

Multirückstandsanalytik von Veterinärarzneimitteln in Rinderleber mit LC/MS/MS

**Agilent Bond Elut QuEChERS
Enhanced Matrix Removal—Lipid**

Application Note

Lebensmittelprüfung und Landwirtschaft

Autoren

Limian Zhao, Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) gehört zur nächsten Generation der Produkte zur Probenvorbereitung und verwendet ein praktisches Verfahren der dispersiven Festphasenextraktion (dSPE). Das Material ist hoch selektiv gegenüber mitextrahierter Matrix, insbesondere für fetthaltige Proben (Fettgehalt > 5 %), und beeinträchtigt die Wiederfindung der Analyten nicht. Diese Studie zeigt die Anwendung dieses neuartigen Produkts für die Analyse von 30 repräsentativen Veterinärarzneimitteln in Rinderleber. Das Verfahren beinhaltet eine schnelle und effiziente Proteinfällungsextraktion durch angesäuertes Acetonitril, gefolgt von der Verwendung der EMR—Lipid dSPE und eines Reinigungskits für die weitere Aufreinigung. Die Menge der durch das EMR-Lipid-Protokoll entfernten Matrix wurde mithilfe des Gewichts mitextrahierter Stoffe und Post-Column-Infusions-Experimenten festgestellt. Im Vergleich zu anderen Matrixaufreinigungsprodukten erlaubt EMR—Lipid dSPE eine wirksamere Matrixentfernung und bessere Wiederfindung der Analyten. Die optimierte EMR—Lipid-Methode liefert herausragende Aufreinigung und exzellente Genauigkeit und Präzision für alle 30 Veterinärarzneimittel-Verbindungen in allen Konzentrationsbereichen. Sie ermöglicht eine rasche, robuste und effektive Analyse von fettreichen Proben.



Agilent Technologies

Einführung

Die Anwendung von Veterinärarzneimitteln ist bei Tieren in der Lebensmittelindustrie weit verbreitet. Sie dienen der Prävention von Krankheiten oder als Wachstumsförderer. Diese Arzneimittel sammeln sich im Gewebe der Tiere an. Ihre unsachgemäße Verwendung kann zum Aufbau von Rückständen in essbarem Gewebe führen, welche ein bekanntes Gesundheitsrisiko darstellen. Die Bedeutung der Lebensmittelsicherheit nimmt stetig zu. In fast allen Staaten wurden entsprechende Richtlinien erlassen, welche die in der tierischen Lebensmittelherzeugung verwendeten Arzneimittel einschränken [1-4].


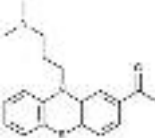
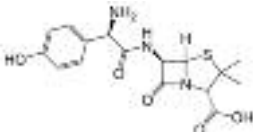
Lebensmittel tierischen Ursprungs wie Muskelfleisch, Leber und Eier sind komplexe chemische Stoffe. Für ihre Analyse ist eine effiziente Methode zur Probenvorbereitung, einschließlich allgemeiner Extraktion und effizienter Aufreinigung, ausschlaggebend. Die etablierten Methoden zur Probenvorbereitung umfassen die traditionelle Lösemittelextraktion, die Festphasenextraktion (SPE) oder die Kombination mehrerer Techniken. Diese Methoden sind meist arbeitsintensiv, zeitraubend, limitiert auf einige Verbindungsklassen und erfordern zusätzliche Methodenentwicklung.

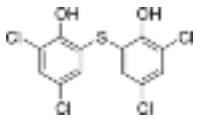
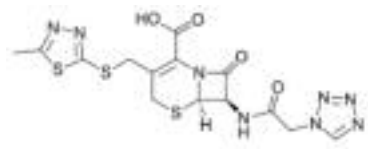
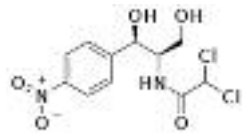
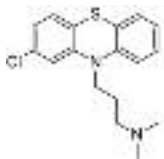
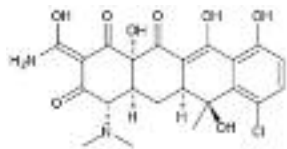
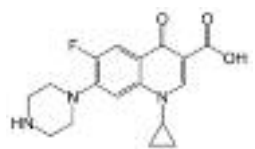
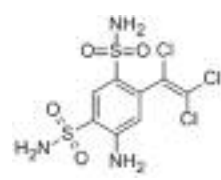
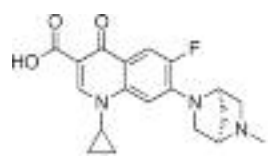
Methoden zur Erfassung einer Vielzahl von Rückständen verschiedener chemischer Klassen werden in gesetzlichen Überwachungsprogrammen aufgrund des zunehmenden Analysenumfangs und besserer Effizienz im Labor immer gängiger. Die Anzahl überwachter Veterinärarzneimittel hat in den letzten Jahren zugenommen und beträgt derzeit mehr als 100 [5-8]. Die Vorbehandlung von Proben involviert meist eine Extraktion mit einem Acetonitril-Wasser-Gemisch, gefolgt von einer C18-Aufreinigung, anderen Aufreinigungstechniken oder beidem. Sorbenzien wie C18 ermöglichen nur begrenzte Entfernung von

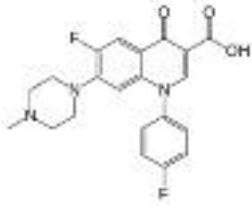
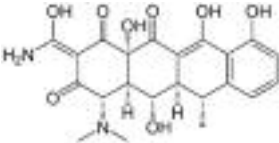
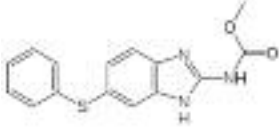
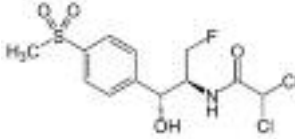
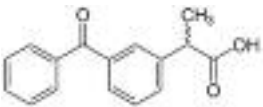
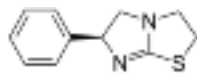
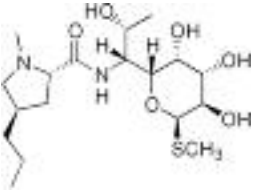
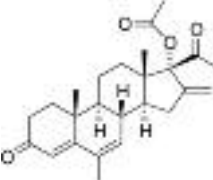
mitextrahierten Lipiden, mit dem Ergebnis, dass eine Ausfällung in der endgültigen Probe durch Verdünnung oder Rekonstitution auftreten kann. Das Auftreten von Ausfällungen erfordert eine Probenfiltration vor der LC/MS/MS-Injektion, wodurch es zum Analytverlust kommen kann. Hexan kann während der dispersiven Festphasenextraktion (dSPE) eingesetzt werden, um mitextrahierte Lipide zu entfernen. Seine Wirkweise ist aber nicht selektiv, zeitraubend und es entfernt hydrophobe Analyten. Aufreinigungsmaterialien mit Zirkonoxid-Sorbens bieten eine verbesserte Matrixaufreinigung im Vergleich zu C18, verursachen aber einen größeren Analytverlust, speziell bei Verbindungen, die Carboxyl- oder Hydroxylgruppen enthalten, wie Fluorchinolone, Tetracycline und Makrolide [7,8].

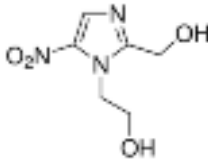
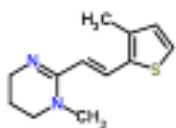
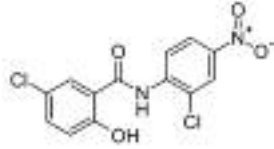
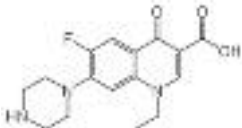
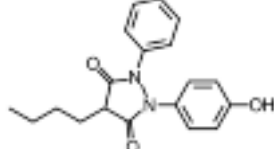
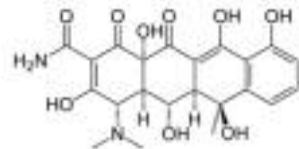
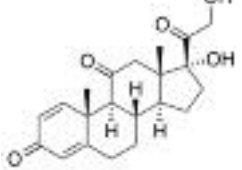
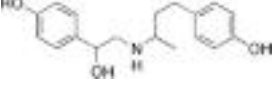
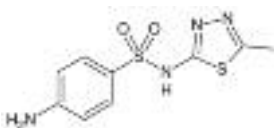
Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR—Lipid) ist ein neuartiges Sorbensmaterial, das selektiv die Haupt-Lipidklassen aus der Probe entfernt, und zwar ohne unerwünschte Analyt-Retention. Die Entfernung von Lipidinterferenzen aus komplexen Matrices ist für Verfahren wie die QuEChERS-Methode und die Proteinfällung von besonderer Bedeutung. Da diese einfachen Methoden zur Probenvorbereitung Lipide nicht weitgehend entfernen können, verbleiben die mitextrahierten Stoffe letztlich im Probenextrakt mit den Zielanalyten. Das führt zu chromatographischen Anomalien, schlechter Datenpräzision und Genauigkeit sowie zu höherem Wartungsaufwand. In dieser Studie untersuchen wir einen neuartigen Ansatz zur Probenvorbereitung für die Analyse von 30 repräsentativen und schwierig zu analysierenden Veterinärarzneimitteln in Rinderleber. Dabei verwenden wir eine einfache Proteinfällungsextraktion, gefolgt von einer Aufreinigung mit EMR-Lipid. Die ausgewählten Veterinärarzneimittel repräsentieren 17 verschiedene Klassen, von hydrophilen bis zu hydrophoben, säurehaltigen, neutralen und basischen Arzneistoffverbindungen. Tabelle 1 zeigt die chemischen und gesetzlichen Informationen für diese Veterinär-Arzneimittel.

