

Bestimmung von Chloramphenicol in Honig mit automatisierter Festphasenextraktion und HPLC-MS/MS-Detektion

H. R. Wollseifen, Düren/D, T. Kretschmer, Düren/D

Dr. H. R. Wollseifen, MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Valencienner Str. 11, 52355 Düren/D



Einleitung:

Chloramphenicol ist ein Breitbandantibiotikum gegen grampositive und gramnegative Erreger. Es weist ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil auf, so dass es heute nur noch als Reserveantibiotikum angewendet wird [1]. Zur Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit hat die EU für viele Rückstände in tierischen Produkten Höchstgrenzen festgesetzt. Die Bestimmungsverfahren erfordern eine leistungsfähige Festphasenextraktion, um Rückstände im Spurenbereich sicher detektieren und quantifizieren zu können.

Nachfolgend wird ein empfindliches Bestimmungsverfahren mit einer automatisierten Festphasenextraktion vorgestellt und mit manueller Aufarbeitung verglichen. Die Festphasenextraktion wurde mit einem SPE-Roboter, FREESTYLE™ SPE Modul, der LC Tech GmbH entwickelt. Als Festphase wurde entsprechend dem Methodenvorschlag der amtlichen Lebensmittelüberwachung CHROMABOND® HLB eingesetzt [2]. Für die Anschlussanalytik wurde ein HPLC-MS/MS Verfahren entwickelt. Die flüssigchromatographische Bestimmung erfolgte auf einer Biphenylphase, NUCLEODUR® π², die aufgrund von zusätzlichen π-Wechselwirkungen mit aromatischen Analyten eine hohe Retention für Chloramphenicol aufweist. Zur Absicherung der Messergebnisse wurde Chloramphenicol-d₅ als interner Standard eingesetzt.

