

## **5. Einbindung der Immunitätschromatographie in ein on-line-Verfahren für Penicillinrückstände**

### **5.1 Charakterisierung der verwendeten Affinitätsäule**

Da im Laufe dieser Arbeit keine Affinitätsäule mit genügend hoher Bindungskapazität hergestellt werden konnte, wurde auf eine Immunitätsäule zurückgegriffen, die uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer und Herrn Dr. E. Usleber vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Universität München zur Verfügung gestellt wurde.

Die dort verwendeten Antikörper sind durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Cloxacillin-Humanserumalbumin-Konjugat entwickelt worden. Die Antikörper wurden an cyanbromidaktivierte Sepharose gebunden und zeigten folgende Kreuzreaktivitäten (Cloxacillin = 100 %) [53]:

Oxacillin: 4 %

Dicloxacillin: 62 %

Märtlbauer und Usleber schlagen folgende Vorschrift für die Immunitätschromatographie vor:

- Lagerung, Probenaufnahme und Waschen und Equilibrieren der Säule mit PBS, pH 7,2
- Elution mit Glycinpuffer, pH 2,5 + Methanol (7 + 3, v/v)
- Regenerieren der Säule mit Glycinpuffer, pH 2,5

Für eine Säule mit einem Bettvolumen von 250 - 400 µl sollte die Elution mit 2,5 ml Elutionspuffer erfolgen.

Eigene Untersuchungen zeigten, daß 2,5 ml zur vollständigen Elution nicht ausreichen, es sind mindestens 5 ml erforderlich. Später stellte sich heraus, daß die Elution mit diesem Puffer nicht quantitativ ist: Mit dem testweise eingesetzten Elutionspuffer aus Glycinpuffer, pH 3,0 + Acetonitril (9 + 1, v/v) ließen sich größere Mengen der Analyten eluieren, auch wenn vorher kein Penicillin mehr aufgegeben wurde. In den folgenden Untersuchungen wurde daher dieser Puffer zur Elution verwendet. Auf die Regeneration wurde verzichtet.

Zur Ermittlung der Säulenkapazität wurden 1 µg Cloxacillin (1 µg/ml PBS) auf die Säule aufgegeben und mit 5 ml PBS nachgewaschen. Die Aufgabe- und Waschpuffer sowie die Elutionsfraktionen wurden getrennt gesammelt, nach Extraktion mit Dichlormethan und Aufkonzentrieren wurde mit Brommethylmethoxycumarin derivatisiert und per HPLC analysiert.

In den einzelnen Fraktionen wurden folgende Mengen an Cloxacillin nachgewiesen:

nichtgebundene Fraktion + Waschfraktion I:	281 ng
Waschfraktion II:	-
Elutionsfraktion I:	446 ng
Elutionsfraktion II:	423 ng
Elutionsfraktion III:	-
Summe:	1150 ng

Die Säule konnte bei einem Bettvolumen ca. 250 µl rund 870 ng Cloxacillin binden.

Im Laufe dieser Arbeit wurde die IgG-Affinitätssäule ungefähr 300 Analysenläufen unterzogen, davon ungefähr die Hälfte mit Extrakten aus Muskelfleisch, Leber und Milch und die andere Hälfte mit Standardlösungen. Der Betrieb der Säule erfolgte bei Raumtemperatur mit ungekühlten Puffern. Nach ca. 200 Zyklen ließ die Bindungsfähigkeit langsam nach, sie war jedoch nach 250 - 280 Zyklen noch uneingeschränkt brauchbar. Erkennbar war dieses durch eine langsame Verringerung der erhaltenen Peakflächen, die eine häufige Kontrolle mit externem Standard notwendig machte. Im Laufe der letzten Zyklen wurde die Bindungsfähigkeit so weit reduziert, daß die Säule unbrauchbar wurde.

## 5.2 Einbindung der Immunaффinitätssäule in ein hochdruckflüssigchromatographisches Verfahren

Die Immunaффinitätschromatographie (IAC) sollte unter dem Aspekt der Automatisierbarkeit und der besseren Reproduzierbarkeit in die HPLC eingebunden werden. Die Apparatur mußte daher folgende Elemente enthalten:

- die Immunaффinitätssäule
- ein Aufgabegerät für große Puffervolumina für die IAC
- eine automatische Festphasenextraktion zur Anreicherung der Penicilline aus dem IAC-Eluat
- die HPLC-Anlage mit einem genügend nachweisstarken Detektionssystem

Zur automatischen Festphasenextraktion stand der On-line Sample Preparator (OSP-2) der Firma Merck zur Verfügung. Dabei erfolgt die Anreicherung an einer Vorsäule mit den Maßen 4 mm x 4 mm i.D., die mit LiChrosorb C-18, 5 µm gefüllt war. Nach der Anreicherung wird die Säule automatisch mechanisch in den HPLC-Kreislauf gebracht.

Bei der Verknüpfung der Immunaффinitätschromatographie mit der Hochdruckflüssigchromatographie mußte beachtet werden, daß die Immunaффinitätssäule aufgrund des Agarose-Trägermaterials nicht druckstabil ist. Bei der Anreicherung am OSP-2 wird aber ein Rückdruck von ca. 14 bar bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min aufgebaut. Das Eluat der Affinitätssäule mußte daher zunächst von einer Probenschleife aufgenommen werden, bevor die darin enthaltenen Penicilline an der automatischen Festphasenextraktion angereichert werden konnten.

Die Detektion erfolgte bei Milch- und Muskeluntersuchungen durch einen UV-Detektor bei 230 nm. Bei der Analyse von Penicillinen aus Leber wurde zwischen analytische Säule und Detektor ein Photoreaktor geschaltet. Darin wurde das Eluat mit 254 nm bestrahlt. Die Isoxazolympenicilline entwickeln unter diesen Bedingungen ein Nebenmaximum bei 300 nm, das zur Detektion herangezogen wurde [46, 189]. Die Versuchsanordnung mit eingebautem Photoreaktor kann auch zur Analyse von Milch- und Muskelproben beibehalten werden, wenn die UV-Lampe des Photoreaktors nicht eingeschaltet wird. Die Analysenzeiten verlängern sich dann lediglich um 2,5 Minuten pro Lauf. Die Steuerung der gesamten Anlage wurde vom Controller L-5000 übernommen, dessen Programmierung im Anhang I.5 dargestellt ist.

Die Puffer- und Probenextraktlösungen wurden ausschließlich mit einem Dilutor auf die Immunaффinitätssäule gegeben. Dessen Programmierung ist im Anhang I.4 abgedruckt.

### 5.3 Nachweis von Penicillinrückständen in Lebensmitteln

#### 5.3.1 Das Dotieren der Matrices

Das Dotieren der Matrices erfolgte so, daß die Integrität der Probe durch den Dotiervorgang möglichst wenig beeinträchtigt wurde. Die Analyten wurden daher in Wasser (physiologisches Lösungsmittel, Hauptbestandteil der Proben) gelöst. Die maximale Zugabemenge betrug 2 % der Probeneinwaage. Durch Einarbeiten der Analyten in die Matrix sollte annähernd ein gewachsener Rückstand simuliert werden. Ergänzend dazu wurde vor der Extraktion eine Standzeit von 10 - 15 min bei Raumtemperatur eingehalten.

#### 5.3.2 Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Bestimmungsverfahrens

Bei dieser Bestimmung wurde sowohl die Immunaффinitätschromatographie, die Anreicherung als auch die anschließende HPLC mit Detektion bei 230 nm berücksichtigt. Die Extraktion der Analyten aus der Lebensmittelmatrix sollte hier nicht betrachtet werden. In den folgenden Untersuchungen wurde Cloxacillin als wichtigster Vertreter der Isoxazolylpenicilline ausführlich untersucht, Oxacillin und Dicloxacillin wurden lediglich modellhaft betrachtet. Zur abschließenden Beurteilung der erhaltenen quantitativen Daten sind daher noch weitere Untersuchungen erforderlich. Die Reproduzierbarkeit wurde mit Cloxacillin ermittelt, indem von einer Standardlösung, die einer Probenkonzentration von 300 µg/kg entsprach (37,5 ng/10 ml Extrakt), neun Aliquots (je 10 ml) auf die Immunaффinitätssäule gegeben wurden. Folgende Werte wurden ermittelt (Tab. 5-1).