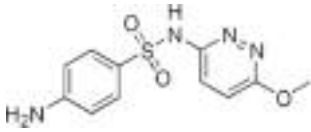
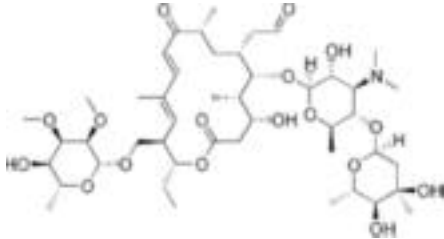
Tabelle 1. Chemische und physikalische Eigenschaften von Veterinär-Arzneimitteln.

Name	Arzneimittelgruppe	Log P	pKa	Molekularformel	Struktur	USA-Grenzwert (µg/g)
2-Thiouracil	Thyreostatikum	-0,28	7,75	C ₄ H ₄ N ₂ OS		n.v.
Acepromazin	Sedativum	3,49	9,3	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₂ S		n.v.
Amoxicillin	β-Lactam	0,86	2,4	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S		0,01

Name	Arzneimittelgruppe	Log P	pKa	Molekularformel	Struktur	USA-Grenzwert (µg/g)
Bithionol	Flukizid	5,51	4,82	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S		n.v.
Cefazolin	Cephalosporin	-1,5	2,3	C ₁₄ H ₁₄ N ₈ O ₄ S ₃		n.v.
Chloramphenicol	Phenicol	1,14	5,5	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅		(c)
Chlorpromazin	Sedativum	5,20	9,3	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ S		n.v.
Chlortetracyclin	Tetracyclin	0,24	3,3, 7,4, 9,3	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈		2 (d)
Ciprofloxacin	Fluorchinolon	0,28	6,09, 8,74	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃		(c)
Clorsulon	Flukizid	1,25	-	C ₈ H ₈ Cl ₃ N ₃ O ₄ S ₂		0,1 (e)
Danofloxacin	Fluorchinolon	1,2	6,04	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃		0,02 (a, e)

Name	Arzneittelgruppe	Log P	pKa	Molekularformel	Struktur	USA-Grenzwert (µg/g)
Difloxacin	β-Lactam	2,78	5,85	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃		n.v.
Doxycyclin	Tetracyclin	-0,54	3,4	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈		n.v.
Fenbendazol	Anthelminthikum	3,75	10,27	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₂ S		0,4 (e, h), 2 (b)
Florfenicol	Phenicol	-0,12	10,73	C ₁₂ H ₁₄ FNO ₄ S		0,2 (b)
Ketoprofen	Sedativum	2,81	3,88	C ₁₆ H ₁₄ O ₃		n.v.
Levamisol	Anthelminthikum	1,85	8,0	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S		0,1 (e)
Lincomycin	Lincosamid	0,91	7,8	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S		0,1(b)
Melengestrolacetat (MGA)	Andere	4,21	11,42	C ₂₅ H ₃₂ O ₄		0,025 (g)

Name	Arzneimittelgruppe	Log P	pKa	Molekularformel	Struktur	USA-Grenzwert (µg/g)
Metronidazol-OH	Nitroimidazol	-0,81	3,09	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄		(c)
Morantel	Anthelminthikum	1,97	>12	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ S		n.v.
Nicosamid	Flukizid	5,41	5,6	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ N ₂ O ₄		n.v.
Norfloxacin	Fluorchinolon	0,82	6,32	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃		(c)
Oxyphenbutazon	NSAR	2,72	4,87	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃		n.v.
Oxytetracyclin	Tetracyclin	-1,5	3,27	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉		2 (d)
Prednison	Corticosteroid	1,57	12,58	C ₂₁ H ₂₆ O ₅		n.v.
Ractopamin	β-Agonist	1,65	9,4	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃		0,03 (e)
Sulfamethizol	Sulfonamid	0,51	5,45	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂		n.v.

Name	Arzneimittelgruppe	Log P	pKa	Molekularformel	Struktur	USA-Grenzwert (µg/g)
Sulfamethoxyypyridazin	Sulfonamid	0,32	6,7	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S		n.v.
Tylosin	Makrolid	3,27	7,7	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇		0,2 (f)

a Grenzwert in Rinderleber (für Tulathromycin wurde ein Marker-Rückstand etabliert)

b Grenzwert in Schweinemuskelgewebe

c Verbot von "extralabel use" (Umwidmung)

d Grenzwert ist die Summe der Rückstände von Tetracyclinen inklusive Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclinen in Muskelgewebe

e Grenzwert in Rindermuskelgewebe

f Grenzwert in ungekochtem Rinderfett, Muskelgewebe, Leber und Niere

g Grenzwert in Rinderfett

h Grenzwert in Ziegenmuskelgewebe

Experimentelles

Alle Reagenzien und Lösemittel waren von HPLC- oder Analysenqualität. Acetonitril (ACN) wurde von Honeywell (Muskegon, MI, USA) bezogen, Dimethylsulfoxid (DMSO), veterinärmedizinische Standards und interner Standard von Sigma-Aldrich, Corp. (St Louis, MO, USA), Ameisensäure zur Synthese (FA) von Agilent (Best.-Nr.: G2453-86060) und Ammoniumacetat (NH₄OAc) von Fisher Chemicals (Fair Lawn, NJ, USA).

Lösung und Standards

Ameisensäure (5 %) in ACN wurde frisch bereitete durch Zugabe von 5 ml Ameisensäure zu 95 ml ACN. Ammoniumacetat-Stammlösung (1 M) wurde hergestellt durch Auflösen von 19,27 g NH₄OAc in 250 ml Milli-Q-Wasser. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert. Eine 5 mM Lösung von Ammoniumacetat in Wasser wurde hergestellt durch Hinzufügen von 5 ml einer 1 M Ammoniumacetat-Stammlösung zu 1 l Milli-Q-Wasser.

Stammlösungen der Standards und internen Standards (IS) wurden in DMSO mit 2,0 mg/ml hergestellt, mit Ausnahme der Danofloxacin-Stammlösung (1,0 mg/ml in DMSO) und Ciprofloxacin-Stammlösung (0,25 mg/ml in DMSO). Amoxicillin- und Cefazolin-Stammlösungen wurden in Wasser mit 2,0 mg/ml hergestellt. Alle Stammlösungen wurden in Probenflaschen aus braunem Glas zubereitet, Amoxicillin- und Cefazolin-

Stammlösungen in Probenflaschen aus Kunststoff. Alle Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert. Die 30 Verbindungen wurden, basierend auf der Response der Geräte, zwei Gruppen zugewiesen, G1 und G2. Eine kombinierte 25/5 µg/ml (G1/G2) Standard-Arbeitslösung wurde in ACN:Wasser, 1:1, zubereitet. Flunixin-d₃ IS-Arbeitslösung (25 µg/ml) wurde in ACN:Wasser, 1:1, zubereitet.

Geräteausrüstung

Für die Probenvorbereitung eingesetzte Geräte und Materialien:

- Geno/Schleifer (SPEX, Metuchen, NJ, USA)
- Centra CL3R Zentrifuge (Thermo IEC, MA, USA)
- Eppendorf Mikrozentrifuge (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA)
- Vortexer und Multiröhrchen-Vortexer (VWR, Radnor, PA, USA)
- Flaschenaufsatzdispenser (VWR, So. Plainfield, NJ, USA)
- Eppendorf-Pipetten und Mehrkanalpipette
- Agilent Bond Elut EMR—Lipid-Röhrchen (Best.-Nr.: 5982-1010), Agilent Bond Elut Final Polish for Enhanced Matrix Removal-Lipid (Best.-Nr.: 5982-0101)

Analysensystem

Die Analyse wurde mit einem Agilent 1290 Infinity LC-System durchgeführt, bestehend aus:

- Agilent 1290 Infinity quaternäre Pumpe (G4204A)
- Agilent 1290 Infinity Hochleistungsprobengeber (G4226A), ausgestattet mit einem Agilent 1290 Infinity Thermostat (G1330B) und einem Agilent 1290 Infinity Säulenthermostat (G1316C)

Das UHPLC- System wurde mit einem Agilent 6490 Triple Quadrupol LC/MS-System gekoppelt, ausgestattet mit einer Agilent Jet Stream Elektrospray-Ionenquelle und iFunnel-Technologie. Die Agilent MassHunter Workstationsoftware wurde für die Datenakquisition und die Analyse eingesetzt.