Chloramphenicol

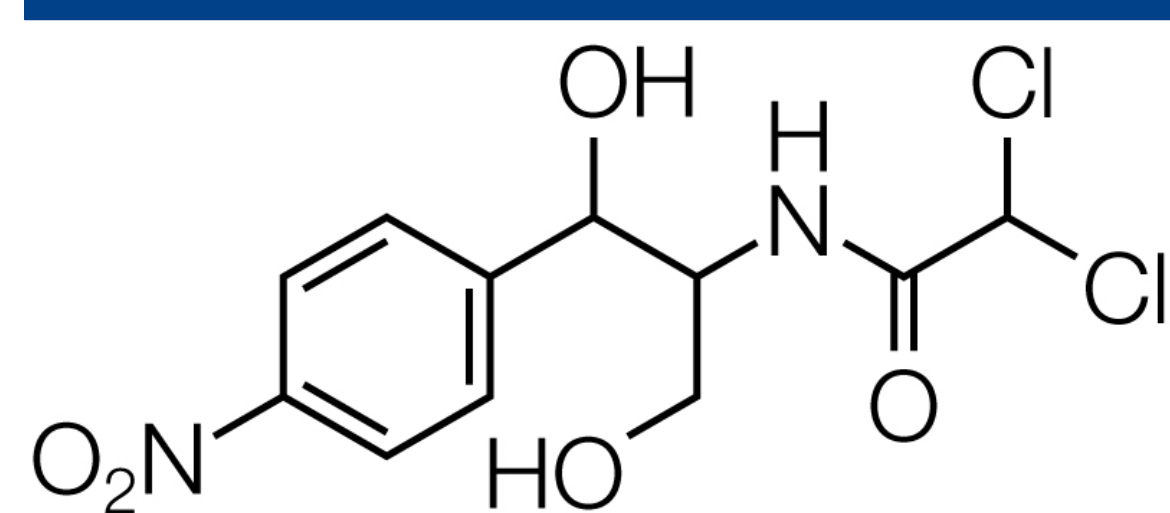


Abb. 1: Molekülformel Chloramphenicol

Automatisierte Festphasenextraktion

Säule: CHROMABOND® HLB, 3 mL, 200 mg, (REF 730924)
Probenvorbereitung: 5 g Honig in ein Zentrifugenröhrchen (50 mL) einwiegen, 4 mL Wasser hinzufügen und kräftig 0,5 min schütteln, 1 mL Standardlösung (c = 5 ng/mL Chloramphenicol und Chloramphenicol-d₅) hinzufügen und 0,5 min kräftig schütteln, 15 mL Ethylacetat hinzufügen und 0,5 min kräftig schütteln, bei 3000 U/min für 10 min zentrifugieren, 12 mL Überstand abnehmen und unter Stickstoffstrom bei 40 °C eindampfen, Rückstand in 10 mL Wasser wieder aufnehmen.

FREESTYLE™

LC Tech FreeStyle - Report on Methods: SPE Date: 26.06.2017 Time: 13:11:02

Name: CAP-M02-Honey_Agilent.spe	SPE Column: LCTech_3ml.col
Extension cannula: yes	Standard (organic solvents)
Processing speed selection: Rinsing intensity: Use pressure limitation function during loading and washing:	Extended rinsing cycle no
Step: Conditioning_MeOH	Basic type: Conditioning Step: - ID: 795
Volume: 3 ml Suction Speed: 20 ml/min Repetitions: 0 Waiting Time after Dosage: 10 sec.	Dispensing Speed: 1 ml/min Port: 1 methanol Dispense: into Waste
Step: Conditioning_Water	Basic type: Conditioning Step: - ID: 796
Volume: 5 ml Suction Speed: 20 ml/min Repetitions: 0 Waiting Time after Dosage: 10 sec.	Dispensing Speed: 1 ml/min Port: 8 water Dispense: into Waste
Step: Load	Basic type: Load - Transfer Sample-Aliquot over sample loop Step: - ID: 797
Volume: 9 ml Vial Type: Type1 @ 16 without rinsing of vial Suction Speed: 10 ml/min Waiting Time after Dosage: 0 sec.	Dispensing Speed: 3 ml/min Waiting Time after Step: 150 sec. Dispense: into Waste
Step: Washing_water	Basic type: Washing Step: - ID: 798
Volume: 5 ml Suction Speed: 10 ml/min Repetitions: 1 Waiting Time after Dosage: 0 sec.	Dispensing Speed: 3 ml/min Port: 8 water Dispense: into Waste
Step: Drying_Nitrogen	Basic type: Drying - Drying by defined air volume Step: - ID: 799
Air volume: 100 ml Suction Speed: 100 ml/min	Dispensing Speed: 100 ml/min Dispense: into Waste
Step: Eluting_EE-MeOH_8:2	Basic type: Eluting Step: - ID: 800
Volume: 5 ml Suction Speed: 10 ml/min Repetitions: 0 Waiting Time after Dosage: 0 sec.	Dispensing Speed: 3 ml/min Port: 11 MeOH:EE 8:2 Dispense: into vials Number of vials: 1 Vial Type: Type1 @ 16
Step: Drying_after_Elution	Basic type: Drying - Drying by defined air volume Step: - ID: 801
Air volume: 20 ml Suction Speed: 100 ml/min	Dispensing Speed: 10 ml/min Dispense: stay on actual position

Abb. 2: Methodenreport für die automatisierte SPE von Chloramphenicol in Honig mit dem FREESTYLE™ SPE Modul.

Eluententausch:

Eluat unter Stickstoffstrom bei 40 °C eindampfen und in 1 mL Wasser/Acetonitril (95:5, v/v) wieder lösen.