**Tab. 5-1:** Reproduzierbarkeit des Bestimmungsverfahrens (ohne Extraktion)

Anzahl der Analysen	9
Mittelwert	22449 µVs
Standardabweichung	683 µVs
Variationskoeffizient	3,0 %
Wiederfindung	68 %

#### 5.3.3 Nachweis von Penicillinrückständen in Milch

Die Milch wurde durch Zentrifugation bei 4 °C entfettet und mittels Ultrafiltration deproteiniert. Als Ausschlußvolumen erwiesen sich 30 kDa als ausreichend. Die Abtrennung von Penicillinen aus Milch durch Ultrafiltration wurde bereits von Tyczkowska et al. [190] beschrieben. Die Arbeitsgruppe verwendete ein Ausschlußvolumen von 10 kDa und stellten Verluste von bis zu 50 % bei Benzylpenicillin fest. Zur Verbesserung der Ausbeute setzten Tyczkowska et al. ein Gemisch von Acetonitril, Methanol und Wasser zu. Diese Maßnahme verursachte in eigenen Untersuchungen Störungen im Chromatogramm.

Es zeigte sich auch, daß eine Erhöhung der Extraktionsausbeute nicht notwendig war, da sie für alle drei Isoxazolylpenicilline befriedigend war (Tab. 5-2). Die Nachweisgrenze wurde auf Basis des dreifachen Grundrauschens abgeschätzt.

**Tab. 5-2:** Wiederfindung und abgeschätzte Nachweisgrenze der Isoxazolyl penicilline aus Milch (30 µg/kg)

	Wiederfindung	Nachweisgrenze
Oxacillin	90 %	3 µg/kg
Cloxacillin	83 %	2 µg/kg
Dicloxacillin	62 %	9 µg/kg

Die vorhergehende Entfettung verbessert die Analysenresultate nicht, sie wurde aber trotzdem durchgeführt, um die Ultrafiltrationsmembran, die mehrfach verwendet wurde, nicht unnötig zu belasten und die Reinigung zu erleichtern. Bei Verwendung von Einmal-Filtrationseinheiten kann auf die Entfettung ohne weiteres verzichtet werden.

Bei der Grenzwertkonzentration von 30 µg/kg Cloxacillin wurden bei einer Wiederholungsbestimmung von 6 Milchproben folgende Daten erhalten (Tab. 5-3).

**Tab. 5-3:** Reproduzierbarkeit der Cloxacillinbestimmung aus Milch (30 µg/kg)

Anzahl der Analysen	6
Mittelwert	19627 µVs
Extraktionsausbeute	83 %
Standardabweichung	1763 µVs
Variationskoeffizient	9,0 %

Die Abbildungen 5-1 (a) - (d) zeigen die erhaltenen Chromatogramme aus Milch nach Ultrafiltration mit einem Ausschlußvolumen von 30 kDa. Vor der Ultrafiltration wurde die Milch durch Zentrifugation entfettet. 1 ml des klaren Filtrates wurden auf 10 ml verdünnt und auf die Affinitätssäule aufgegeben. Das entspricht einer Absolutmenge von 30 ng Penicillin. Die Detektion erfolgte im UV bei 230 nm. Das Signal bei 16,5 min in allen Chromatogrammen stammt aus dem Acetonitril des Elutionspuffers, mit dem die SPE-Kartusche konditioniert wurde. Es läßt sich durch die Verwendung von Acetonitril höherer Reinheit eliminieren.

Die Penicillinkonzentrationen lagen bei je 30 µg/kg, das entspricht dem zur Zeit gültigen EG-Grenzwert.

Da die Immunaффinitätschromatographie ein sehr spezifisches Reinigungsverfahren darstellt, erschien eine Vorreinigung der entfetteten Milch durch Abtrennung der Proteine zunächst unnötig. Erste Experimente, in denen entfettete Milch direkt auf die Immunaффinitätssäule gegeben wurde, zeigten aber, daß das resultierende Chromatogramm so starke Störungen zeigte, daß eine Erfassung der Penicilline nicht möglich war. Auch die Photoderivatisierung mit anschließender Fluoreszenzdetektion

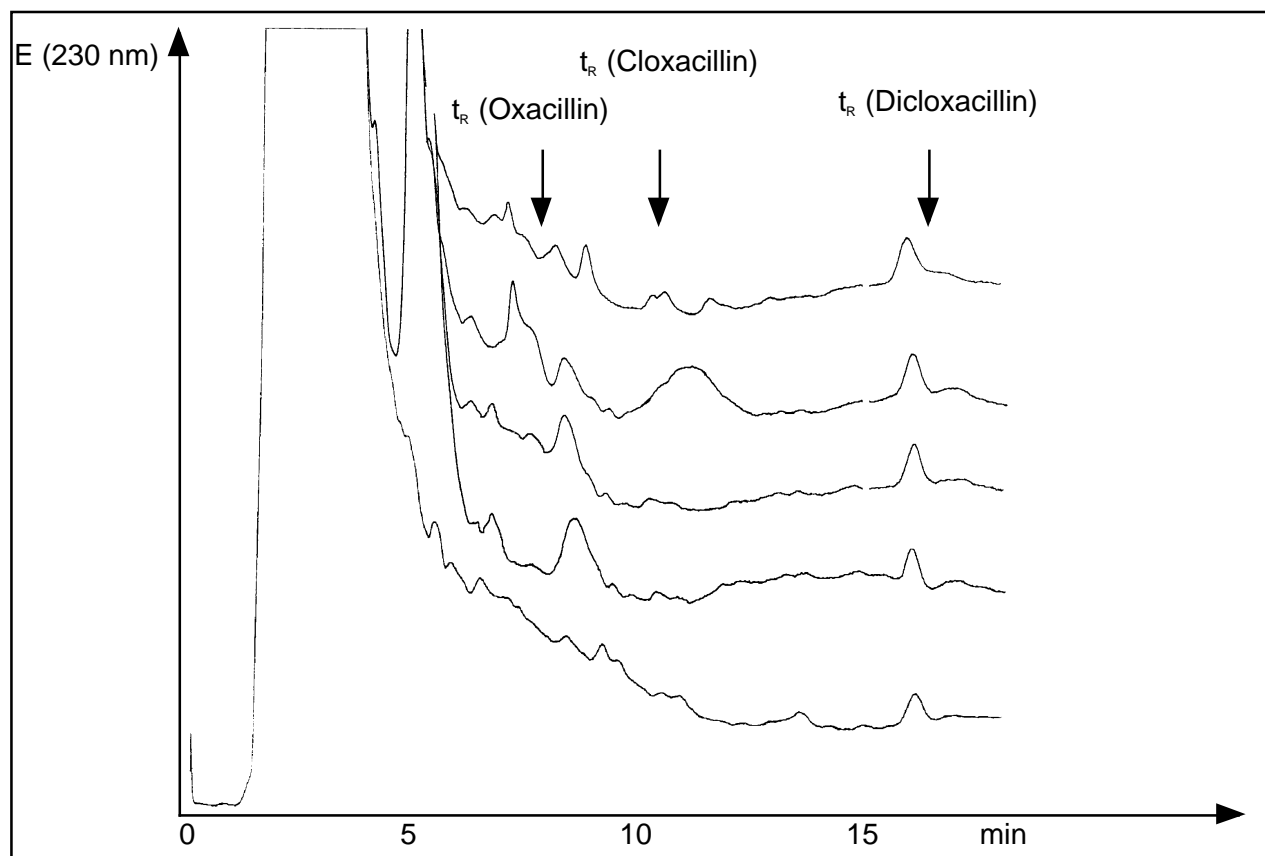


Abb. 5-1 (a): Milch, **Blindproben** nach Ultrafiltration (MWCO 30.000); Detektion: UV 230 nm