Gerätebedingungen

HPLC-Bedingungen

Säule:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 150 mm, 2,7 µm (Best.-Nr.: 693775-902), Agilent Poroshell 120 EC-C18 UHPLC Guard, 2,1 × 5 mm, 2,7 µm (Best.-Nr.: 821725-911)	
Mobile Phase:	A) 0,1 % FA in Wasser B) 0,1 % FA in Acetonitril	
Flussrate:	0,3 ml/Min	
Säulentemp.:	40 °C	
Temperatur des automatischen Probengebers:	4 °C	
Inj. Vol.:	3 µl	
Nadelspülung:	1:1:1:1 ACN:MeOH:IPA:H ₂ O mit 0,2 % FA	
Gradient:	Zeit (Min)	%B
	0	10
	0,5	10
	8,0	100
Stoppzeit:	12 Min	
Posttime (Wartezeit):	3 Min	

Bedingungen, MS

Positiv-/Negativ-Modus

Gastemp.:	120 °C	
Gasstrom:	14 l/Min	
Zerstäuber:	40 psi	
Sheath-Gas-Heizung:	400 °C	
Sheath-Gas-Durchfluss:	12 l/Min	
Kapillare:	3000 V	
iFunnel-Parameter:	Positiv	Negativ
	Hochdruck RF	90 V
	Niederdruck RF	70 V
		90 V
		60 V

Dynamische MRM-Bedingungen der MS zu den einzelnen Analyten sind in Tabelle 2 aufgelistet, und Abbildung 1 zeigt ein typisches Chromatogramm.

Probenvorbereitung

Das Verfahren für die Probenvorbereitung wurde schließlich mit folgenden Schritten optimiert.

1. 2 g ($\pm 0,1$ g) homogenisierte Rinderleber in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen geben.
2. 10 ml angesäuertes Acetonitril (mit 5 % FA) hinzugeben.
3. Zum Mischen Proben auf einem mechanischen Schüttler 2 Min. lang schütteln.
4. Bei 5000 U/Min 5 Min. lang zentrifugieren.
5. 5 ml Ammoniumacetat-Puffer (5 mM) in ein 15-ml-EMR-Lipid dSPE-Röhrchen geben.
6. 5 ml Überstand in ein EMR—Lipid-Röhrchen geben.
7. Sofort vortexen, um Probe zu dispergieren, anschließend 60 Sek. auf einem Multipositions-Schütteltisch mischen.
8. Bei 5000 U/Min 3 Min. lang zentrifugieren.
9. 5 ml Überstand in ein 15-ml-EMR—Lipid-Feinaufreinigungsröhrchen geben, das 2 g Salz enthält (1:4 NaCl:MgSO₄), und 1 Min lang vortexen.
10. Bei 5000 U/Min 3 Min. lang zentrifugieren.
11. 200 µl der oberen ACN-Phase und 800 µl Wasser zusammen in eine 2-ml-Probenflasche geben und vortexen.

Tabelle 2. Dynamische MRM-Parameter der LC/MS/MS und Retentionszeiten für Zielanalyten.

Analyt	RT (Min)	Delta RT (Min)	Polarität	Vorläuferion (<i>m/z</i>)	Produkt-Ion			
					Quantifizierung	CE (V)	Qualifizierung	CE (V)
2-Thiouracil	1,41	2	Negativ	127	57,9	17	–	–
Amoxicillin	1,84	2	Positiv	366,1	349,2	5	114	25
Metronidazol-OH	2,07	2	Positiv	188,1	123,1	9	126,1	13
Levamisol	3,4	2	Positiv	205,1	178,1	21	91,1	41
Lincomycin	3,35	2	Positiv	407,2	126,1	37	70,1	80
Norfloxacin	4,22	2	Positiv	320,1	302,2	21	276,1	17
Oxytetracyclin	4,24	2	Positiv	461,2	426,1	17	443,2	9
Ciprofloxacin	4,31	2	Positiv	332,1	231	45	314,3	21
Danofloxacin	4,42	2	Positiv	358,2	340,2	21	81,9	53
Ractopamin	4,4	2	Positiv	302,2	107	33	77	77
Morantel	4,9	2	Positiv	221,1	123,1	37	76,9	80
Cefazolin	4,65	2	Positiv	455	323,1	9	156	13
Sulfamethizol	4,65	2	Positiv	271	156,1	13	92	29
Sulfamethoxyipyridazin	4,69	2	Positiv	281,1	92	33	65,1	57
Difloxacin	4,83	2	Positiv	400,2	382	25	356,3	17
Chlortetracyclin	5,11	2	Positiv	479,1	444,2	21	462,1	17
Doxycyclin	5,24	2	Positiv	445,2	428,1	17	410,2	25
Florfenicol	5,47	2	Negativ	300,1	268,1	25	159,1	41
Chloramphenicol	5,68	2	Negativ	321	152	17	257,1	9
Tylosin	5,85	2	Positiv	916,5	173,9	45	772,5	33
Clorsulon	5,86	2	Negativ	377,9	341,9	9	–	–
Prednison	5,88	2	Positiv	359,2	147,2	33	341,2	9
Acepromazin	5,93	2	Positiv	327,2	86	21	58	45
Chlorpromazin	6,49	2	Positiv	319,1	86	21	58,1	45
Fenbendazol	6,77	2	Positiv	300,1	268,1	25	159,1	41
Ketoprofen	6,8	2	Positiv	255,1	208,9	13	77	57
Oxyphenbutazon	7,27	2	Negativ	323,1	133,9	25	295	17
Flunixin-d ₃ (NEG)	7,53	2	Negativ	298,1	254,2	17	192	37
Flunixin-d ₃ (POS)	7,53	2	Positiv	300,1	282	25	264	41
Melengestrolacetat	8,78	2	Positiv	397,2	337,4	13	279,2	21
Niclosamid	8,82	2	Negativ	325	170,9	25	289,1	13
Bithionol	9,49	2	Negativ	352,9	161	21	191,8	25

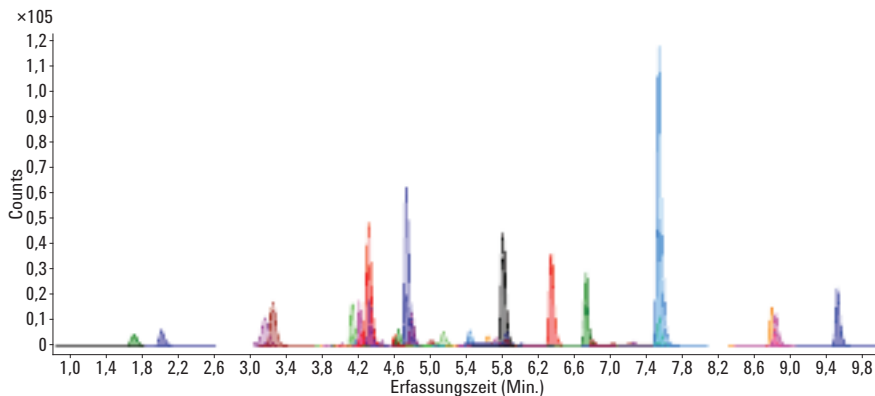


Abbildung 1. Ein typisches LC/MS/MS-Chromatogramm (dynamisches MRM) einer Rinderleberprobe, angereichert mit 50 ng/g Veterinärarzneimittel-Standard und extrahiert durch Proteinfällung, gefolgt von einer Aufreinigung mit Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

Die Probe ist nun für LC/MS/MS-Analysen einsatzbereit. Der ganze Arbeitsablauf der Probenvorbereitung wird in Abbildung 2 gezeigt.

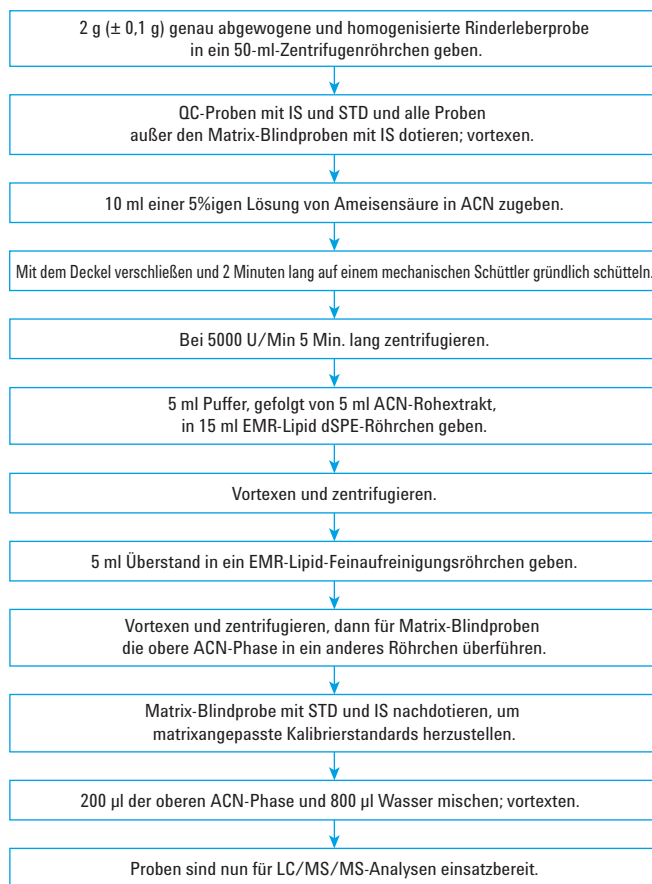


Abbildung 2. Die Probenvorbereitungsverfahren unter Einsatz von Agilent Bond Elut EMR—Lipid für die Analyse von Veterinärarzneimitteln in Rinderleber.