Manuell ausgeführte Festphasenextraktion

Säule: CHROMABOND® HLB, 3 mL, 200 mg, (REF 730924)
Probenvorbereitung: siehe automatisierte Festphasenextraktion
Konditionieren: 1 x 3 mL Methanol, 1 x 5 mL Wasser
Probenaufgabe: 9 mL Probenlösung mit geringem Vakuum (Fluss 3 mL/min)
Waschen: 10 mL Wasser (Fluss 3 mL/min)
Trocknen: 5 min mit Vakuum
Elution: 5 mL Ethylacetat/Methanol (80:20, v/v)
Eluententausch: siehe automatisierte Festphasenextraktion

Anschlussanalytik: HPLC-MS / MS

Chromatographische Bedingungen:

HPLC-Säule: EC 150/2 NUCLEODUR® π², 5 μm, (REF 760624.20)
Eluent A: Wasser
Eluent B: Acetonitril
Gradient: 5–95 % B in 7,5 min, 95 % B für 1 min halten, 95–5 % B in 1 min, 5 % B für 5 min halten

Fluss: 0,3 mL/min
Temperatur: 35 °C
Injektionsvolumen: 5 μL

MS-Bedingungen:

API 5500, ion source ESI, negative ionization mode, scan type MRM
Curtain gas 35 psig, ion spray voltage -4500 V, temperature 450 °C, nebulizer gas 45 psig, turbo gas 45 psig, CAD medium

MRM transitions

Analyt	[M-H]-	Q1 (Quantifier)	Q2 (Qualifier)
Chloramphenicol	320,9	152,0	256,0
Chloramphenicol-d ₅	325,9	156,6	261,8

Tabelle 1: MRM transitions für Chloramphenicol und für Chloramphenicol-d₅.

