Kunststoffgefäßen gesammelt und bis zur Analyse bei –20 °C gelagert. Vor der Analyse werden die Proben auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt.

5.2 Probenaufbereitung

100 ml der Urinproben werden mit 2 ml EDTA-Lösung versetzt. Anschließend werden 50 µl der ISTD-Arbeitslösung II (Enrofloxacin-d₅ und Lincomycin-d₃) und je 10 µl der ISTD-Arbeitslösungen I (Penicillin G-d₇ sowie Penicillin V-d₅) zugegeben.

Die Aufreinigung der Urinproben erfolgt durch Festphasenextraktion (solid-phase extraction, SPE) unter Verwendung von Oasis HLB Kartuschen. Die Kartuschen werden mit 5 ml Methanol und anschließend mit 5 ml Wasser (pH = 4,0) konditioniert. Auf die SPE-Kartuschen werden 60-ml-Leer-Kartuschen mit 20 µm Fritte gesetzt, in die die Proben überführt und durch Anlegen von Vakuum auf die SPE-Kartuschen gegeben werden (ca. 4 ml/min). Nach dem Durchlaufen der Probe werden die SPE-Kartuschen mit 2 ml 2%igem Methanol gewaschen und 5 min unter Vakuum getrocknet. Die Analyten und ISTDs werden mit zweimal 5 ml Methanol von den SPE-Kartuschen eluiert und die Eluate in 15-ml-Polypropylengefäßen aufgefangen.

Zu den Eluaten werden jeweils 200 µl hochreines Wasser gegeben. Anschließend werden die Eluate bei 50 °C im Stickstoffstrom auf 200 µl eingengt.

Für die Bestimmung von Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Lincomycin werden von den eingengten Eluaten 100 µl abgenommen und diese mit 400 µl Methanol:Wasser (10:90; V/V) versetzt. Für die Bestimmung von Penicillin V werden zu den verbliebenen 100 µl des eingengten Eluats 400 µl Acetonitril:Wasser (10:90; V/V) gegeben. Soll stattdessen Penicillin G bestimmt werden, werden zu den verbliebenen 100 µl des eingengten Eluats 400 µl hochreines Wasser gegeben.

Die so erhaltenen Messlösungen werden für 20 Sekunden auf dem Vortex-Mischer gemischt und anschließend über einen Spritzenfilter (0,2 µm) in ein Polypropylen-HPLC-Vial filtriert.

Die Prüfer der Methode haben zu den verbliebenen 100 µl des eingengten Eluats 400 µl Acetonitril:Wasser (10:90; V/V) gegeben und in dieser Lösung die beiden Penicilline erfolgreich parallel bestimmt.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgte an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einer LC-Anlage mit Tandem-Massenspektrometer (LC-MS/MS).

6.1 Flüssigkeitschromatographie

Analytische Säule:	Kinetex Core Shell C18; 2,6 µm; 50 × 2,1 mm
Säulentemperatur:	40 °C, isotherm
Injektionsvolumen:	10 µl
Autosamplertemperatur:	7 °C, gekühlt
Nadelspülung:	Acetonitril: Methanol: Isopropanol: 0,1 % Ameisensäure in Wasser (1 : 1 : 1 : 1; V/V/V/V)
Mobile Phase:	A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser B: 0,1 % Ameisensäure in Methanol
Flussrate:	500 µl/min
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle 4

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

Tab. 4 Gradientenprogramm für die Bestimmung von Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V in Urin

Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
0,00	98	2
0,30	98	2
7,27	20	80
7,37	1	99
8,28	1	99
9,00	98	2
13,00	98	2

6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Quelle:	Turbo Spray
Ionisierung:	Elektrosprayionisierung (ESI)
Modus:	Positiv
Quellentemperatur:	450 °C
Detektionsmodus:	Scheduled MRM
Target-Scan-Zeit:	0,4 s
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 5

Die gerätespezifischen Parameter müssen vom Anwender individuell für das eingesetzte MS/MS-System ermittelt und eingestellt werden. Die in diesem Abschnitt genannten gerätespezifischen Parameter wurden für das bei der Methodenentwicklung verwendete System bestimmt und optimiert.