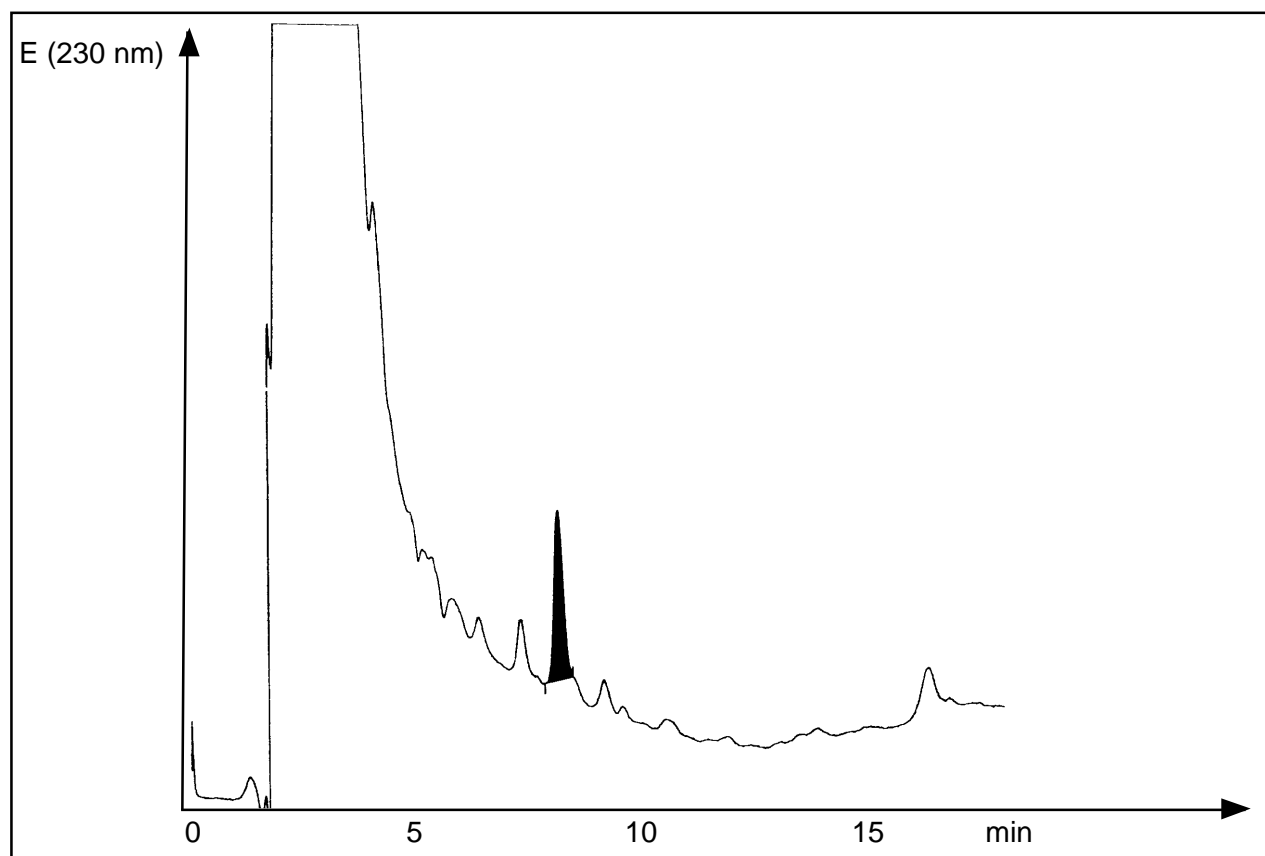
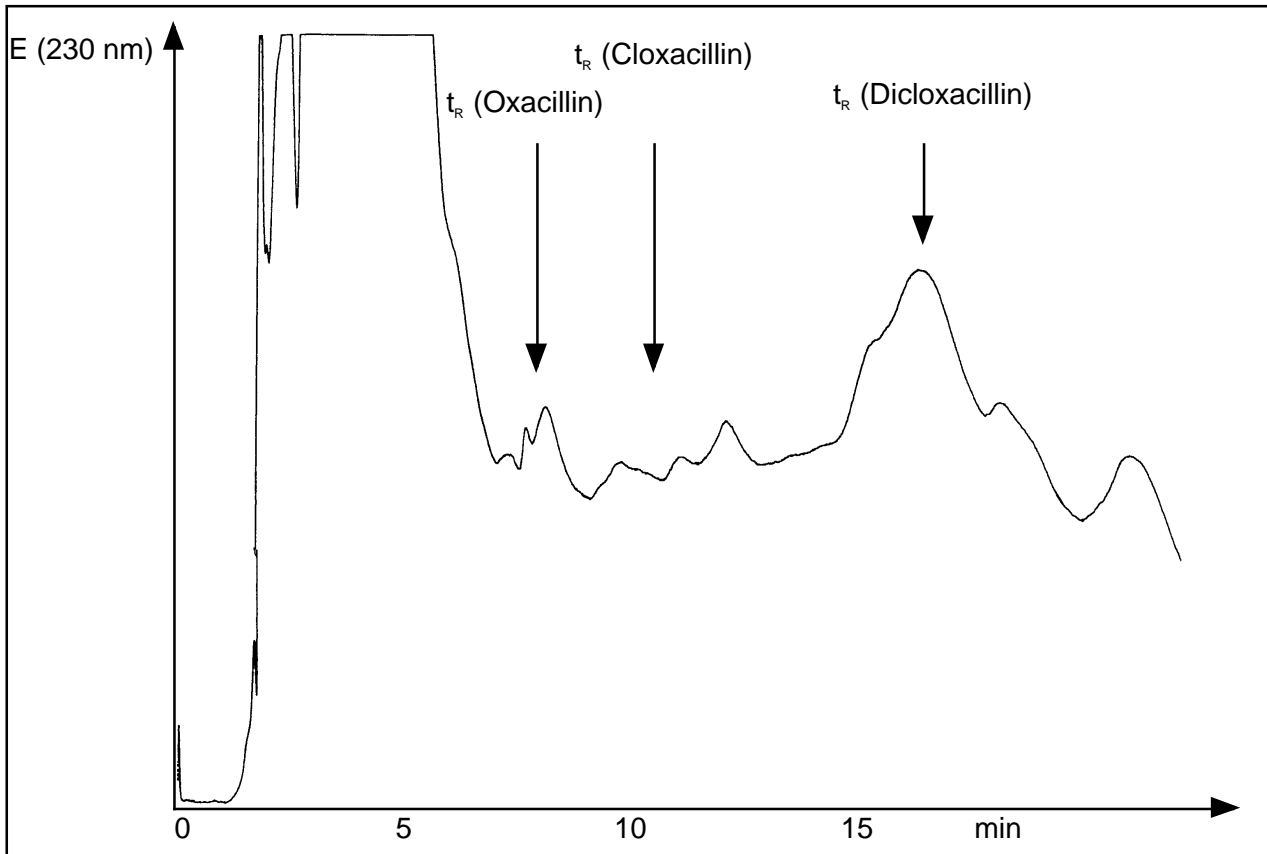
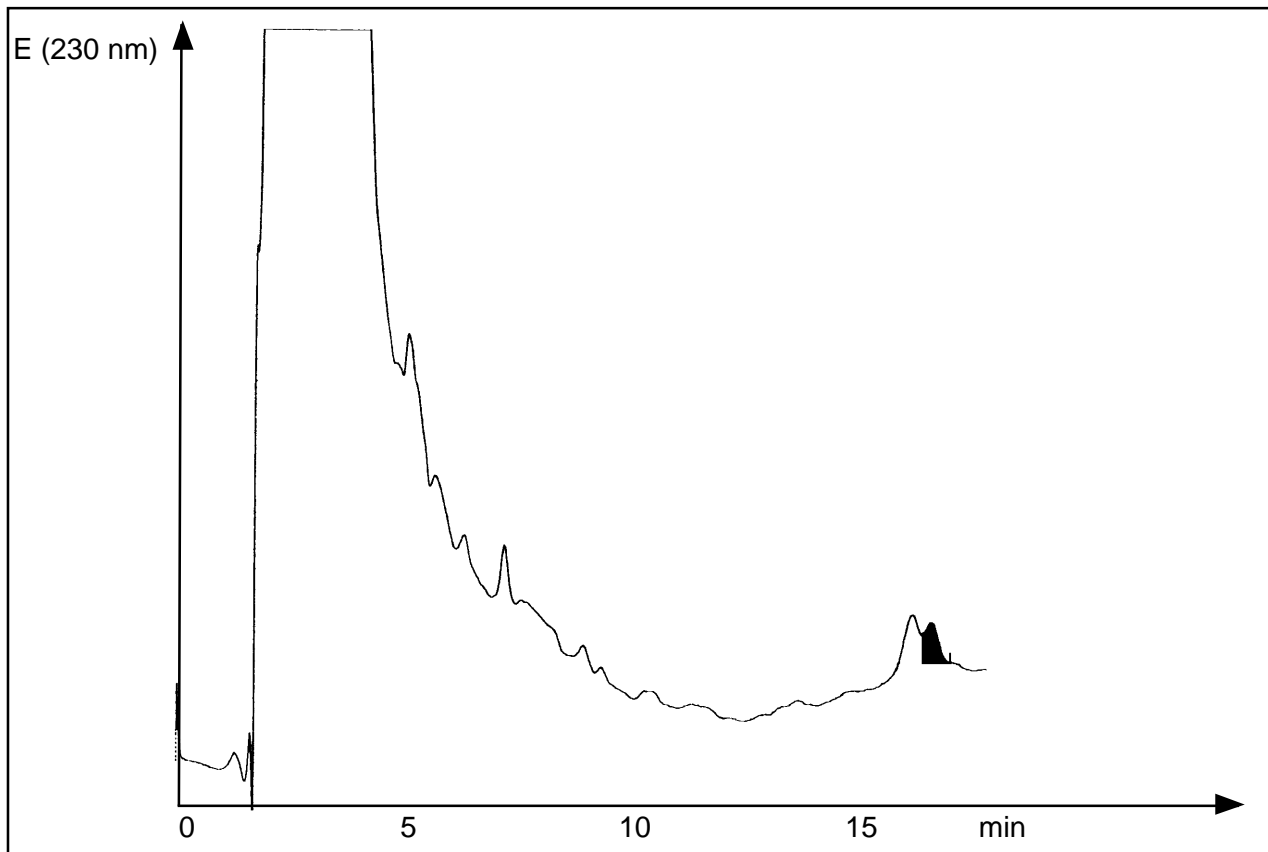