Kalibrationsgeraden

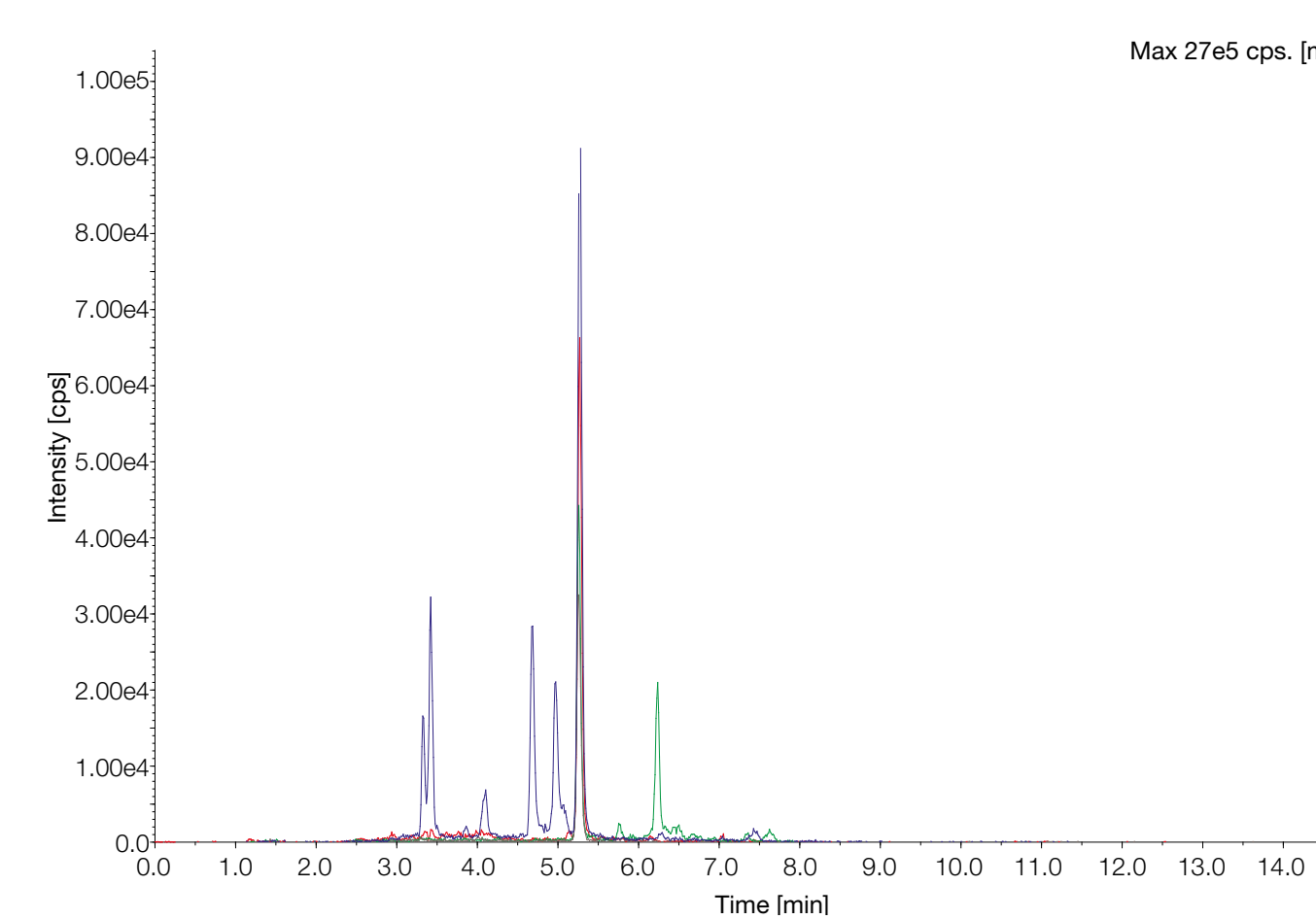


Abbildung 3: Chromatogramm einer dotierten Honigprobe, 1 μg/kg.