Tab. 5 Parameterspezifische Einstellungen und Retentionszeiten für die Bestimmung von Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V in Urin

Analyt/ISTD	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	Retentionszeit [min]	DP [V]	CE [eV]	CXP [V]
Ciprofloxacin	332,0	314,0	4,98	70	23	13
	332,0	288,0	4,98	70	20	13
Enrofloxacin	360,0	342,0	5,04	70	30	30
	360,0	316,0	5,04	70	30	30
Enrofloxacin-d ₅	365,0	347,0	5,04	70	30	30
	365,0	321,0	5,04	70	30	30
Lincomycin	407,5	125,5	4,06	90	25	25
	407,5	359,0	4,06	90	25	25
Lincomycin-d ₃	410,0	128,6	4,06	90	32	25
	410,0	362,0	4,06	90	32	25
Penicillin G	333,0	192,0	6,93	-13	-14	-15
	333,0	289,0	6,93	-19	-10	-7,5
Penicillin G-d ₇	340,0	199,0	6,93	-25	-17	-15
	340,0	296,0	6,93	-25	-12	-28
Penicillin V	350,9	159,8	7,41	15	20	20
	350,9	113,8	7,41	15	20	20
Penicillin V-d ₅	355,9	159,8	7,41	15	20	20
	355,9	113,8	7,41	15	20	20

7 Analytische Bestimmung

Von den gemäß [Abschnitt 5](#) aufgearbeiteten Proben werden jeweils 10 µl in das LC-MS/MS-System injiziert. Die Identifizierung der Analyten erfolgt anhand der spezifischen Ionen bzw. Ionenübergänge und der Retentionszeiten (siehe [Tabelle 5](#)). Die in [Tabelle 5](#) angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen. Chromatogramme der jeweils kleinsten Kalibrierstandards sowie eines Urinleerwertes sind exemplarisch in [Abbildung 2](#) dargestellt.