Abb. 5-1 (b): Milch, dotiert mit 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  **Oxacillin** nach Ultrafiltration (MWCO 30.000); Detektion: UV 230 nm



**Abb. 6-3:** entfettete Milch, Blindprobe **ohne Ultrafiltration**; Detektion: UV 230 nm



**Abb. 5-1 (d):** Milch, dotiert mit 30 µg/kg **Dicloxacillin** nach Ultrafiltration (MWCO 30.000); Detektion: UV 230 nm

(Anregung bei 300 nm, Emission bei 400 nm) [46, 189] brachte keine Abhilfe.

Die Fällung der Proteine mit Acetonitril (10 ml Milch + 10 ml Acetonitril) ergab kein besseres Ergebnis.

### 5.3.4 Nachweis von Penicillinen in Rindermuskel

Bei der Extraktion von Rindermuskel wurde zunächst eine rein wäßrige Extraktion getestet, da der Extrakt zur Aufgabe auf die Affinitätschromatographie keine hohen Anteile an organischen Lösungsmitteln enthalten durfte. Ausgangspunkt für die Untersuchungen waren die Arbeiten von Agasøster [191] und Aerts [192], die die Reinigung der Probenextrakte mittels Dialyse vornahmen und deshalb kein organisches Lösungsmittel einsetzen durften, sondern zur Extraktion physiologische Kochsalzlösung verwendeten. Auf die Homogenisierung mit einem Dispergiergerät (Ultra Turrax) wurde in eigenen Arbeiten allerdings verzichtet, um eine zu starke Zerkleinerung des Fleisches zu vermeiden. Die feinen Gewebsfragmente könnten möglicherweise durch Zentrifugation nicht abgetrennt werden und führten anschließend zu einer Verstopfung der Affinitätssäule. Die Extraktion wurde daher sicherheitshalber ausschließlich im Ultraschallbad vorgenommen. Die Tabelle 5-4 zeigt die verwendeten Extraktionslösungen und die damit erzielten Extraktionsausbeuten für Cloxacillin. Es wurden jeweils 5 g Muskelfleisch in einem Universalzerkleinerer zerkleinert und nach der im Kapitel 8.16 abgedruckten Vorschrift mit 300 µg/kg Cloxacillin dotiert. Die Zugabe von 2 ml Hexan erleichterte die Abtrennung der Fettphase.

**Tab. 5-4:** Extraktion von Muskelfleisch vom Rind, dotiert mit 300 µg/kg Cloxacillin

Extraktionslösung	Menge	Chromatogramm	Ausbeute
Natriumchloridlösung (0,9 g/100 ml)	10 ml	störungsfrei	25 %
Natriumchloridlösung (0,9 g/100 ml)	2 x 5 ml	störungsfrei	35 %
Phosphatpuffer, pH 2,2, 0,5 mol/l	10 ml	störungsfrei	45 %
Acetonitril	2 x 5 ml	störungsfrei	50 %
Natriumchloridlösung/Acetonitril (1 + 1)	2 x 5 ml	störungsfrei	81 %
Phosphatpuffer pH 2,2/Acetonitril (1 + 1)	2 x 5 ml	*)	83 %

\*) es bildeten sich zwei flüssige Phasen, die beide Cloxacillin enthielten. Die untere zeigte Störungen, die obere war störungsfrei.

Für die weiteren Untersuchungen wurden jeweils 5 g Muskelfleisch mit 2 x 5 ml Natriumchloridlösung/Acetonitril (1 + 1, v/v) extrahiert.

Die erzielten Wiederfindungsraten sowie die abgeschätzten Nachweisgrenzen (dreifaches Grundrauschen) sind in Tabelle 5-5 wiedergegeben.

**Tab. 5-5:** Wiederfindung und abgeschätzte Nachweisgrenze der Isoxazolpenicilline aus Muskelfleisch vom Rind (300 µg/kg)

	Wiederfindung	Nachweisgrenze
Oxacillin	54 %	40 µg/kg
Cloxacillin	89 %	30 µg/kg
Dicloxacillin	66 %	80 µg/kg

Bei der Wiederholungsmessung von mehreren Muskelfleischproben mit je 300 µg/kg Cloxacillin ergaben sich folgende Daten für die Reproduzierbarkeit (Tabelle 5-6).

**Tab. 5-6:** Reproduzierbarkeit der Cloxacillinbestimmung aus Rindermuskel (300 µg/kg)

Anzahl der Analysen	6
Mittelwert	23402 µVs
Extraktionsausbeute	89 %
Standardabweichung	342,4 µVs
Variationskoeffizient	1,5 %

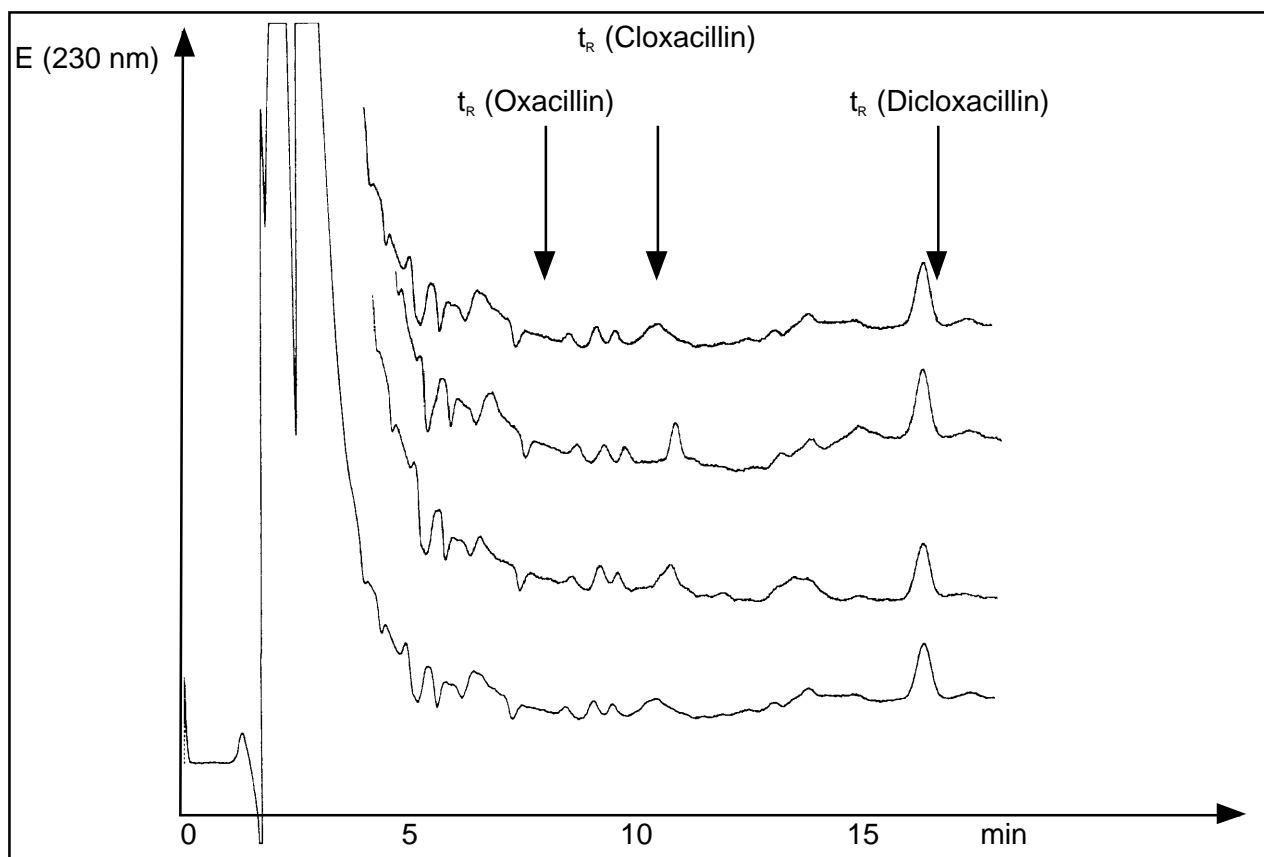
Die Abbildungen 5-2 (a) - (d) zeigen die Chromatogramme zur Bestimmung der Isoxazolympenicilline aus Rindermuskel bei einer Konzentration von 300 µg/kg. Auch hier stammt das in allen Chromatogrammen auftauchende Signal bei 16,5 min aus dem zur Konditionierung der SPE-Kartusche verwendeten Acetonitril. Bei Verwendung von Acetonitril, das mit anderen Verfahren als der Destillation über Kaliumcarbonat gereinigt wurde, tritt dieses Signal nicht mehr auf.