Kalibrierungsstandards und Qualitätskontrollproben

Vordotierte QC-Proben wurden entsprechend mit einer kombinierten Standardarbeitslösung nach Schritt 1 für sechs Replikate vorangereichert. Für Analyten der Gruppe G1 entsprachen die QC-Proben 10, 50, 250 und 750 ng/g in Leber. Für Analyten der Gruppe G2 entsprachen die QC-Proben 2, 10, 50 und 150 ng/g in Leber. Alle Proben wurden auch mit der IS-Lösung dotiert, bis auf die Matrix-Blindprobe, entsprechend 200 ng/g Flunixin-d₃ in Leber.

Matrixangepasste Kalibrierungsstandards wurden mit Standards und IS-Arbeitslösungen vorbereitet. Entsprechende Konzentrationen in den Matrix-Blindproben nach Schritt 8 entsprachen 5, 25, 50, 250, 750 und 1000 ng/g in Leber (G1), oder 1, 5, 10, 50, 150 und 200 ng/g in Leber (G2) und 200 ng/g IS in Leber.

Feststellung der Menge an mitextrahierten Stoffen

Die Menge der mitextrahierten Stoffe wurde durch gravimetrische Bestimmung [7] für drei unterschiedliche Methoden zur Aufreinigung festgestellt: C18, Zirkonoxid-Sorbens und EMR—Lipid. Die Proben wurden wie folgt vorbereitet.

1. Glasröhrchen für ~1 Std. bei 110 °C erhitzen, um die Feuchtigkeit zu entfernen.
2. Röhrchen bis auf Zimmertemperatur abkühlen lassen.
3. Teströhrchen vorwiegen.
4. Exakt 1 ml Extrakt der ursprünglichen Matrix-Blindprobe (ohne Aufreinigung) und die Matrix-Blindproben der unterschiedlichen Aufreinigungen zugeben, alles in zweifacher Ausführung.
5. Alle Proben auf einer CentriVap-Vakuumzentrifuge bei 50 °C für 1 Std. trocknen lassen, oder ggf. bis sie getrocknet sind.
6. Die Röhrchen für ~ 1 Std. bei 110 °C erhitzen, um die Feuchtigkeit zu entfernen.
7. Röhrchen bis auf Zimmertemperatur abkühlen lassen.
8. Die Röhrchen erneut wiegen.

Der Gewichtsunterschied zwischen Schritt 8 und Schritt 3 entspricht der Menge der mitextrahierten Stoffe. Die Menge der mitextrahierten Stoffe, die durch die Aufreinigung entfernt wurde, entsprach dem durchschnittlichen Gewichtsunterschied der mit der Matrix extrahierten Stoffen vor und nach der Aufreinigung.

Beurteilung des Matrixeffekts

Der chromatographische Matrixeffekt wurde durch ein Post-Column-Infusion-Experiment beurteilt. Die Matrix-Blindproben wurden simultan mit einer Post-Column-Infusion von 10 ppb reiner Standard-Lösung aus Veterinärarzneimitteln mit 60 µl/min injiziert. Alle Verbindungsübergänge wurden während des gesamten LC-Zyklus überwacht.

Außerdem wurde die Analyt-Response (Peakfläche) zwischen nachdotierten Leber-Extrakten und den entsprechenden reinen Lösungen verglichen. Nachdotierte Leber-Extrakte wurden wie folgt hergestellt: Eine Standardlösung wurde in den Leerwertmatrix-Extrakt der Leber nachdotiert. Der Response-Unterschied (Peakfläche) korreliert direkt mit den Matrixeffekten.

Methodenoptimierung, -validierung und -vergleich

Verschiedene Optimierungsversuche wurden beurteilt. 5 % FA in ACN gegenüber 1 % FA in ACN für die Proteinfällung, Ammoniumacetat-Puffer gegenüber Wasser für die EMR—Lipid-Aufreinigung sowie mit und ohne Feinaufreinigungssalze nach EMR—Lipid-Aufreinigung. Die Ergebnisse wurden ausgewertet, basierend auf der Wiederfindung der Analyten, Präzision und weiteren Quantifizierungsparametern. Die schließlich optimierte Methode wurde dann durch ein komplettes Quantifizierungsbatch validiert, wobei für alle QC-Proben die umschließende Kalibrierung ("Bracketing") mit duplizierten Standards der Kalibrierungskurve eingesetzt wurde.

Vergleichsdaten zur Wiederfindung wurden durch Vor- und Nachdotieren von Leberproben mit 50 ng/g erhalten. Die Extrakte wurden dann mit akzeptablen Aufreinigungsprotokollen verarbeitet. Für das EMR—Lipid-Protokoll mit Proteinfällung wurde der in Abbildung 2 gezeigte Aufreinigungsvorgang verwendet. Für QuEChERS wurde eine C18 oder Zirkonoxid-Sorbens dSPE-Aufreinigung wie folgt verwendet.

1. 2 g Leber in ein 50-ml-Röhrchen geben.
2. 8 ml Phosphat-Puffer (pH 7,0) und 10 ml angesäuertes ACN (5 % FA) hinzugeben.
3. Die Probe 30 Sek. vortexen.
4. Hinzufügen von EN-Salzen für Aufteilung/Extraktion und auf einem mechanischen Schüttler gründlich schütteln.
5. Bei 5000 U/Min 5 Min. lang zentrifugieren.

Der Leber-Rohextrakt mit ACN für die weitere Aufreinigung wurde wie folgt zubereitet.

1. 1 ml Leber-ACN-Rohextrakt in eine 2-ml-Probenflasche mit 25 mg C18 und 150 mg MgSO₄ (Best.-Nr.: 5982-4921) oder in eine 2-ml-Probenflasche mit 100 mg Zirkonoxid-Sorbens geben.
2. Mit dem Deckel verschließen und 1 Min vortexen.
3. Bei 13 000 U/Min 3 Min. lang zentrifugieren (Mikrozentrifuge).
4. 200 µl Überstand in eine andere Probenflasche mit 800 µl Wasser übertragen.
5. Vortexen und mit einem 0,45 µm Filter aus regenerierter Zellulose filtern.

Die Proben sind nun für LC/MS/MS-Analysen einsatzbereit. Die Wiederfindung wurde durch das Verhältnis der Analyt-Peakflächen aus vor- und nachdotierten Proben kalkuliert.

Ergebnisse und Diskussion

Menge an mitextrahierten Stoffen

Die Ergebnisse der gravimetrischen Bestimmung der mitextrahierten Stoffe aus der Probe werden in Tabelle 3 gezeigt, wobei eindeutig nachgewiesen wird, dass EMR—Lipid dSPE die beste Matrixaufreinigungseffektivität bietet, gemessen am Gewicht und im Vergleich mit dSPE mit C18 oder Zirkonoxid-Sorbens.

Tabelle 3. Ergebnisse der gravimetrischen Untersuchung mitextrahierter Stoffe bei Rinderleber nach Aufreinigung mit Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal-Lipid, Zirkonoxid und C18.

Aufreinigungsmethode	Mitextrahierte Stoffe pro 1 ml ACN-Endextrakt (mg) (n = 2)	Effizienz der Entfernung der mitextrahierten Matrixstoffe durch Aufreinigung (%)
Keine weitere Aufreinigung	12,1	—
EMR—Lipid dSPE	5,3	56,2
Zirkonoxid-Trennung mit dSPE.	6,0	50,4
C18 dSPE	7,8	35,5

Beurteilung des Matrixeffekts

Für die Bestimmung der Matrixeffekte in den ACN-Rohextrakten und drei endgültigen ACN-Extrakten, die mit EMR—Lipid, C18 und Zirkonoxid-Sorbens aufgereinigt wurden, wurde eine Post-Column-Infusion (PCI) der Veterinärarzneimittel-Standards verwendet. Alle Analyten wurden während des gesamten LC-Zyklus beobachtet. Die PCI-Chromatogramme reflektieren die Matrixeffekte für die beobachteten Analyten im positiven und negativen Modus. Der endgültige ACN-Extrakt wurde vor der Injektion nicht verdünnt und das ACN wurde direkt injiziert. Die PCI-Profile werden in Abbildung 3 gezeigt.

Wie das rote Profil zeigt, wurden mit der Injektion der unbehandelten Leber-Matrixblindprobe ohne jegliche Aufreinigung signifikante Matrix-Suppression (niedrige Basislinie) und Matrix-Anreicherung (große Peaks) beobachtet. Diese Matrixeffekte werden einen äußerst negativen Einfluss auf die Zuverlässigkeit der Methode und Datenqualität haben. Im Vergleich dazu zeigt das blaue Profil, dass die Verwendung einer EMR—Lipid-Aufreinigung zu signifikanten Verbesserungen führt, wie an der reduzierten Matrix-Suppression und -Anreicherung zu erkennen ist.