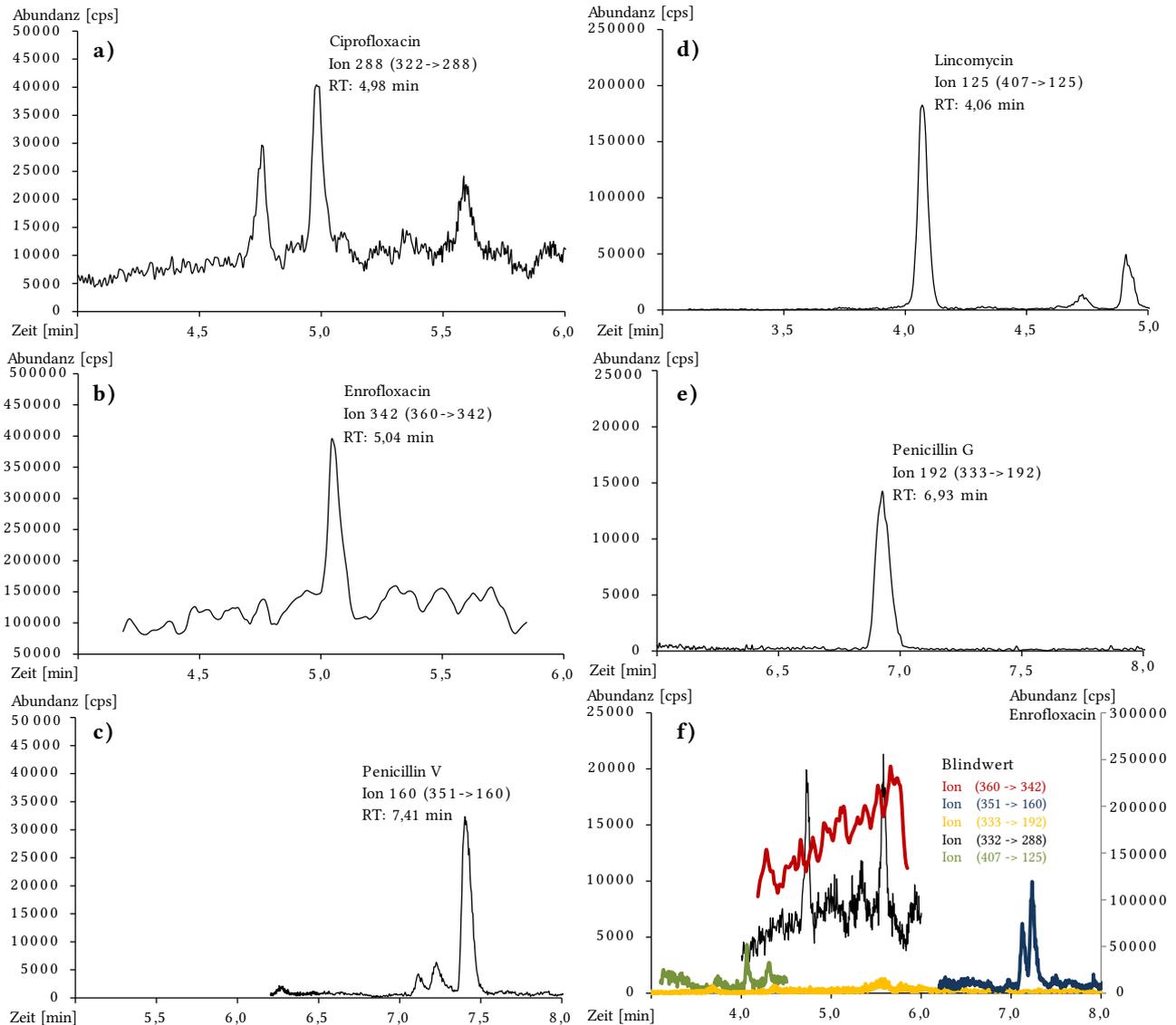


Abb.2 Chromatogramme der jeweils kleinsten Kalibrierstandards: mit a) Ciprofloxacin (0,1 µg/l), b) Enrofloxacin (0,1 µg/l), c) Penicillin V (0,3 µg/l), d) Lincomycin (0,1 µg/l) und e) Penicillin G (0,3 µg/l) dotierter Urin; Chromatogramm f) zeigt die jeweiligen MRM-Spuren (Quantifier) in einer undotierten Urinprobe (Urinleerwert)

8 Kalibrierung

Die Kalibrierstandards werden wie unter [Abschnitt 4.5](#) beschrieben hergestellt, analog zu den Urinproben aufgearbeitet (siehe [Abschnitt 5.2](#)) und analysiert. Die Kalibriergerade wird durch Auftragen des Peakflächenverhältnisses von Analyt zu deuteriertem ISTD gegen die dotierte Konzentration erstellt. Für Ciprofloxacin wird Enrofloxacin-d₅ als ISTD herangezogen. Die Kalibriergeraden waren in den in [Tabelle 6](#) angegebenen Konzentrationsbereichen linear. Beispielhafte Kalibriergeraden sind in [Abbildung 3.1](#) und [3.2](#) dargestellt.