### 5.3.5 Nachweis von Penicillinrückständen in Rinderleber

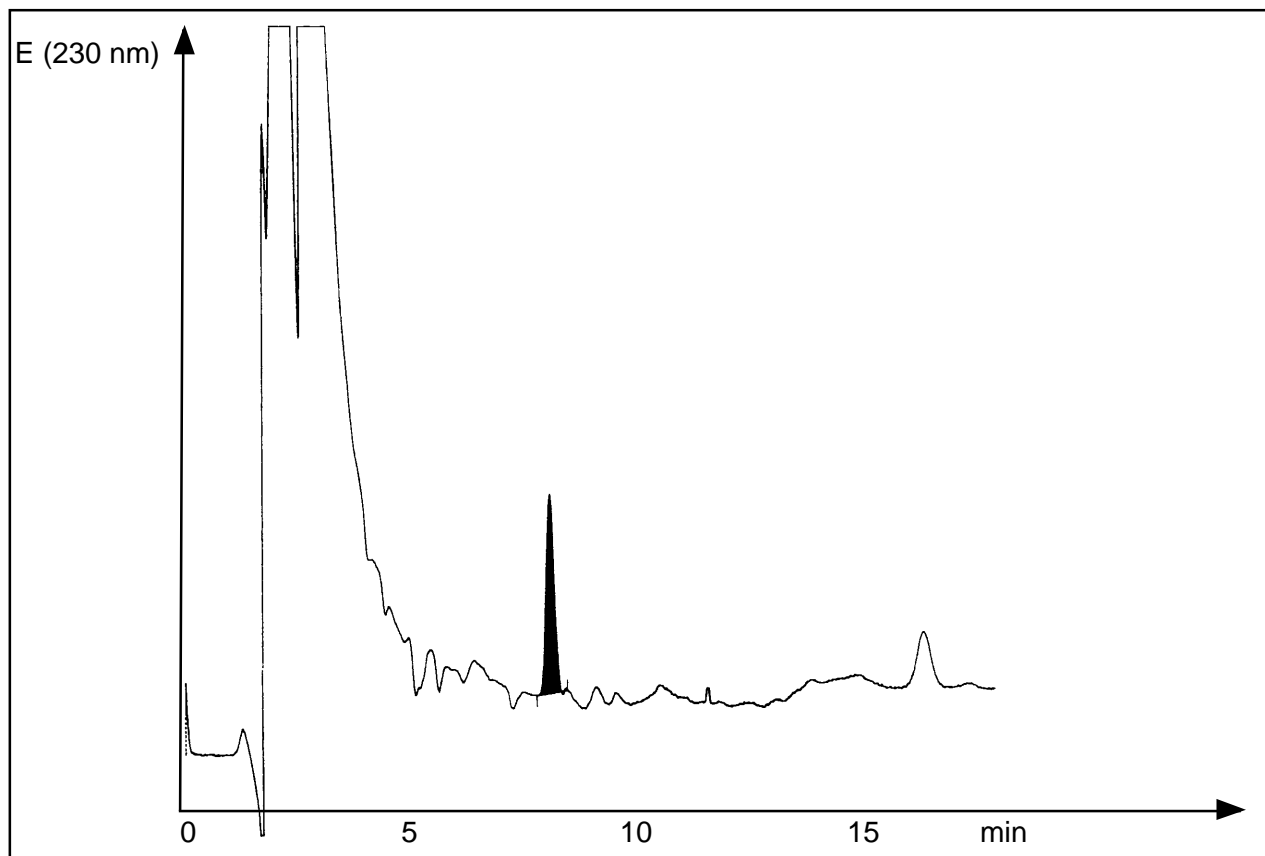
Für die Extraktion von Leber wurden die Bedingungen der Muskelfleischextraktion übernommen. Allerdings erwies sich die Detektion im UV bei 230 nm als unbrauchbar (Abb. 5-3).

Daher wurde eine photochemische Nachsäulenderivatisierung nach [46, 189] mit Detektion bei 300 nm eingesetzt. Dadurch wird die Detektion zwar um den Faktor 2 - 4 unempfindlicher, jedoch ermöglicht die erhöhte Selektivität der Detektion eine ungestörte Detektion der Analyten. Der Empfindlichkeitsverlust der Detektion konnte durch Verdoppelung der Rohextraktmenge, die zur Immunoaffinitätschromatographie eingesetzt wurde (500 µl statt 250 µl), sowie durch Verringerung der Integratorabschwächung um eine Stufe ausgeglichen werden. Die erzielten Wiederfindungsraten und die auf der Basis des dreifachen Grundrauschens abgeschätzten Nachweisgrenzen sind in Tabelle 5-7 aufgelistet. Die Reproduzierbarkeit wurde aus acht Wiederholungsanalysen ermittelt (Tab. 5-8).

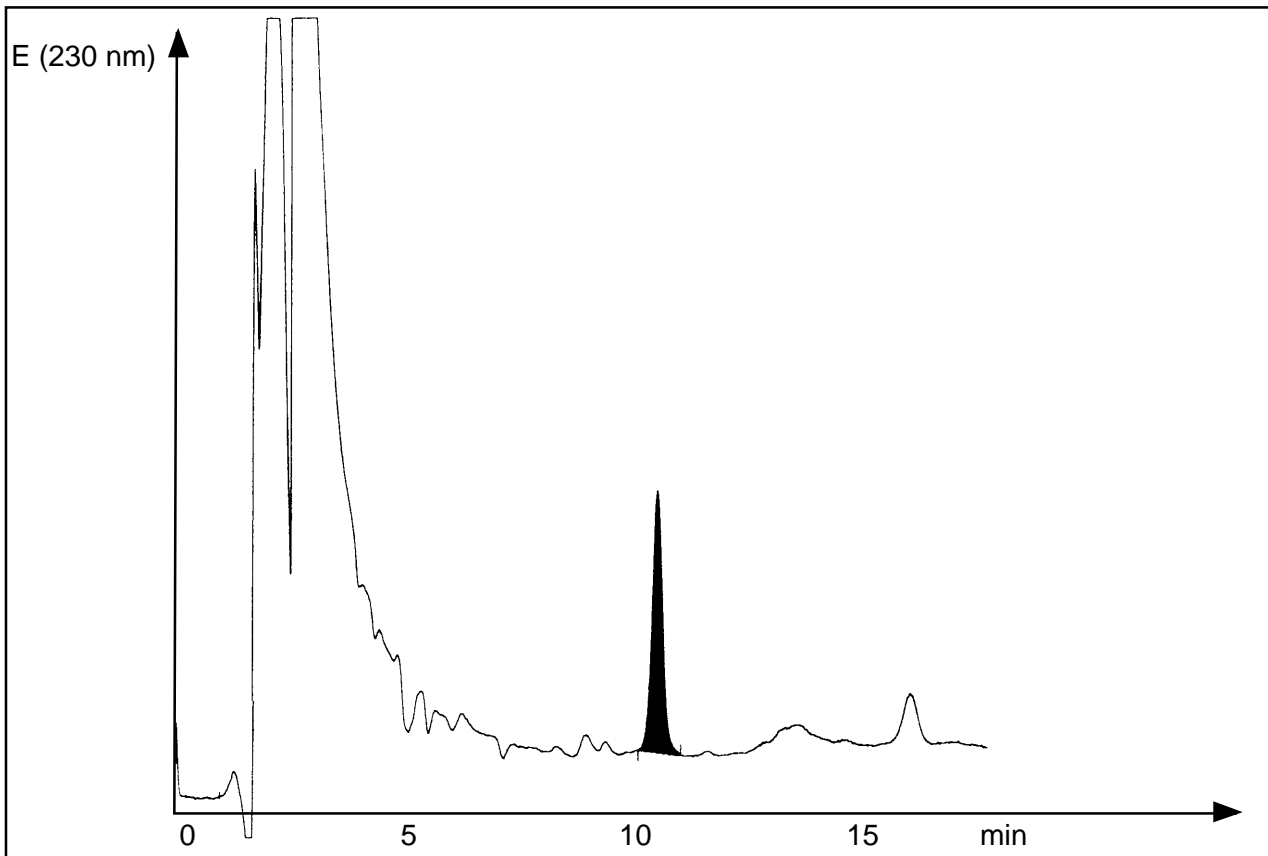
In den Abbildungen 5-4 (a) - (d) sind die Chromatogramme zur Bestimmung der Penicilline aus Rinderleber bei 300 µg/kg wiedergegeben.