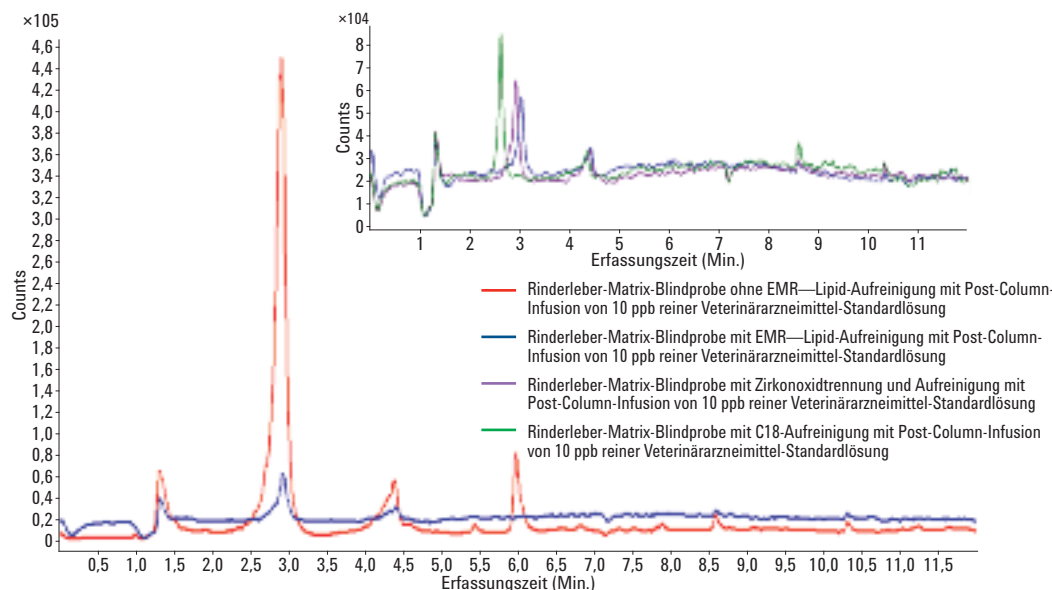


Abbildung 3. Die Profile der Post-Column-Infusion wurden generiert durch Injektion einer Rinderleber-Matrixblindprobe und simultane Post-Column-Infusion einer 10 ppb Veterinärarzneimittel-Standardlösung. Alle Analyten wurden während der Chromatographie beobachtet. Das Profil ist das kombinierte Totalionen-Chromatogramm aller beobachteten Analytübergänge.

Das in Abbildung 3 eingeschobene Chromatogramm zeigt die PCI-Profile mit Injektion von Matrix-Blindproben unter Verwendung von verschiedenen Aufreinigungen. Die Profile von EMR—Lipid (blau) und Zirkonoxid-Sorbens (lila) sind ähnlich. Das Profil der C18-Aufreinigung (grün) zeigt ebenfalls Ähnlichkeit mit den anderen beiden, aber mit mehr Bereichen einer Matrix-Anreicherung und -Suppression. Dieser Vergleich korrespondiert mit dem der gravimetrischen Bestimmung der mitextrahierten Stoffe. Hier zeigt die EMR—Lipid-Aufreinigung eine etwas bessere Effizienz bei der Aufreinigung als Zirkonoxid-Sorbens, und beide ergeben eine bessere Aufreinigung als C18.

Vergleiche der Analytresponse zwischen nachdotierten Matrix-Proben und reinen Standards wurden ebenfalls für die Bewertung des Matrixeffekts herangezogen. Bei den meisten Analyten traten keine signifikanten Unterschiede in der Analytresponse auf. Bei den später eluierenden Verbindungen, die stärker hydrophob sind, wurde mehr Matrix-Ionensuppression in den Proben beobachtet, die mit C18 und Zirkonoxid-Sorbens aufgereinigt wurden. Da die meisten Lipid-Interferenzen spät eluieren, bestätigt die reduzierte Matrix-Ionensuppression für die hydrophoben Analyten, dass EMR—Lipid im Vergleich zur C18- und Zirkonoxid-Sorbens-dSPE mitextrahierte Lipide effizient entfernt. Abbildung 4 zeigt zwei Beispiele der Reduktion der Matrix-Ionensuppressionseffekte durch EMR—Lipid-Aufreinigung.

Methodenoptimierung

Das Lösemittel, das für die Proteinfällung eingesetzt wird, wurde ebenfalls untersucht. Es ist bekannt, dass Acetonitril Proteine im Verhältnis Probe:Organischer Stoff von 1:3 bis 1:5 effizient fällt und angesäuertes Acetonitril eine bessere Proteinfällung bietet. Rinderleber ist eine komplexe Matrix und die Entfernung von Proteinen ist nicht nur für die Matrixentfernung von Bedeutung, sondern ermöglicht auch eine effiziente EMR—Lipid-Aufreinigung. In dieser Studie wurden 1 % und 5 % FA in ACN in der Proteinfällung untersucht, gefolgt von einer EMR—Lipid-Aufreinigung und Analyse mit LC/MS/MS. Die Verwendung von 5 % FA in ACN bot mehr Präzision, erkennbar an den Kalibrierungskurven (Abbildung 5). Die Wiederfindung der Analyten wurde ebenfalls verglichen und auch hier bot 5 % FA in ACN mehr Präzision.

Es ist wichtig, zusätzliches Wasser oder Puffer zur Aktivierung des EMR-Lipid-Materials hinzuzugeben. Dadurch wird die Interaktion mit ungewollter Probenmatrix, speziell Lipiden, verbessert und eine effiziente Matrixentfernung erreicht. Die Auswirkung der Verwendung eines Ammoniumacetat-Puffers (5 mM) während der EMR—Lipid-Aufreinigung wurde untersucht und die Ergebnisse mit denen unter Verwendung von Wasser verglichen. Im Allgemeinen führte der Einsatz eines Ammoniumacetat-Puffers zur Verbesserung der Wiederfindung der Analyten um 5 bis 10 % für viele Stoffe, mit Ausnahme der Tetracycline.

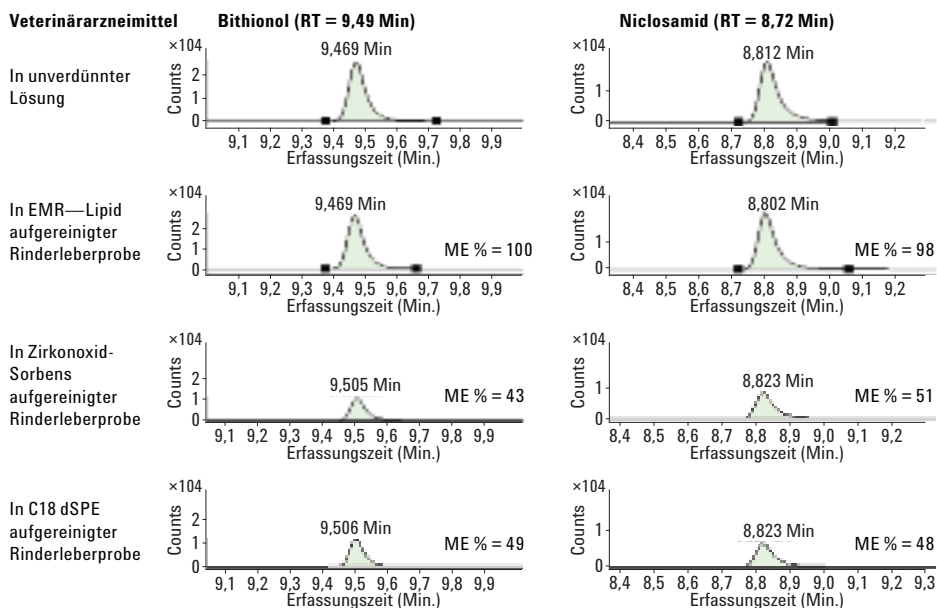


Abbildung 4. Vergleich des Matrix-Ionensuppressionseffektes für hydrophobe Analyten. Der Matrixeffekt (ME) wurde aus dem Verhältnis der Peakflächen in nachdotierten Leberextrakten und korrespondierenden reinen Standards berechnet.

**Bei Proteinfällungsextraktion
verwendetes Lösemittel**

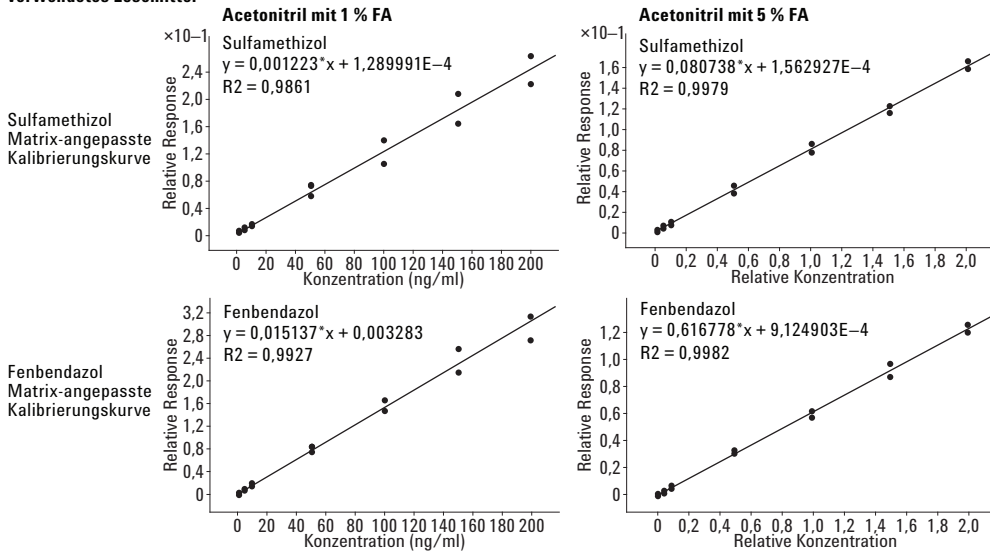


Abbildung 5. Vergleich der Linearität der Kalibrierungskurve bei Verwendung von 1 % FA in ACN gegenüber 5 % FA in ACN für die Proteinfällung.