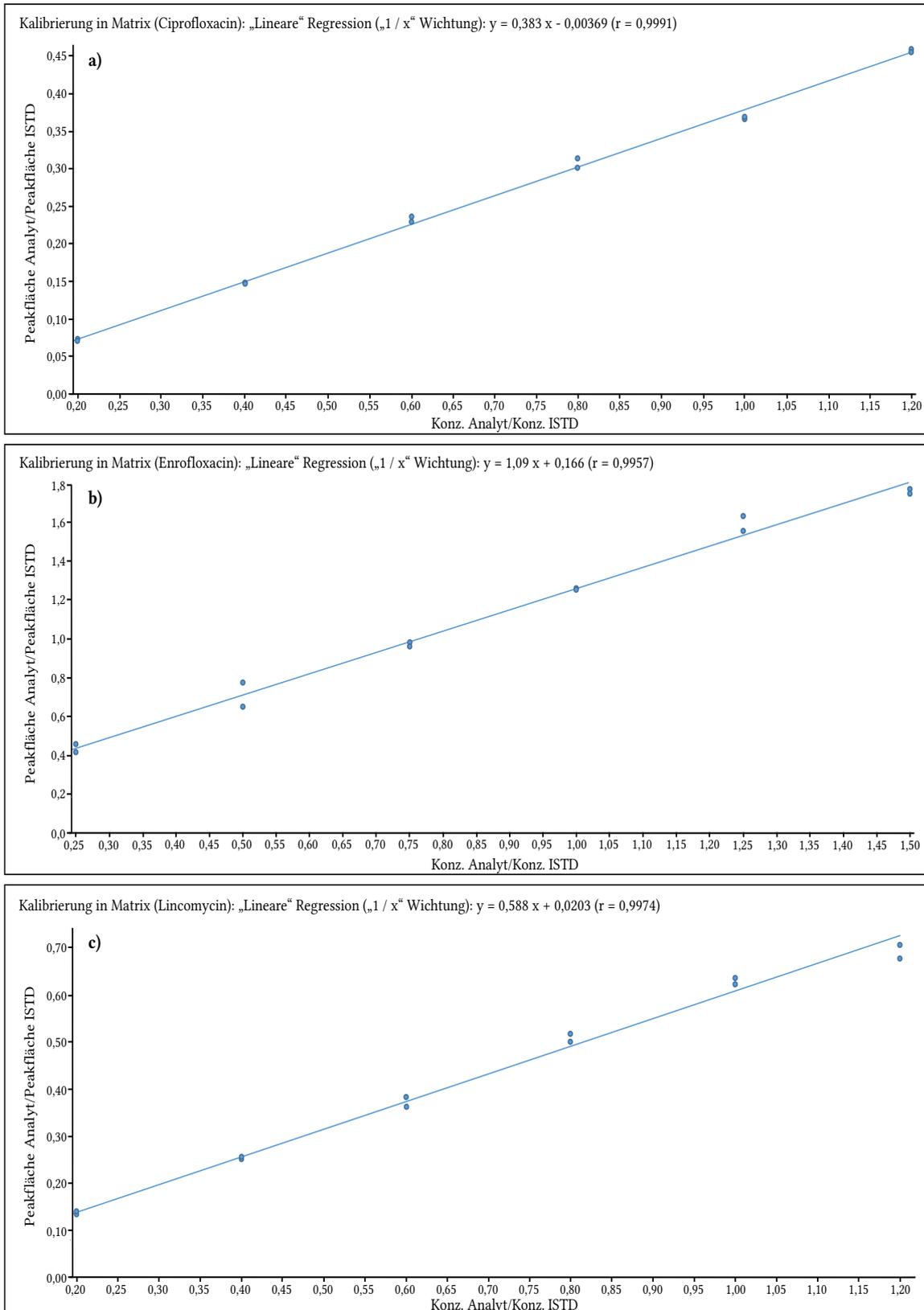


Abb. 3.1 Kalibriergeraden für die Bestimmung von a) Ciprofloxacin, b) Enrofloxacin, c) Lincomycin in Urin