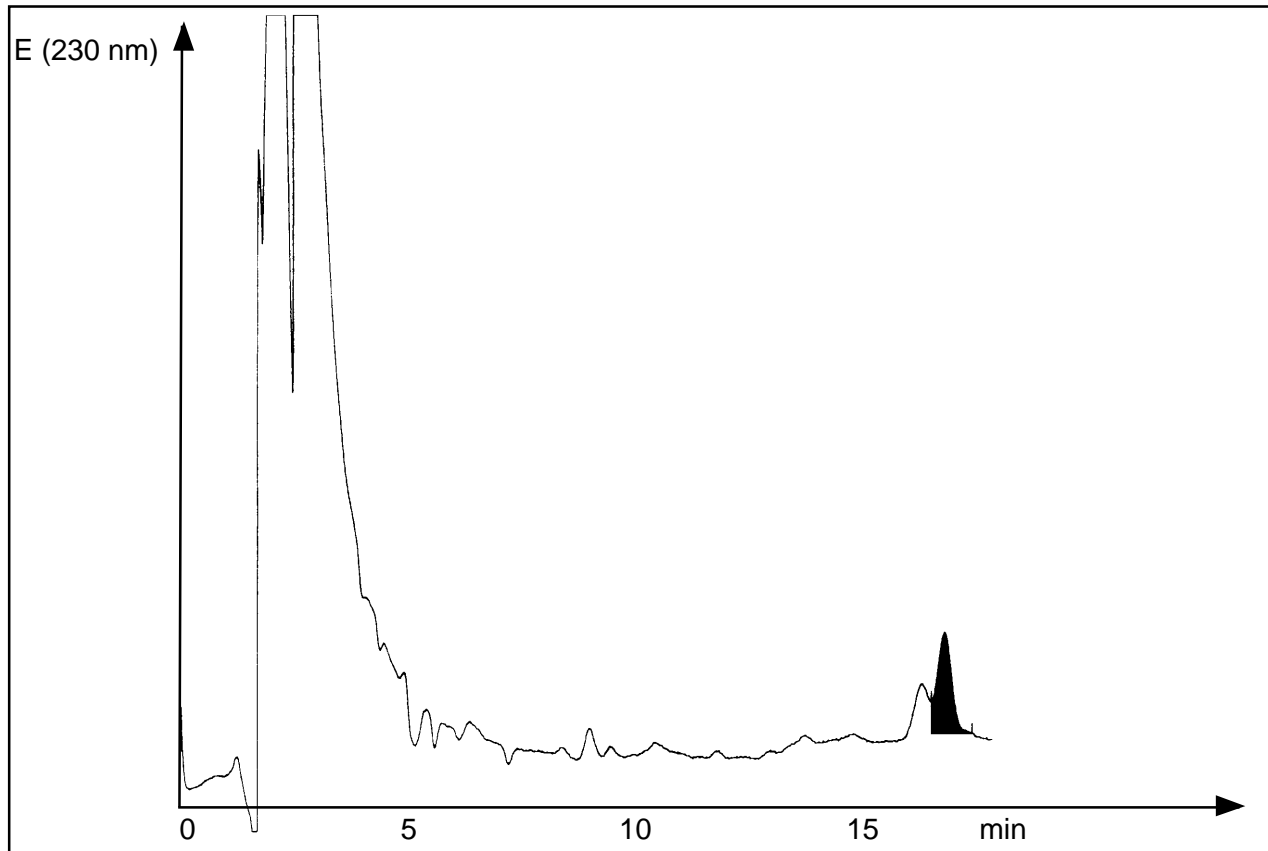
**Abb. 5-2 (a):** Muskelfleisch von Rind , **Blindproben**, extrahiert mit NaCl/MeCN (50 + 50);  
Detektion: UV 230 nm



**Abb. 5-2 (b):** Muskelfleisch von Rind , dotiert mit 300 µg/kg **Oxacillin**,  
extrahiert mit NaCl/MeCN (50 + 50); Detektion: UV 230 nm



**Abb. 5-2 (c):** Muskelfleisch vom Rind , dotiert mit 300 µg/kg **Cloxacillin**, extrahiert mit NaCl/MeCN (50 + 50), Detektion: UV 230 nm



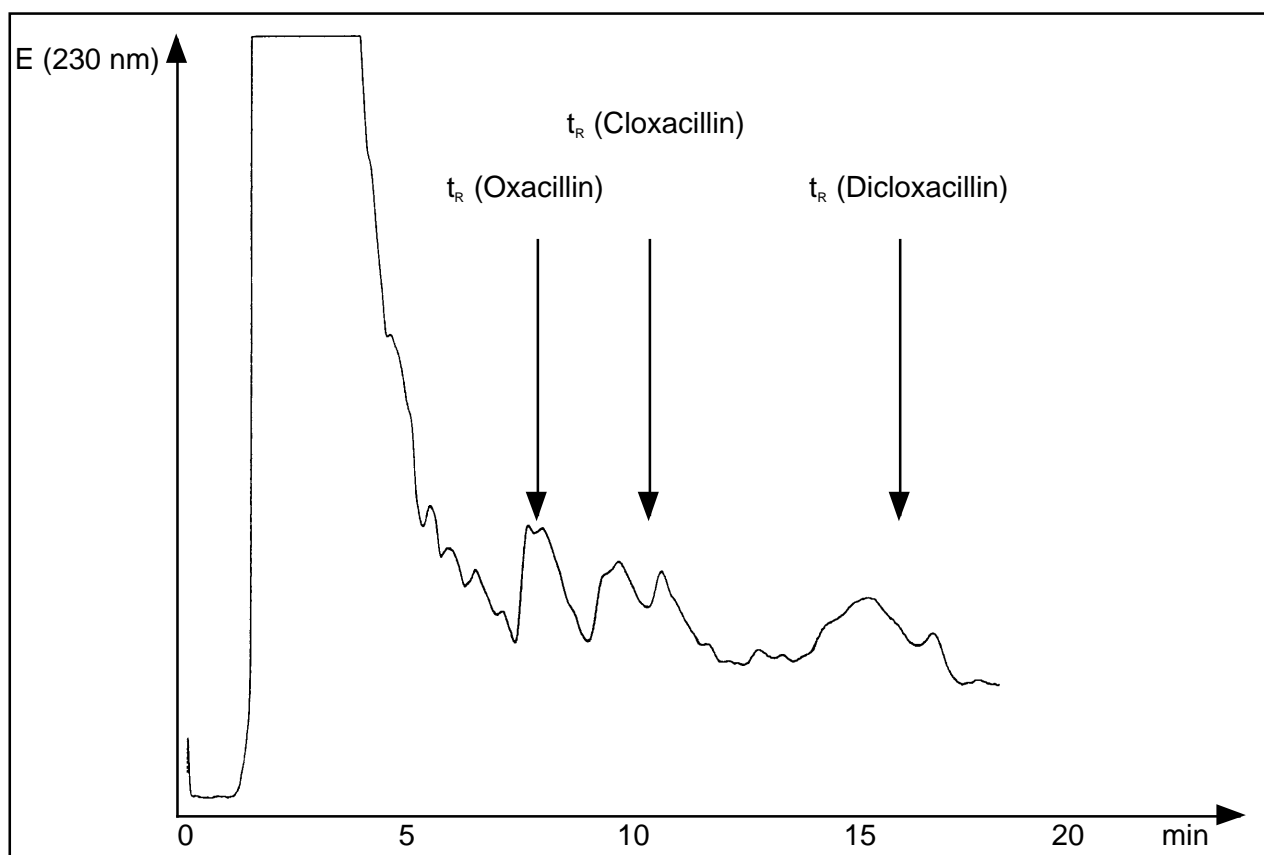
**Abb. 5-2 (d):** Muskelfleisch vom Rind , dotiert mit 300 µg/kg **Dicloxacillin**, extrahiert mit NaCl/MeCN (50 + 50); Detektion: UV, 230 nm