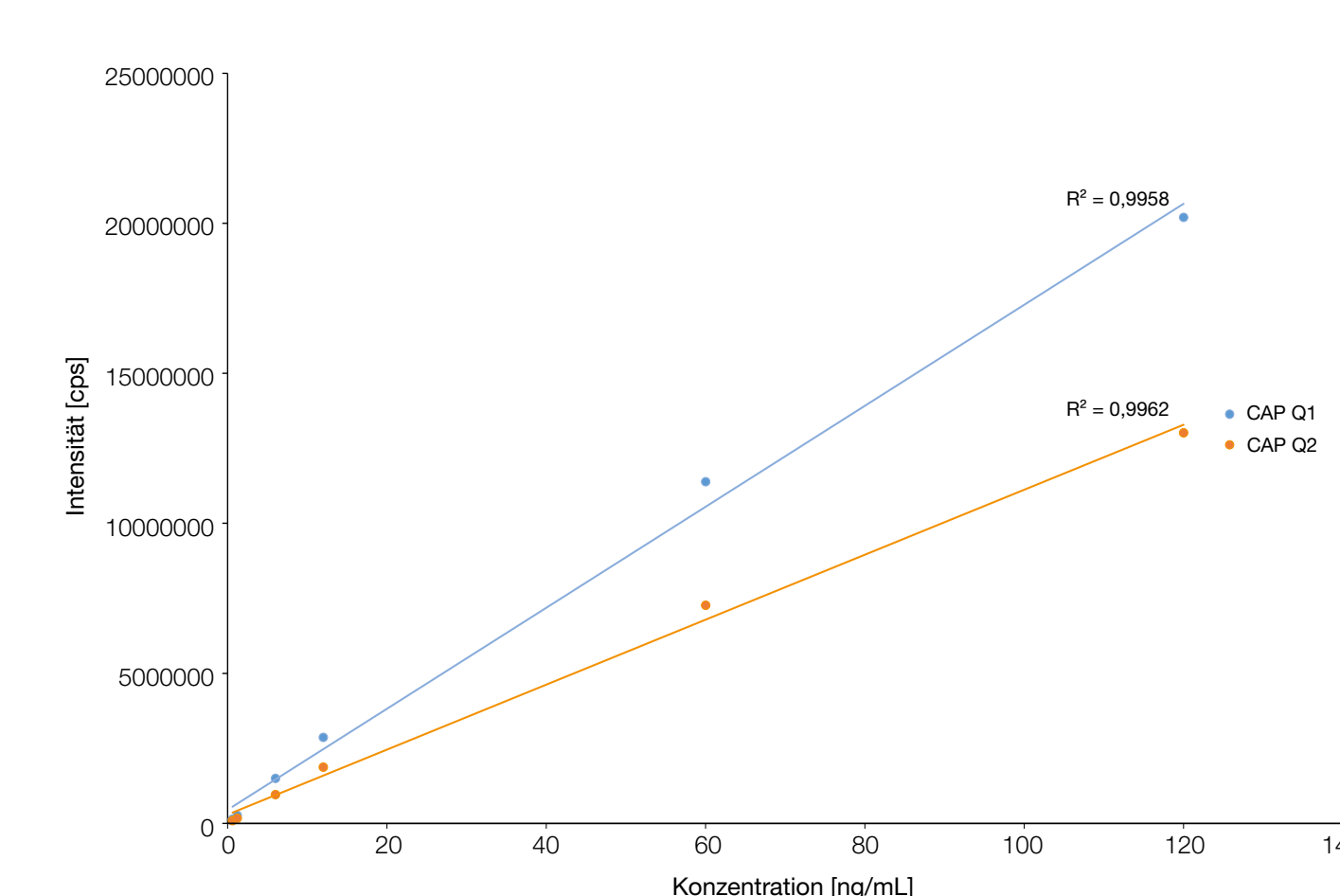


Abbildung 4: Kalibrationsgeraden von Chloramphenicol, Konzentrationsbereich 0,5–100 ng/mL.

Wiederfindungsraten

	Chloramphenicol	Chloramphenicol (interner Standard berücksichtigt)
Automatisierte SPE	86,8 ± 4,4 (n = 4)	90,8 ± 4,6 (n = 4)
Manuelle SPE	74,6 ± 2,7 (n = 3)	80,3 ± 4,7 (n = 3)

Tabelle 2: Vergleich der Wiederfindungsraten bei automatisierter und manueller Festphasenextraktion.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Festphasenextraktion für Chloramphenicol mit CHROMABOND® HLB aus der Matrix Honig zu sehr guten Wiederfindungen führt. Die in Tabelle 2 aufgeführten Wiederfindungsraten zeigen, dass durch eine Automatisierung mit Hilfe des SPE-Roboters, FREESTYLE™ SPE Modul, höhere Wiederfindungsraten von bis zu 90 % bei sehr guter Reproduzierbarkeit (< 5 %) erreicht werden. Eine Korrektur durch internen Standard ist insbesondere bei der manuellen Probenvorbereitung zielführend. Die Abbildung 3 zeigt ein Chromatogramm eines dotierten Probenextraktes. Da Matrixinterferenzen deutlich vom Signal des Analyten abgetrennt sind, ist eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung möglich. Die flüssigchromatographische Methode könnte aufgrund der guten Retention von Chloramphenicol durch eine kleinere Partikelgröße oder eine kürzere Säule beschleunigt werden. Die Methodik weist eine sehr gute Linearität auf. Es muss berücksichtigt werden, dass ab Konzentrationen von 50 ng/mL Chloramphenicol erste Sättigungseffekte bei der massenspektrometrischen Detektion auftreten. Insgesamt konnte ein Bestimmungsverfahren entwickelt werden, bei dem insbesondere die Automatisierung der Festphasenextraktion zu sehr guten Ergebnissen führte.

Literatur

[1] Side-effects of Chloramphenicol and Aureomycin, Br Med J. 1951, 384–2, 388–392.
[2] Verordnung (EG) Nr. 470/2009, [3] Bestimmung von Antibiotika-Rückständen in Honig L40.00–17.

Dank

Die MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG dankt der LC Tech GmbH für die Kooperation und die Bereitstellung des SPE-Roboters (FREESTYLE™ SPE Modul).