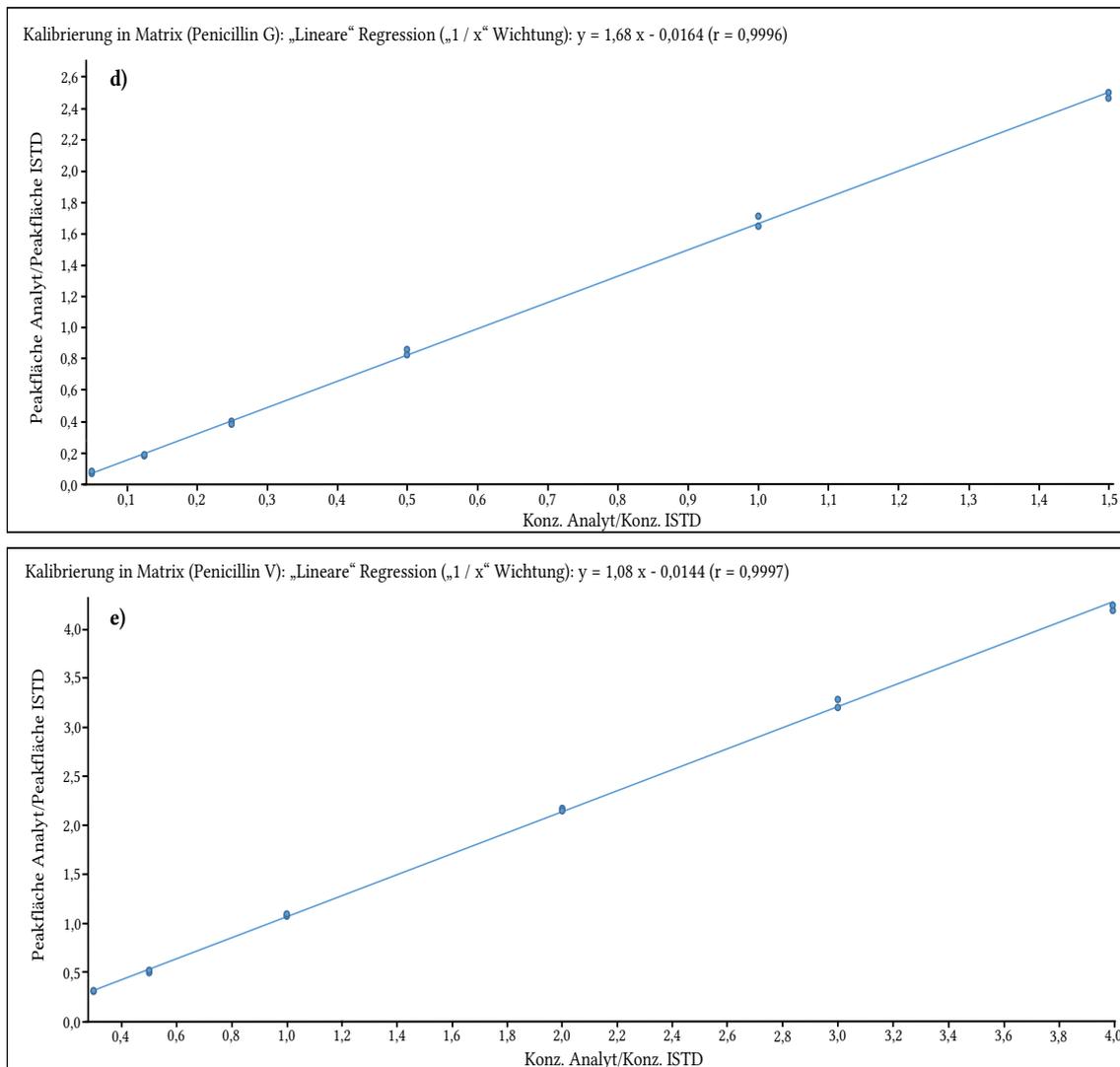


Abb. 3.2 Kalibriergeraden für die Bestimmung von d) Penicillin G und e) Penicillin V in Urin

Tab. 6 Kalibrierbereiche für die Bestimmung von Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V in Urin

Analyt	Kalibrierbereich [$\mu\text{g/l}$]
Ciprofloxacin	0,10–0,60
Enrofloxacin	0,10–1,00
Lincomycin	0,10–1,00
Penicillin G	0,10–3,00
Penicillin V	0,30–4,00

9 Berechnung der Analysenergebnisse

Zur Berechnung des Analytgehalts in einer Urinprobe wird der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des ISTDs gebildet. Mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktion kann aus dem ermittelten Quotienten der Analytgehalt in $\mu\text{g/l}$ Urin berechnet werden.

Liegt das Messergebnis oberhalb des Kalibrierbereiches, wird die entsprechende Probe mit hochreinem Wasser verdünnt, erneut aufgearbeitet und analysiert.

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Angaben in dem von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitel verfahren (Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014).

Zur Präzisionskontrolle werden mit jeder Analysenserie mindestens zwei Qualitätskontrollproben untersucht, die eine konstante Konzentration der Analyten aufweisen. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden, indem Urin mit Standardlösungen der Analyten dotiert wird. Die Analytkonzentration im Qualitätskontrollmaterial sollte dabei im relevanten Konzentrationsbereich liegen (siehe Tabelle 1–3). Die Sollwerte und die Toleranzbereiche der Qualitätskontrollmaterialien werden im Rahmen einer Vorperiode ermittelt (an zehn Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) (Bader et al. 2010).

Im Rahmen der Qualitätssicherung werden in jeder Probensequenz auch Doppelblind- und Blindwerte analysiert. Die Proben in einer Sequenz werden von Qualitätskontrollproben eingeschlossen und am Ende jeder Probensequenz werden zwei Kalibrierstandards zur Kontrolle ein zweites Mal gemessen.

11 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Nachstellung und Prüfung der Methode in einem zweiten, unabhängigen Labor bestätigt.

11.1 Präzision

Präzision in der Serie

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurden an drei Tagen je Dotierungslevel (Q_{low} und Q_{high}) fünf Qualitätskontrollproben aufgearbeitet und analysiert. Die Daten zur Präzision in der Serie sind in Tabelle 7 aufgeführt, wobei der Mittelwertsbereich der drei Serien angegeben ist.

Tab. 7 Präzision in der Serie für die Bestimmung von Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V in Urin (n=5)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Ciprofloxacin	0,15	5,43–6,98	15,1–19,4
	0,55	3,25–15,8	9,02–43,9
Enrofloxacin	0,15	10,8–20,4	30,0–56,6
	0,55	3,67–10,1	10,2–28,0
Lincomycin	0,15	5,44–9,65	15,1–26,8
	0,55	1,89–15,0	5,25–41,6

Tab. 7 (Fortsetzung)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Penicillin G	0,25	2,40–4,15	6,66–11,5
	1,00	1,00–6,27	2,78–17,4
Penicillin V	0,50	1,99–5,46	5,52–15,2
	2,50	2,52–7,31	7,00–20,3

Präzision von Tag zu Tag

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurden an drei verschiedenen Tagen (Enrofloxacin: an vier verschiedenen Tagen) je Dotierungslevel (Q_{low} und Q_{high}) fünf Qualitätskontrollproben aufgearbeitet und analysiert (Ciprofloxacin: 1 × 3 technische Replikate, 2 × 5 technische Replikate). Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag sind in [Tabelle 8](#) aufgeführt.