Bei diesen Verbindungen führt die Verwendung eines Puffers zu einer etwa 5 %igen Abnahme der Wiederfindung im Vergleich zum Einsatz von nicht gepuffertem Wasser. Für den Vergleich in Abbildung 6 wurden Analyten mit offensichtlichen Unterschieden in der Wiederfindung bei Verwendung von Puffer oder Wasser

ausgewählt. Da die Wiederfindung der Analyten unter Verwendung des Puffers meistens zunahm und der Verlust bei den Tetracyclinen durch den Puffer minimal war, wurde die 5 mM Ammoniumacetat-Pufferlösung für den Rest der Studie verwendet.

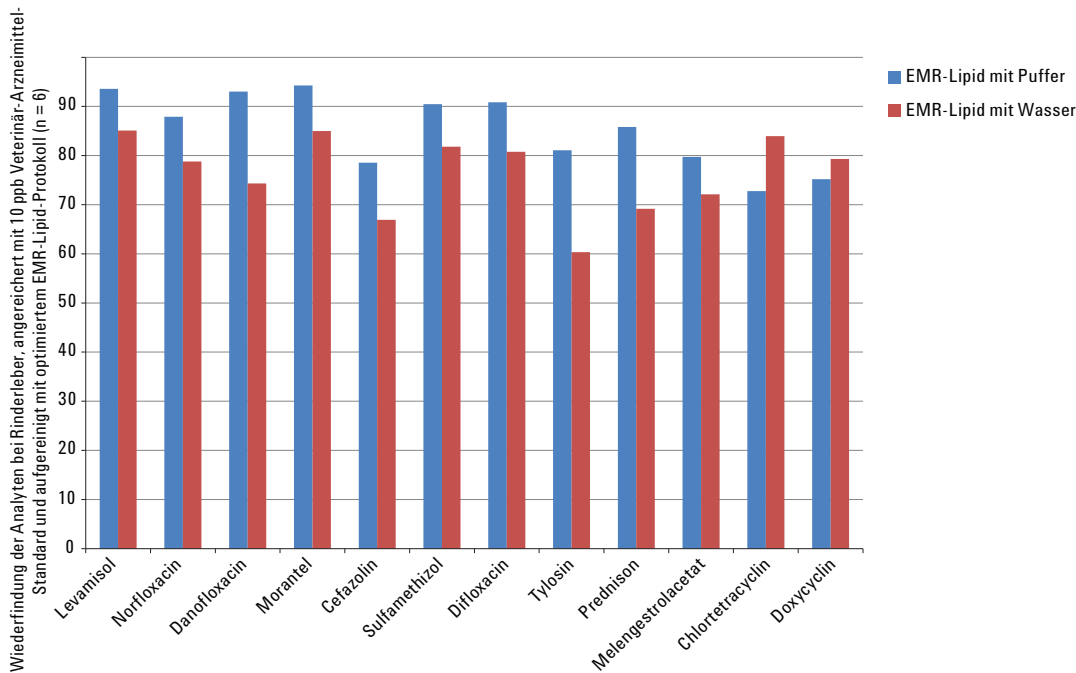


Abbildung 6. Vergleich der Wiederfindung der Analyten unter Verwendung von 5 mM Ammoniumacetat-Puffer gegenüber Wasser in der Enhanced Matrix Removal dSPE-Aufreinigung.

Nach der EMR-Lipid-Aufreinigung ist der Überstand eine etwa 1:1 Mischung von ACN und Wasser. Ein 5-ml-Aliquot des Überstands wird dann in ein EMR—Lipid-Feinaufreinigungsröhrchen mit 2 g Salzmischung (4:1 MgSO₄:NaCl) zur Trennung von organischer und wässriger Phase durch Partitionierung durch Aussalzen übertragen. Dieser Schritt trennt nicht nur, er unterstützt auch die weitere Matrix-Aufreinigung und entfernt zusätzlich gelöste Sorbenzien und Salze. Deshalb wird dieser Schritt sowohl für GC- als auch LC-Analysen sehr empfohlen. Während der Methodenentwicklung wurden gute Wiederfindungen der Analyten und eine gute Präzision für alle Analyten, außer für Tetracycline, erreicht. Mit weitergehenden Untersuchungen stellten wir fest, dass die niedrige Wiederfindung der Tetracycline (45 bis 68 %) in Verbindung zur Partitionierung durch Aussalzen steht. Zur Reduzierung des Tetracyclin-Verlusts wurde ein alternatives Protokoll (Abbildung 7) untersucht, bei dem die EMR—Lipid-Feinaufreinigungssalze entfallen. Das Vorgehen ist ähnlich, mit der Ausnahme, dass 400 µl des Extrakts (aus EMR—Lipid dSPE) und 600 µl Wasser in einer Mikrozentrifugen-Probenflasche gemischt und eine Minute gevortext wurden. Der Schritt der Feinaufreinigung wurde nicht durchgeführt. Die Proben wurden drei Minuten bei 13 000 U/Min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und der Überstand anschließend in eine 2-ml-Probenflasche für die LC/MS/MS-Analyse übertragen. Die Standards- und IS-Nachdotierung der Matrix-Blindproben wurde vor dem Mischen/Verdünnen durchgeführt. Dieses Protokoll kann als nicht partitionierend angesehen werden, da keine partitionierenden Salze verwendet werden.

Die in Abbildung 8 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Wiederfindung für Tetracycline mit dem alternativen Protokoll substantiell verbessert werden kann. Die Ergebnisse des Protokolls mit Feinaufreinigung (dargestellt in Abbildung 2) für Tetracycline könnten allerdings akzeptabel sein, da die Präzision ausreichend für eine Quantifizierung ist. Die niedrige Wiederfindung kann unter Verwendung eines passenden, stabil markierten internen Standards korrigiert werden. In dieser Studie haben wir die extrahierten Proben für das alternative Protokoll ohne Feinaufreinigung nach der EMR—Lipid-Aufreinigung aufgeteilt und konnten drei Ergebnisse für Tetracycline (Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Doxycyclin) mit dem alternativen Protokoll präsentieren.

Methodenvergleich

Die optimierte EMR-Lipid-Methode wurde dann mit einer herkömmlichen QuEChERS-Methode unter Verwendung von C18 dSPE-Aufreinigung und Zirkonoxid-Sorbens-Aufreinigung verglichen. QuEChERS wird oft für die Analyt- oder Rückstandsextraktion verwendet und setzt einen dSPE-Aufreinigungsschritt ein. Abbildung 9 zeigt die Vergleichsergebnisse der statistischen Wiederfindung und Abbildung 10 die Vergleichsergebnisse der ausgewählten problematischen Analyten. Das optimierte EMR—Lipid-Protokoll bietet signifikante Verbesserungen für die Wiederfindung und Präzision der problematischen Analyten, speziell gegenüber dem

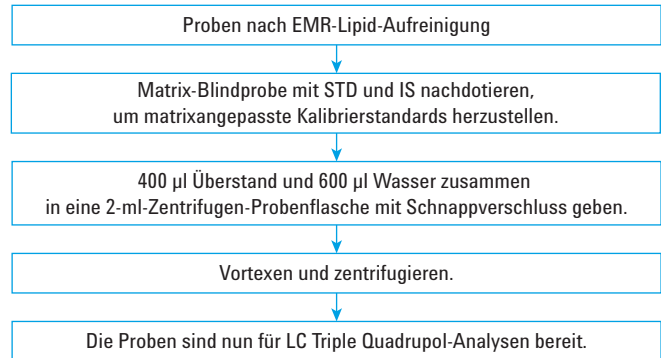


Abbildung 7. Optionales Verfahren nach Anwendung von Agilent Bond Elut EMR—Lipid-Aufreinigung zur Verbesserung der Tetracyclin-Wiederfindung.

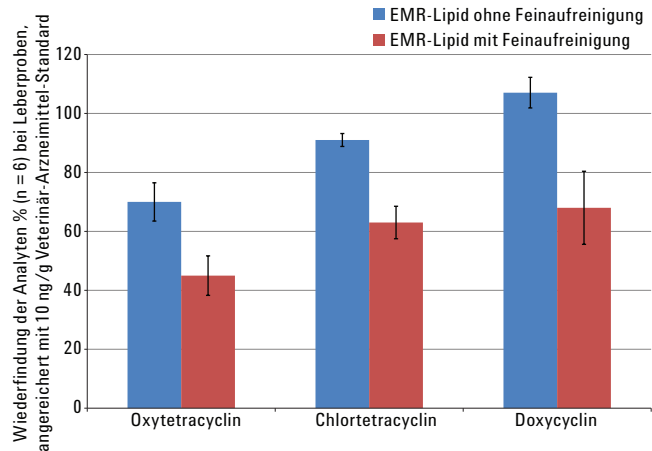


Abbildung 8. Vergleich der Tetracyclin-Wiederfindung und Präzision von Leberproben mit und ohne Feinaufreinigung nach der Aufreinigung mit Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

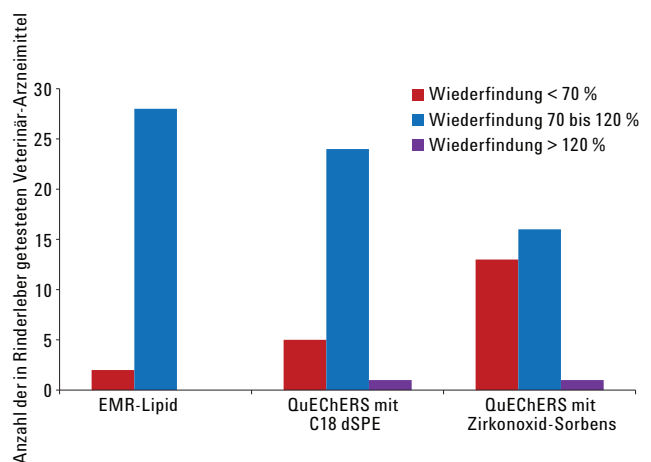


Abbildung 9. Statistische Wiederfindungsergebnisse für den Vergleich von Agilent Bond Elut EMR—Lipid-Protokoll mit traditionellen QuEChERS-Protokollen.