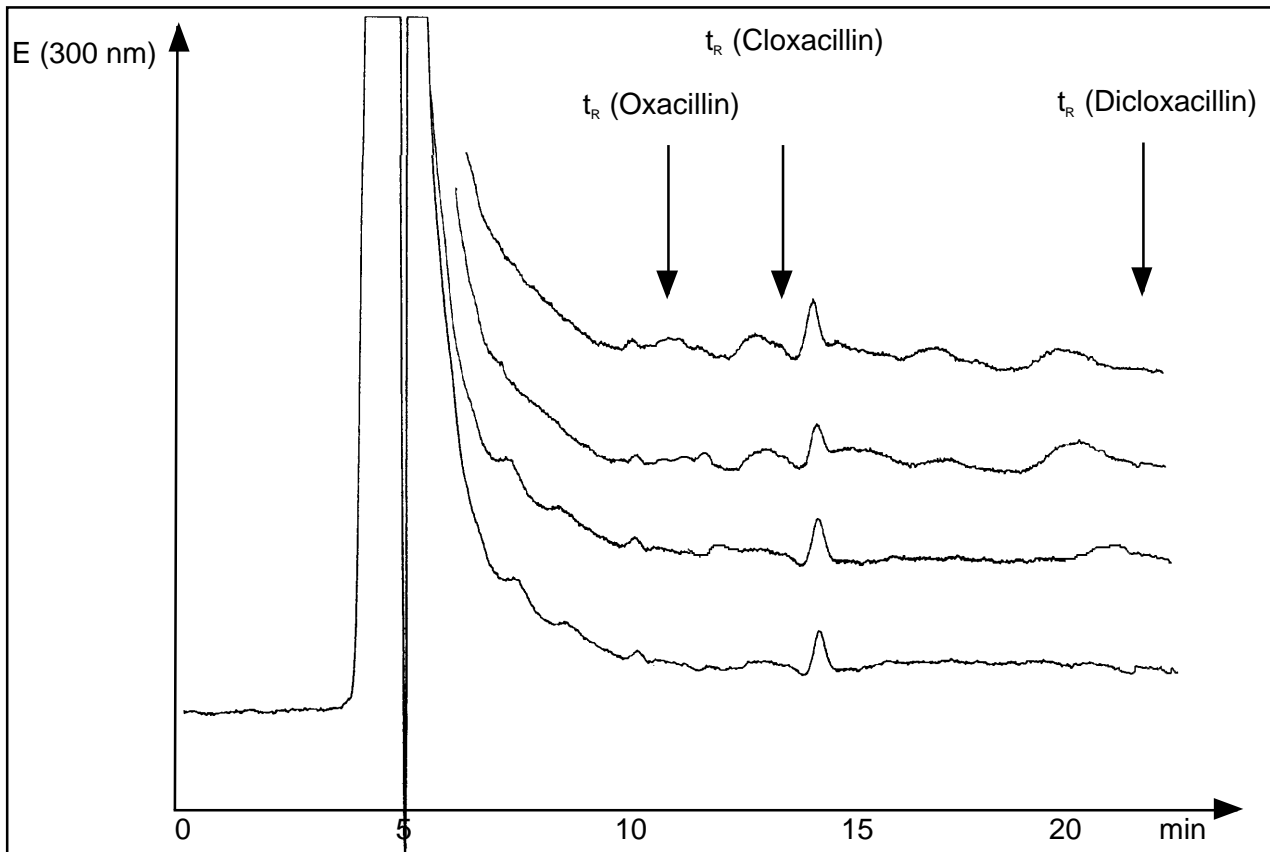
**Tab. 5-7:** Wiederfindung und abgeschätzte Nachweisgrenze der Isoxazolpenicilline aus Rinderleber (300 µg/kg)

	Wiederfindung	Nachweisgrenze
Oxacillin	60 %	150 µg/kg
Cloxacillin	65 %	140 µg/kg
Dicloxacillin	60 %	225 µg/kg

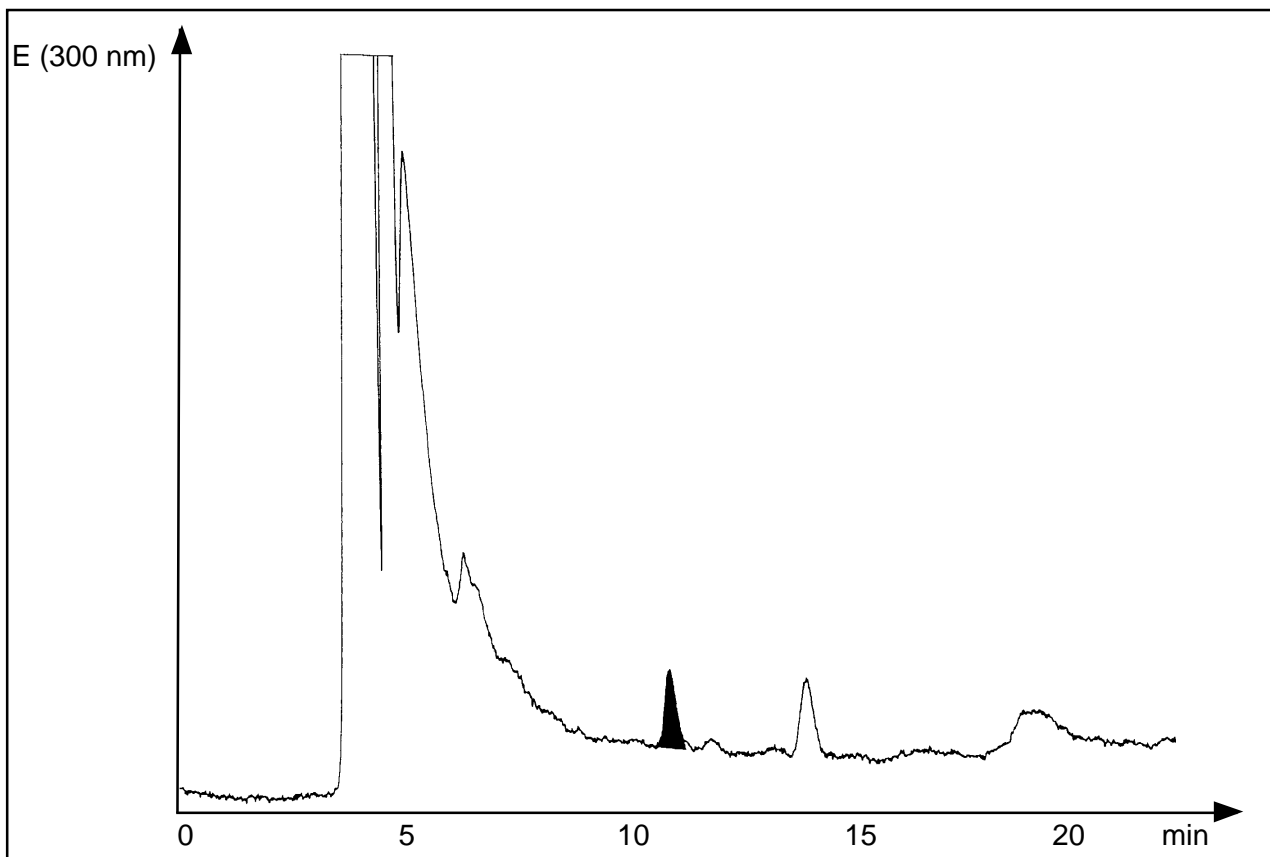
**Tab. 5-8:** Reproduzierbarkeit der Cloxacillinbestimmung aus Rinderleber (300 µg/kg)