Tab. 8 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von Ciprofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V in Urin (n=3) und Enrofloxacin in Urin (n=4)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Ciprofloxacin	0,15	7,62	32,8
	0,55	14,3	61,5
Enrofloxacin	0,15	9,87	31,4
	0,55	3,33	10,6
Lincomycin	0,15	11,8	50,8
	0,55	4,24	18,2
Penicillin G	0,25	4,19	18,0
	1,00	6,50	28,0
Penicillin V	0,50	7,59	32,7
	2,50	7,76	33,4

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde aus den Daten der Präzision in der Serie und der Präzision von Tag zu Tag ermittelt. Die Daten sind in [Tabelle 9](#) aufgeführt.

Tab. 9 Mittlere Richtigkeit für die Bestimmung von Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V in Urin

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere Richtigkeit r (Präzision in der Serie) [%]	Mittlere Richtigkeit r (Präzision von Tag zu Tag) [%]
Ciprofloxacin	0,15	90,8–106	98,7
	0,55	88,9–116	100
Enrofloxacin	0,15	76,0–99,1	91,4
	0,55	98,0–106	101
Lincomycin	0,15	90,3–113	104
	0,55	96,3–105	100
Penicillin G	0,25	99,4–108	103
	1,00	90,0–102	96,8

Tab. 9 (Fortsetzung)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere Richtigkeit <i>r</i> (Präzision in der Serie) [%]	Mittlere Richtigkeit <i>r</i> (Präzision von Tag zu Tag) [%]
Penicillin V	0,50	87,0–99,7	91,8
	2,50	90,5–106	97,9

11.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die in [Tabelle 10](#) aufgeführten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden unter Verwendung der MRM-Spur des Quantifiers bestimmt. Die Nachweisgrenze wurde aus dem dreifachen Signal/Rausch-Verhältnis ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde entsprechend aus dem zehnfachen Signal/Rausch-Verhältnis ermittelt.

Aufgrund der Komplexität der Urinmatrix, welche erheblichen Schwankungen unterliegen kann, wurden die theoretischen Bestimmungsgrenzen angehoben. Die angewandten Bestimmungsgrenzen entsprechen der so berechneten Analytkonzentration in dem jeweils kleinsten Kalibrierstandard.

Tab. 10 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Theoretische Bestimmungsgrenze [µg/l]	Angewandte Bestimmungsgrenze [µg/l]
Ciprofloxacin	0,038	0,064	0,1
Enrofloxacin	0,043	0,072	0,1
Lincomycin	0,0015	0,0035	0,1
Penicillin G	0,0036	0,0081	0,1
Penicillin V	0,031	0,071	0,3

11.4 Spezifität

Die Spezifität der MRM-Übergänge wurde anhand der jeweiligen chromatographischen Spuren der Doppelblindwerte, Blindwerte und des jeweils kleinsten Standards untersucht. Für alle Analyten zeigten die ausgewählten MRM-Übergänge eine hinreichende Spezifität.

11.5 Stabilität der Analyten

Stabilität in Urinmatrix

Die Stabilität der Analyten in der Urinmatrix wurde bei Raumtemperatur und bei –20 °C untersucht. Die Stabilität bei Raumtemperatur ist für die Probenaufbereitung relevant und wurde über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Die Stabilität bei –20 °C ist für die Probenlagerung relevant und wurde über einen Zeitraum von 8 bis 12 Wochen untersucht. Die Untersuchungen wurden je Analyt für zwei Dotierungslevel (Q_{low} und Q_{high}) mit jeweils fünf Replikaten durchgeführt.

Nach 24 h bei Raumtemperatur wiesen Enrofloxacin und Lincomycin für den Q_{low} -Standard mit 68 % und 65 % die schlechteste Wiederfindung auf. Für alle anderen Analyten wurden mittlere Wiederfindungen zwischen 84 % und 114 % bestimmt. Die Daten zu den mittleren Wiederfindungen sind in [Tabelle 11](#) aufgeführt.

Die Untersuchungen zur Lagerungsstabilität bei –20 °C zeigten, dass die EnrofloxacinKonzentrationen mit der Zeit sinken. So lag die mittlere Wiederfindung nach zwölf Wochen sowohl für die Q_{low} - als auch für die Q_{high} -Proben bei etwa 77 %. Für alle anderen Analyten wurden mittlere relative Wiederfindungen von 90–106 % bestimmt.