Zirkonoxid-Sorbens, das eine geringe Wiederfindung für Fluorchinolon- und Tetracyclin-Verbindungsklassen ergab. Nur Oxytetracyclin und Niclosamid hatten absolute Wiederfindungen von 67 % bzw. 68 %. Die Präzision für diese zwei Verbindungen für sechs Replikate war akzeptabel, mit einer RSD von 12,8 % bzw. 2 %, was auf Grundlage der SANCO-Leitlinien als akzeptabel anzusehen ist [9]. Diese Ergebnisse sind besser als die Ergebnisse der anderen beiden Protokolle, bei denen dSPE mit C18 und Zirkonoxid-Sorbens eingesetzt wurde.

Methodenvalidierung

Die optimierte EMR—Lipid-Methode wurde unter Verwendung der im Abschnitt Probenvorbereitung beschriebenen Methode durch ein komplettes Quantifizierungsbatch validiert. Ein interner Standard (Flunixin-d₃ für positiven und negativen Modus) wurde für die Quantifizierung der Genauigkeit und Präzision eingesetzt.

Die absolute Wiederfindung von Flunixin-d₃ betrug 90 bis 100 %. Die Genauigkeit korrespondiert daher stark mit der absoluten Wiederfindung. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung. Die zusammengefassten Werte zur Genauigkeit (Abbildung 11) wurden durch Bestimmung der Genauigkeit und Präzision für 24 QCs in vier verschiedenen Konzentrationen (G1 = 10, 50, 250 und 750 ppb und G2 = 2, 10, 50 und 150 ppb; siehe Abschnitt Kalibrierungsstandard) generiert, mit sechs Replikaten für jede Konzentration. Es wurden für 93 % der Analyten akzeptable Genauigkeiten (70 bis 120 %) erreicht, mit Ausnahme von zwei Ausreißern, die gering unter 70 % Wiederfindung liegen, aber gute RSDs aufwiesen. Die RSD-Werte für sechs Replikate pro Konzentration waren herausragend und lagen für die meisten Verbindungen bei unter 10 %. Es muss festgehalten werden, dass Ractopamin und Ketoprofen in geringem Maße in der Rinderleber-Blindprobe festgestellt wurden und deshalb eine Modifizierung des Kalibrierungsbereichs durchgeführt wurde.

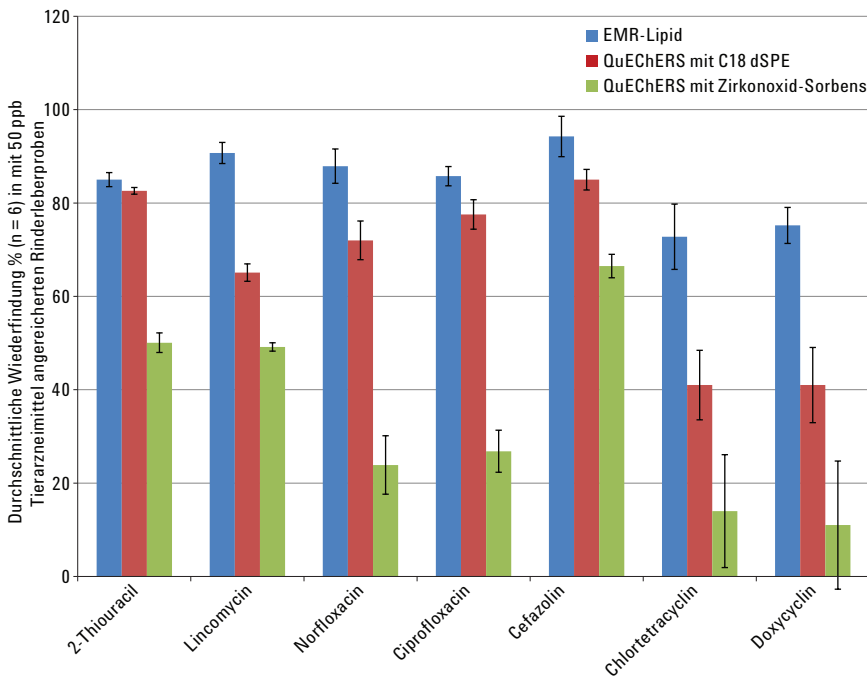


Abbildung 10. Ausgewählte Ergebnisse der Wiederfindung der Analyten für den Vergleich von Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal-Lipid-Protokoll mit traditionellen Protokollen. Die Ergebnisse für Chlortetracyclin und Doxycyclin wurden unter Verwendung eines alternativen Protokolls, wie in Abbildung 6 gezeigt, generiert. Für die anderen Verbindungen wurde das Protokoll in Abbildung 1 genutzt.

Tabelle 4. Quantifizierungsergebnisse für die Zielanalyten unter Verwendung von Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal-Lipid. Jeder Analyt wurde auf vier Konzentrationsleveln beurteilt, bei jeweils sechs Replikaten pro Konzentration.

Gruppen-Nr.	Analyt	Kalibrierungskurve			Wiederfindung und Präzision der Methode (ng/g QCs)											
		Regression	R ²	Kal. Bereich (ng/g)	2		10		50		150		250		750	
					Wdf %	RSD	Wdf %	RSD	Wdf %	RSD	Wdf %	RSD	Wdf %	RSD	Wdf %	RSD
1	2-Thiouracil	Linear, 1/x	0,9976	5-1000	—	—	106,6	4,9	93,6	5,4	—	—	87,0	3,0	85,4	8,3
1	Amoxicillin	Linear, 1/x	0,9978	5-1000	—	—	65,9	12,1	74,3	8,8	—	—	79,5	4,1	79,7	4,8
1	Metronidazol-OH	Linear, 1/x	0,9981	5-1000	—	—	92,6	15,1	89,4	6,6	—	—	89,4	3,5	89,7	3,3
1	Oxytetracyclin	Linear, 1/x	0,9963	5-1000	—	—	73,9	19,1	71,2	14,0	—	—	67,0	12,8	63,4	9,0
1	Cefazolin	Linear, 1/x	0,9966	5-1000	—	—	72,1	9,4	81,2	2,7	—	—	86,7	3,8	82,9	3,0
1	Difloxacin	Linear, 1/x	0,9978	5-1000	—	—	79,0	8,3	86,5	5,9	—	—	104,4	5,1	97,7	6,3
1	Chlortetracyclin	Linear, 1/x	0,9928	5-1000	—	—	100,6	14,1	96,9	9,5	—	—	93,8	14,0	85,0	11,6
1	Doxycyclin	Linear, 1/x	0,9972	5-1000	—	—	118,9	12,0	102,7	10,0	—	—	110,0	7,7	104,5	8,6
1	Florfenicol	Linear, 1/x	0,9942	5-1000	—	—	103,4	6,2	107,9	6,0	—	—	115,2	13,5	107,0	4,0
1	Chloramphenicol	Linear, 1/x	0,9962	5-1000	—	—	103,6	6,6	107,1	7,9	—	—	113,7	9,8	100,9	5,2
1	Clorsulon	Linear, 1/x	0,9954	5-1000	—	—	77,9	10,3	104,4	6,0	—	—	102,2	7,1	94,3	3,3
1	Prednison	Linear, 1/x	0,9984	5-1000	—	—	105,9	9,1	92,1	11,1	—	—	103,9	10,5	94,5	2,3
1	Oxyphenbutazon	Linear, 1/x	0,9903	5-1000	—	—	93,6	3,4	91,9	5,2	—	—	93,7	5,6	97,0	4,6
1	Melengestrolacetat	Linear, 1/x	0,9994	5-1000	—	—	70,6	1,4	77,3	3,0	—	—	82,8	2,1	77,1	2,6
1	Bithionol	Quadratisch, 1/x	0,9981	5-1000	—	—	69,4	6,2	90,4	2,9	—	—	91,3	4,3	83,1	3,7
2	Levamisol	Linear, 1/x	0,9967	1-200	84,5	11,3	95,5	5,1	103,8	5,2	89,4	9,7	—	—	—	—
2	Lincomycin	Linear, 1/x	0,9950	1-200	89,5	16,4	79,6	10,6	74,1	4,5	74,8	11,2	—	—	—	—
2	Norfloxacin	Linear, 1/x	0,9960	1-200	89,5	9,7	89,2	4,7	95,8	7,4	93,5	7,2	—	—	—	—
2	Ciprofloxacin	Linear, 1/x	0,9980	1-200	81,0	5,6	83,6	6,9	96,9	4,1	99,5	5,9	—	—	—	—
2	Danofloxacin	Linear, 1/x	0,9985	1-200	78,2	7,8	86,2	5,8	99,5	7,8	96,9	4,8	—	—	—	—
2	Ractopamin	Linear, 1/x	0,9961	10-200 ^b	—	—	98,1	15,5	105,0	10,4	102,5	6,8	—	—	—	—
2	Morantel	Linear, 1/x	0,9960	1-200	89,5	4,9	95,1	4,5	101,0	8,6	94,1	7,4	—	—	—	—
2	Sulfamethizol	Linear, 1/x	0,9928	1-200	85,7	14,6	89,2	8,1	93,9	4,9	88,0	10,4	—	—	—	—
2	Sulfamethoxyppyridazin	Linear, 1/x	0,9973	1-200	84,7	8,1	84,4	2,9	89,9	5,7	84,9	6,2	—	—	—	—
2	Tylosin	Linear, 1/x	0,9967	1-200	80,6	11,2	75,6	2,7	71,0	4,5	65,3	2,3	—	—	—	—
2	Acepromazin	Linear, 1/x	0,9973	1-200	74,1	6,3	73,5	3,0	77,2	4,9	75,2	5,3	—	—	—	—
2	Chlorpromazin	Linear, 1/x	0,9967	1-200	66,1	6,1	67,8	3,8	73,4	4,3	72,7	6,5	—	—	—	—
2	Fenbendazol	Linear, 1/x	0,9988	1-200	74,6	7,7	82,3	4,6	97,9	9,9	84,9	3,5	—	—	—	—
2	Ketoprofen	Linear, 1/x	0,9978	5-200 ^c	—	—	88,3	7,2	98,1	6,9	94,5	3,8	—	—	—	—
2	Niclosamid	Linear, 1/x	0,9996	1-200	60,0	15,3	66,6	4,7	71,7	2,0	67,6	3,1	—	—	—	—