Anzahl der Analysen	8
Mittelwert	3510 µVs
Extraktionsausbeute	65 %
Standardabweichung	226,6 µVs
Variationskoeffizient	6,5 %

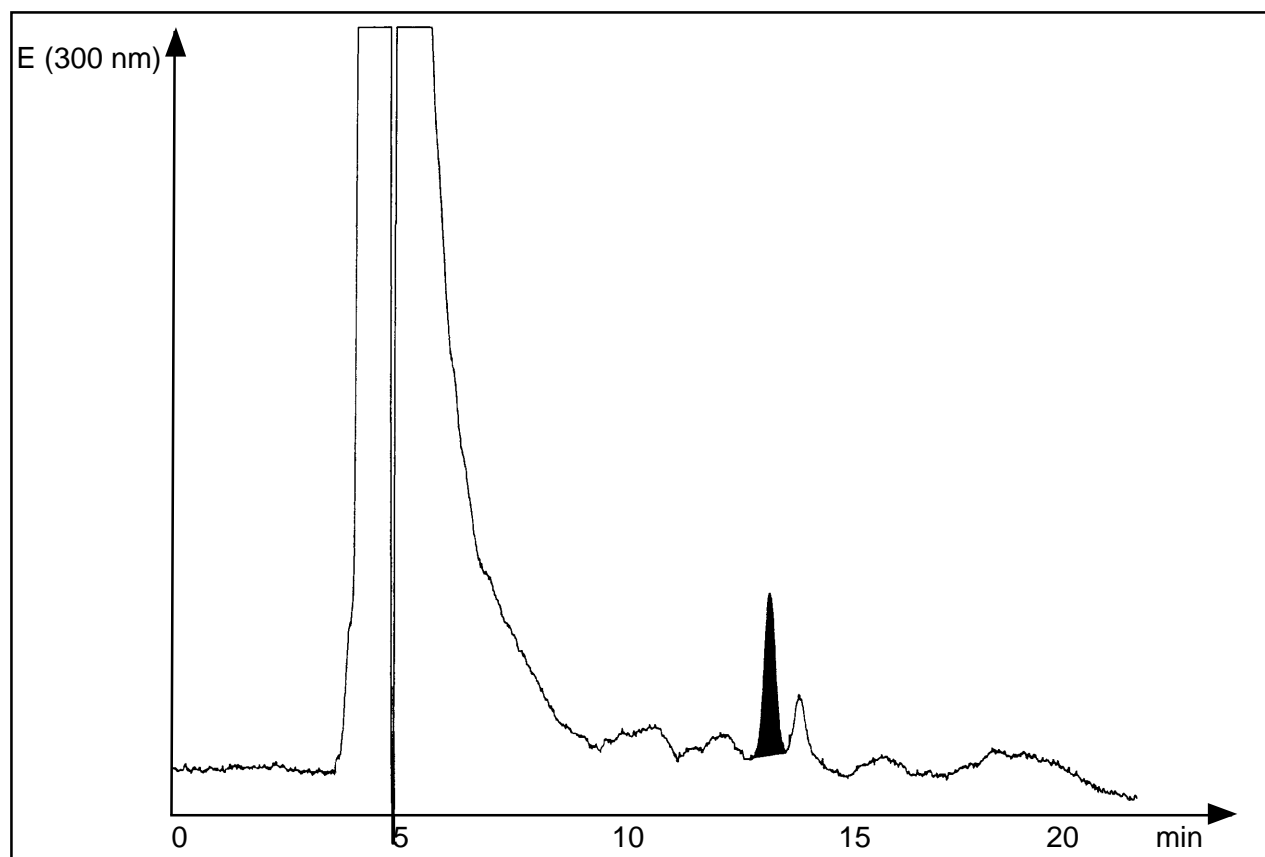
**Abb. 5-3:** Rinderleber, **Blindprobe**, extrahiert mit NaCl/MeCN (50 + 50); Detektion: UV 230 nm



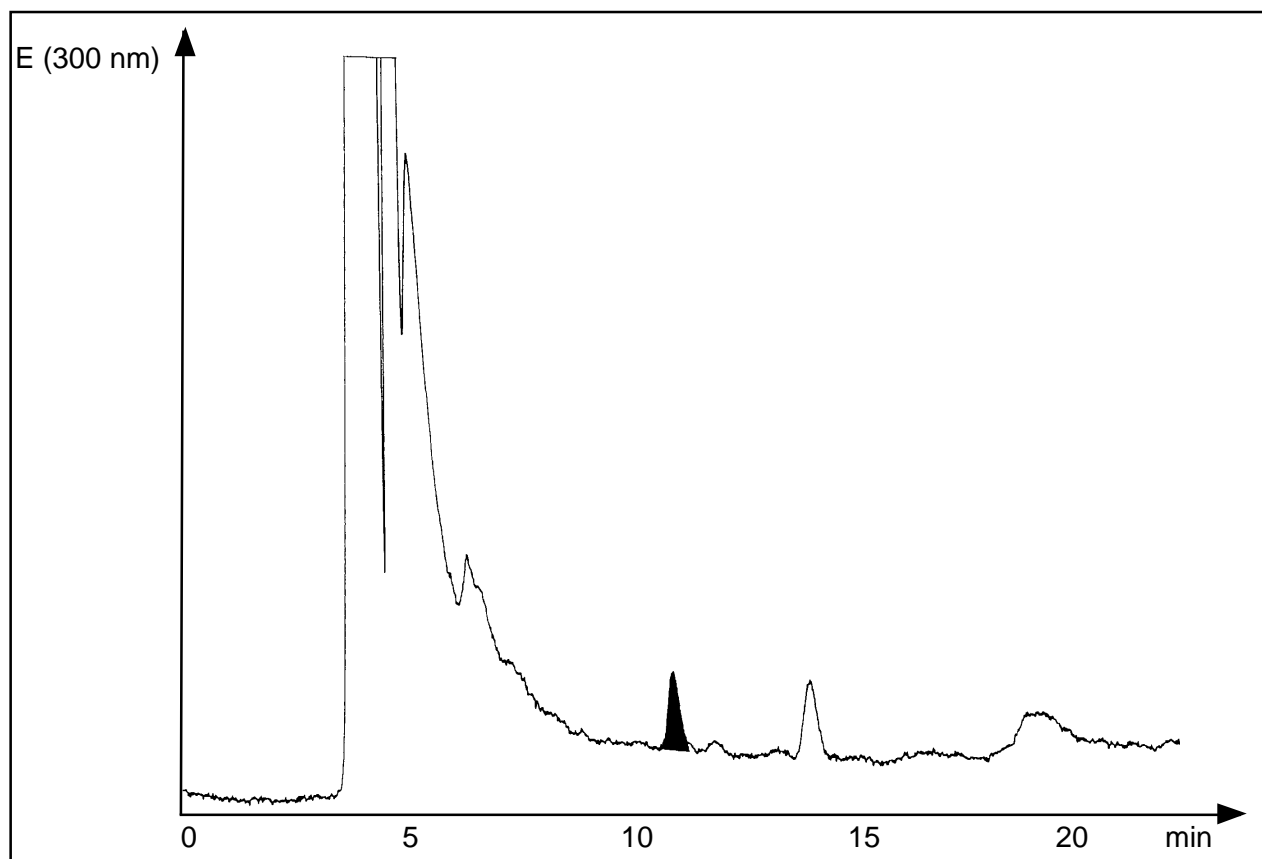
**Abb. 5-4 (a):** Rinderleber, **Blindproben**, extrahiert mit NaCl/MeCN (50 + 50);  
 Detektion: UV 300 nm nach photochemischer Nachsäulenderivatisierung



**Abb. 5-4 (b):** Rinderleber, 300 µg/kg **Oxacillin**, extrahiert mit NaCl/MeCN (50 + 50);  
 Detektion: UV 300 nm nach photochemischer Nachsäulenderivatisierung



**Abb. 5-4 (c):** Rinderleber, 300 µg/kg **Cloxacillin**, extrahiert mit NaCl/MeCN (50 + 50);  
Detektion: UV 300 nm nach photochemischer Nachsäulenderivatisierung



**Abb. 5-4 (b):** Rinderleber, 300 µg/kg **Oxacillin**, extrahiert mit NaCl/MeCN (50 + 50);  
Detektion: UV 300 nm nach photochemischer Nachsäulenderivatisierung