Tab. 11 Analytstabilität in Urinmatrix

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Lagerung bei Raumtemperatur		Lagerung bei -20 °C	
		Lagerungsdauer [h]	Rel. Wiederfindung MW ± SD [%]	Lagerungsdauer [Wochen]	Rel. Wiederfindung MW ± SD [%]
Ciprofloxacin	0,15	24	84,1 ± 4,5	12	106 ± 8,1
	0,55	24	114 ± 4,4	12	106 ± 11,0
Enrofloxacin	0,15	24	68,1 ± 7,3	12	77,1 ± 7,3
	0,55	24	95,2 ± 2,6	12	76,7 ± 7,3
Lincomycin	0,15	24	64,5 ± 6,3	12	96,4 ± 10,0
	0,55	24	107 ± 2,3	12	105 ± 13,2
Penicillin G	0,50	24	99,1 ± 5,1	8	95,0 ± 1,6
	1,00	24	105 ± 2,9	8	NA
Penicillin V	0,50	24	84,2 ± 3,3	8	89,6 ± 4,2
	2,50	24	96,6 ± 4,2	8	92,7 ± 2,1

NA: nicht analysiert aufgrund fehlender Dotierung

Stabilität in den Probenextrakten

Die Analytstabilität in den Probenextrakten bei -20 °C wurde über einen Zeitraum von drei bis sechs Wochen untersucht. Die Untersuchungen wurden für jeden Analyten für zwei Dotierungslevel (Q_{low} und Q_{high}) in fünffacher Wiederholung durchgeführt.

Nach 42 Tagen lagen die mittleren Wiederfindungen für Penicillin G bei 62 % und 58 %; eine Verkürzung der Lagerungsdauer auf 14 Tage resultierte in mittleren Wiederfindungen von 91 % und 125 %. Zu Enrofloxacin ist anzumerken, dass je Dotierung zwei Ausreißer auftraten und daher für Extrakte, die dieses Antibiotikum enthalten, Lagerungszeiten von unter 22 Tagen angestrebt werden sollten.

Die Daten zur Wiederfindung der Analyten nach Lagerung der Probenextrakte sind in [Tabelle 12](#) aufgeführt.

Tab. 12 Analytstabilität in den Probenextrakten

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Rel. Wiederfindung bei Lagerung bei -20 °C	
		Lagerungsdauer [d]	MW ± SD [%]
Ciprofloxacin	0,15	27	96,3 ± 8,4
	0,55	27	99,5 ± 7,4
Enrofloxacin	0,15	22	101 ± 26 ^{a)}
	0,55	22	99,6 ± 34 ^{a)}
Lincomycin	0,15	27	125 ± 12
	0,55	27	118 ± 8,0
Penicillin G	0,50	42	61,5 ± 2,3
	1,00	42	58,4 ± 5,4
	0,50	14	90,5 ± 1,8
	1,00	14	78,6 ± 5,6
Penicillin V	0,50	27	110 ± 5,1
	2,50	27	111 ± 8,2

^{a)} zwei Ausreißer in den fünf Replikaten

Die Analytstabilität in den Extrakten bei -20°C wurde durch das Prüflabor über den gesamten Kalibrierbereich der jeweiligen Analyten getestet. Dabei waren Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Lincomycin mindestens 63 Tage in den Extrakten stabil und die beiden Penicilline mindestens 28 Tage.

11.6 Störeinflüsse

Mit dem Verfahren wurden für alle Analyten störungsfreie Chromatogramme erhalten. Auch beim Blind- und Doppelblindwert waren die Ionenspuren der Analyten nicht gestört. Bei der Methodenprüfung kam es allerdings bei stark matrixbelasteten Proben auf der Ionenspur $m/z=314$ von Ciprofloxacin zu Überlagerungen mit Störpeaks, die das Ionenverhältnis Quantifier/Qualifier beeinflussten. In diesen Fällen wurde auf die Ionenspuren $m/z=288$ (Quantifier) und $m/z=231$ (Qualifier) ausgewichen.

Lincomycin und Enrofloxacin sowie dessen Hauptmetabolit Ciprofloxacin weisen einen linearen Arbeitsbereich von $0,10\text{--}1,0\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin bzw. $0,10\text{--}0,60\ \mu\text{g}$ (Ciprofloxacin) pro Liter Urin auf. Im Rahmen der Methodenprüfung ergab sich auch für Ciprofloxacin ein linearer Arbeitsbereich von $0,10\text{--}1,00\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin. Für Penicillin G und Penicillin V waren die Kalibriergeraden über einen Konzentrationsbereich von $0,10\text{--}3,00\ \mu\text{g/l}$ Urin bzw. $0,30\text{--}4,00\ \mu\text{g/l}$ Urin linear.

Für die Quantifizierung der Penicilline wurde bei der Prüfung der Methode im negativen Ionisierungsmodus gearbeitet, der sich bei der verwendeten Gerätekonfiguration (Shimadzu Nexera XR (HPLC-System) mit SCIEX QTRAP 5500 (Triple-Quadrupol Massenspektrometer)) als sensitiver herausstellte.