^a Analyten der Gruppe 1 haben einen Kalibrierungsbereich von 5 bis 1000 ng/n und QC-Dotierungslevel von 10, 50, 250 und 750 ng/g. Analyten der Gruppe 2 haben einen Kalibrierungsbereich von 1 bis 200 ng/n und QC-Dotierungslevel von 2, 10, 50 und 150 ng/g.

^b Modifizierter Kalibrierungsbereich aufgrund von Ractopamin-Fund in Rinderleber-Kontroll-Blindprobe.

^c Modifizierter Kalibrierungsbereich aufgrund von Ketoprofen-Fund in Rinderleber-Kontroll-Blindprobe.

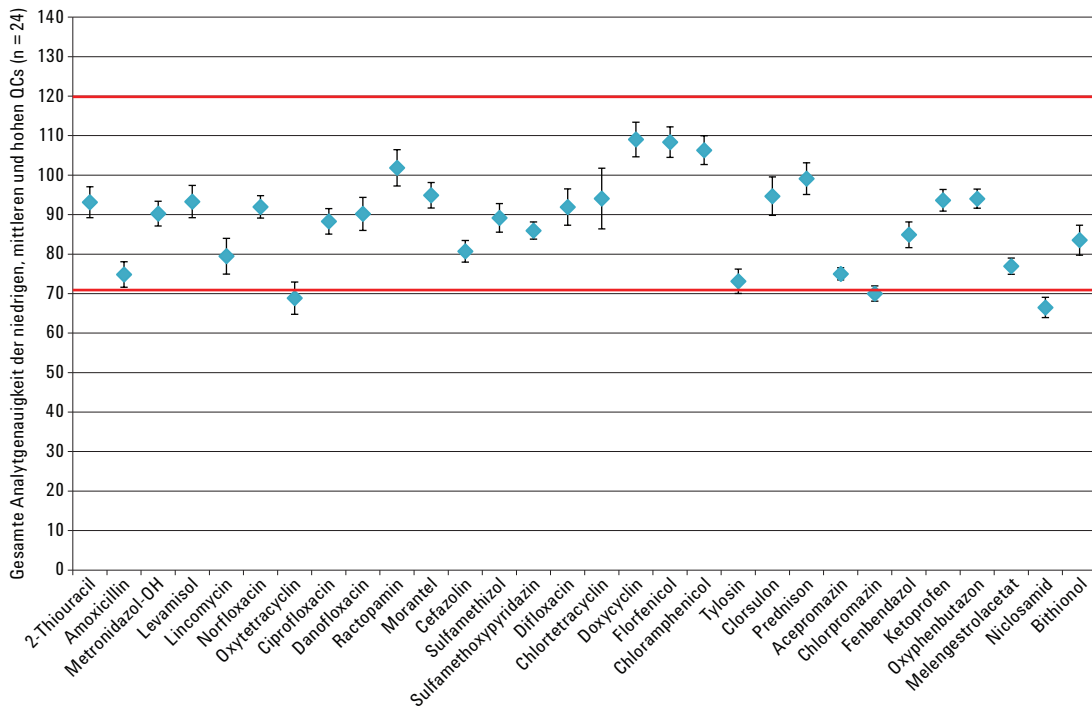


Abbildung 11. Quantifizierung von 30 repräsentativen Veterinär-Arzneimitteln, die in Rinderleber unter Verwendung des optimierten Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal-Lipid-Protokolls analysiert wurden. Die Daten zur Genauigkeit und Präzision wurden unter Verwendung von insgesamt 24 Replikaten mit vier verschiedenen Dotierungsleveln ($n = 6$ pro Level) berechnet. Fehlerbalken = 95 % KI. Drei Ergebnisse für Tetracyclinverbindungen wurden unter Verwendung eines alternativen Protokolls, wie in Abbildung 6 gezeigt, generiert. Für die anderen Verbindungen wurde das Protokoll in Abbildung 1 genutzt.

Schlussfolgerungen

Eine schnelle, zuverlässige und robuste Methode unter Verwendung einer Proteinfällungsextraktion, gefolgt von Agilent Bond Elut EMR—Lipid und einer EMR—Lipid-Feinaufreinigung, wurde für die Multirückstandsanalyse von Veterinärarzneimitteln in Rinderleber optimiert und validiert. Matrixeffekte wurden sorgfältig bewertet und mit der traditionellen C18 dSPE- und Zirkonoxid-Sorbens-Aufreinigung verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die optimierte EMR-Lipid-Methode eine bessere Matrixaufreinigung und exzellente Wiederfindung und Präzision für diese Art der Anwendung bietet.

Es muss angemerkt werden, dass die Proben vor der Injektion direkt mit Wasser verdünnt wurden, um die Proben für LC/MS/MS erfassbar zu machen und die Peak-Integrität für früh eluierende Analyten zu erhalten. Das von uns in dieser Studie verwendete LC/MS/MS-System bot adäquate Empfindlichkeit bei einer direkten Verdünnung mit Wasser, unter Einhaltung der

vorgeschriebenen Nachweisgrenze. Im Vergleich zur typischen Trocknen-und-Rekonstituieren-Methode führte dieser Arbeitsablauf zu einer signifikanten Zeit- und Aufwandsersparnis. Außerdem wurden potentielle Abweichungen und Analytverluste verhindert. Entspricht die Empfindlichkeit des Analysensystems bei der direkten Probenverdünnung nicht den gewünschten Anforderungen, sollte ein Probenkonzentrationsschritt am Ende dennoch in Betracht gezogen werden. Dies kann durch Probenverdampfung und Rekonstitution erreicht werden. Diese Applikation demonstriert, dass die selektive Matrixentfernung mit EMR-Lipid signifikante Vorteile für komplexe Proben wie Rinderleber aufweist. Dazu gehören reinere Proben und höhere Wiederfindung und Präzision für die Multirückstandsanalyse von Veterinärarzneimitteln.

Zukünftige Arbeiten werden sich mit anderen hochkomplexen, stark lipidhaltigen Matrices und Zielanalyten beschäftigen und die Vorteile von reinen Proben bei der Anwendung der verbesserten Matrixentfernung demonstrieren.

Literatur

1. Anon. *A Description of the U.S. Food Safety System, March 2000*; U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, Washington DC.
www.fsis.usda.gov/oa/codex/system.htm.
2. Anon. European Commission, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results; *Off. J. Eur. Comm.* **2002**, L122, 8.
3. Anon. *Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) set by Canada, May 2012*; Health Canada, Ottawa. www.hc-sc.gc.ca/dhp-mpps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.pdf.
4. Ellis, R. L. *Food Addit. Contam. A* **2008**, 25, 1432-1438.
5. Fagerquist, C. K.; Lightfield, A. R.; Lehotay, S. J. *Anal. Chem.* **2005**, 5, 1473-1482.
6. Mastovska, K.; Lightfield, A. R. J. *Chromatogr. A* **2008**, 1202, 118-123.
7. Geis-Asteggiante, L.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R.; Dulko, T.; Ng, C.; Bluhm, L. J. *Chromatogr. A* **2012**, 1258, 43-54.
8. Schneider, M. J.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 4423.
9. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013*; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.

Weitere Informationen

Diese Daten stellen typische Ergebnisse dar. Weitere Informationen zu unseren Produkten und Leistungen finden Sie auf unserer Website unter www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent haftet weder für hierin enthaltene Fehler noch für Neben- oder Folgeschäden in Zusammenhang mit der Bereitstellung, Leistung oder Verwendung dieses Materials.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Gedruckt in den USA,
30. Juli 2015
5991-6096DEE



Agilent Technologies