Die Robustheit der Methode bei Verwendung geringerer Probenvolumina wurde für die Antibiotika Enrofloxacin und Lincomycin untersucht. Es zeigte sich, dass auch mit Probenvolumina zwischen 20 ml und 100 ml gearbeitet werden kann, ohne dass die Validität der Methode beeinträchtigt wird. Dies sollte gleichermaßen auch für Ciprofloxacin, Penicillin G und Penicillin V gelten.

Grundsätzlich können die Kalibrierstandards, abhängig von den Antibiotika, die quantifiziert werden sollen, auch als Multielementstandards, die alle fünf Analyten enthalten, angesetzt werden.

12 Diskussion

Die hier vorgestellte LC-MS/MS-Methode erlaubt die sensitive und präzise Bestimmung von Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Lincomycin, Penicillin G und Penicillin V in Humanurin. Die guten Präzisionsdaten sowie die guten Daten zur Richtigkeit zeigen, dass die Methode zuverlässig und richtig misst. Eventuell auftretende Matrixeffekte werden effektiv durch die verwendeten isotoopenmarkierten internen Standards kompensiert. Dies gilt auch für Ciprofloxacin, für das das deuterierte Enrofloxacin als ISTD verwendet wurde. Mit einer Bestimmungsgrenze von $0,1\ \mu\text{g/l}$ für Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Lincomycin sowie $0,3\ \mu\text{g/l}$ für Penicillin G und Penicillin V ist die Methode sehr sensitiv und ermöglicht die zuverlässige Quantifizierung einer beruflichen Exposition gegen die ausgewählten Antibiotika. Die Methode wurde bereits in einer Feldstudie erfolgreich eingesetzt (Paul et al. 2019).

Verwendete Messgeräte HPLC-System (Agilent 1260) bestehend aus einem Degasser, einer binären Pumpe, einem Autosampler, einem Thermostat und einem Säulenofen (TCC) (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn); HPLC-Säule: Kinetex C18 ($2,6\ \mu\text{m}$; $50 \times 2,1\ \text{mm}$) (Phenomenex Ltd, Deutschland, Aschaffenburg); Tandem-Massenspektrometer (QTRAP 5500, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt).

Anmerkungen

Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten (www.dfg.de/mak/interessenkonflikte) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

Literatur

- Arnaud CH (2005) Penicillin. Purpose: Typical antibacterial. <https://cen.acs.org/articles/83/i25/Penicillin.html>, abgerufen am 22 Apr 2022
- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Allgemeine Vorbemerkungen. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. 19. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Brodthorn H-R, Smollich M (2013) Antibiotika-Therapie: Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung, 12. Aufl. Stuttgart: Schattauer
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Arztebl 111(38): A1583–A1618
- EMA (European Medicines Agency) (1999) Phenoxymethylpenicillin. Summary report. EMA/MRL/697/99-FINAL. London: Committee for Veterinary Medicinal Products. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/phenoxymethylpenicillin-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf, abgerufen am 22 Apr 2022
- EMA (European Medicines Agency) (2002) Enrofloxacin (Extension to all food producing species). EMA/MRL/820/02-FINAL. London: Committee for Veterinary Medicinal Products. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/enrofloxacin-extension-all-food-producing-species-summary-report-5-committee-veterinary-medicinal_en.pdf, abgerufen am 24 Okt 2022
- Gaynes R (2017) The discovery of penicillin – New insights after more than 75 years of clinical use. Emerg Infect Dis 23(5): 849–853. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>
- Paul R, Gerling S, Berger M, Blümlein K, Jäckel U, Schuchardt S (2019) Occupational exposure to antibiotics in poultry feeding farms. Ann Work Expo Health 63(7): 821–827. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxz047>
- Spížek J, Řezanka T (2004) Lincomycin, clindamycin and their applications. Appl Microbiol Biotechnol 64(4): 455–464. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1545-7>
- Trouchon T, Lefebvre S (2016) A review of enrofloxacin for veterinary use. Open J Vet Med 6(2): 40–58. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006>
- WHO (World Health Organization), Hrsg (1998) Evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Technical Report Series, No. 879. Geneva: WHO. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42127/WHO_TRS_879.pdf, abgerufen am 22 Apr 2022
- WHO (World Health Organization), Hrsg (2004) Evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Technical Report Series, No. 925. Geneva: WHO. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43039/WHO_TRS_925.pdf, abgerufen am 22 Apr 2022
- Wolfson JS, Hooper DC (1989) Fluoroquinolone antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 2(4): 378–424. <https://doi.org/10.1128/CMR.2.4.378>