

SOLUTIONS BY



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

*Dr. H. R. Wollseifen und T. Kretschmer
(MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren)*

Inhalt

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | Einleitung | 3 |
| 1.1 | Analyt | 4 |
| 2 | Methode | 4 |
| 2.1 | Probenmaterial und -vorbereitung..... | 4 |
| 2.2 | Chemikalien, Standardsubstanzen und Verbrauchs-materialien..... | 5 |
| 2.3 | Geräte | 5 |
| 2.4 | Festphasenextraktion manuell..... | 5 |
| 2.5 | Festphasenextraktion automatisiert durch LCTech | 6 |
| 2.6 | Eluententausch | 8 |
| 2.7 | Messung mittels LC-MS/MS | 8 |
| 2.8 | Konfiguration FREESTYLE | 9 |
| 2.9 | Verbrauchsmaterialien von MACHEREY-NAGEL | 9 |
| 3 | Ergebnisse | 9 |
| 3.1 | Wiederfindungen..... | 9 |
| 3.2 | Chromatogramme..... | 10 |
| 3.3 | Kalibrationsgeraden | 11 |
| 3.4 | Zusammenfassung..... | 12 |

Keywords: Arzneimittel, Arzneimittelrückstände, Antibiotika, Honig, Imker, Verordnung (EWG) 2377/90, Anhang IV der Verordnung (EWG) 2377/90, Verordnung (EU) 37/2010

1 Einleitung

Im Durchschnitt wird 1 Kilogramm Honig jährlich pro Person in Deutschland verzehrt. Der in Deutschland gewonnene Honig kann die Nachfrage jedoch nur zu circa 20 Prozent abdecken. Der restliche Bedarf, und somit der Großteil, wird zum Leidwesen der heimischen Imker im Ausland eingekauft (vorwiegend Lateinamerika und Asien). 2002 wurde durch die EU ein bis 2004 andauerndes Einfuhrverbot von chinesischem Honig verhängt. Grund dafür war die starke Belastung durch das verbotene Chloramphenicol.

Chloramphenicol (CAP) wurde aufgrund seines sehr hohen bakteriostatischen Wirkungspotentials in der Tier- und Humanmedizin als Breitbandantibiotikum eingesetzt. In der heutigen Humanmedizin ist der Einsatz jedoch aufgrund der massiven Nebenwirkungen enorm eingeschränkt.

In der EU ist Chloramphenicol seit 1994 für die Anwendung bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, verboten. Dies wurde durch die Aufnahme in Anhang IV (Verzeichnis der pharmakologisch wirksamen Stoffe, für die keine Höchstwerte festgelegt werden können) der Verordnung (EWG) 2377/90 erreicht. Durch die Verordnung (EU) 37/2010 wurde dieses Verbot übernommen, welche eben erwähnte Anhänge der (EWG) 2377/90 ersetzt.

Das Verbot gründet sich auf dem Verdacht, dass CAP aplastische Anämie beim Menschen hervorrufen kann, sowie auf Hinweise einer möglichen Reproduktionstoxizität.

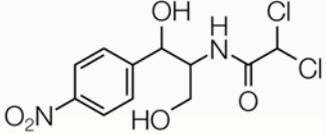
Immer wieder findet man Rückstände von Antibiotika im Honig, obwohl diese in der EU verboten sind. In Südamerika ist der Einsatz beispielsweise jedoch erlaubt, womit durch den Import diese auch wieder nach Deutschland gelangen können.



Abbildung 1: Honig

1.1 Analyt

Tabelle 1:

| Analyt | Summenformel | Molare Masse [g/mol] | Strukturformel |
|-----------------|--------------------------|----------------------|---|
| Chloramphenicol | $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ | 323,14 |  |

Nachfolgend wird aufgezeigt, wie Honigproben mittels Festphasenextraktion (SPE) vollautomatisiert mit dem Robotiksystem FREESTYLE SPE für die Messung von Chloramphenicol mittels LC-MS/MS aufgereinigt werden können. Die Ergebnisse werden mit der bisher im Labor durchgeführten, überwiegend manuellen Aufarbeitung verglichen. Durch die vollautomatisierte, sequenzielle Probenvorbereitung können ein hoher Probendurchsatz realisiert und Personalressourcen für andere Aufgaben eingesetzt werden.

2 Methode

2.1 Probenmaterial und -vorbereitung

5 g Honig (Blütenhonig, Goldland (Aldi)) werden in einem Zentrifugenröhrchen (50 mL) einwogen, 4 mL Wasser hinzugefügt und für 30 Sekunden kräftig geschüttelt. Danach wird 1 mL Standardlösung ($c = 5 \text{ ng/mL}$ Chloramphenicol und Chloramphenicol-d5) hinzugefügt, 30 Sekunden kräftig geschüttelt, danach wiederum 15 mL Ethylacetat hinzugefügt und erneut 30 Sekunden kräftig geschüttelt. Die Lösung wird dann bei 3000 U/min für 10 min. zentrifugiert. Davon wird 12 mL Überstand abgenommen und unter Stickstoffstrom bei 40 °C eingedampft. Der Rückstand wird in 10 mL Wasser wiederaufgenommen.



Abbildung 2: Vorbereiten der Probe

2.2 Chemikalien, Standardsubstanzen und Verbrauchsmaterialien

- Wasser, bidest. Milli-Q, Fa. Millipore
- Acetonitril ULC/MS, Fa. Biosolve B.V.
- Ameisensäure 99 % ULC/MS, Fa. Biosolve B.V.
- Ethylacetat p.A., Fa. CHEMSOLUTE
- Standardsubstanzen und isotopenmarkierte Standards:
Chloramphenicol $\geq 98\%$ (HPLC), Fa. Sigma;
(Erythro)-Chloramphenicol D5 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Acetonitrile, Fa. LGC Standards
- SPE-Kartuschen CHROMABOND® HLB, 3 mL, 200 mg, (REF 730924), Fa. MACHEREY-NAGEL
- HPLC-Trennsäule EC 150/2 NUCLEODUR® $\pi 2$, 5 μm (REF 760624.20), Fa. MACHEREY-NAGEL

2.3 Geräte

- 1290 Infinity II UHPLC, Fa. Agilent Technologies mit QTRAP 5500, Fa. AB Sciex
- FREESTYLE SPE, Fa. LCTech GmbH (Konfiguration s. 2.9)
- Einengvorrichtung mit Stickstoff
- Rotina 420R, Fa. Hettich Zentrifugen

2.4 Festphasenextraktion manuell

Tabelle 2: SPE-Schritte bei der manuellen Probenvorbereitung

| SPE-Schritte | manuell |
|-----------------------|--|
| Konditionieren | 3 mL Methanol 5 mL Reinstwasser |
| Laden | 9 mL Probe, 3 mL/min. |
| Waschen | 10 mL Reinstwasser, 3 mL/min. |
| Trocknen | 5 min. mit Vakuum |
| Elution | 5 mL Ethylacetat/Methanol (80:20, v/v) |

2.5 Festphasenextraktion automatisiert durch LCTech

Das FREESTYLE Robotiksystem ist ein System zur automatisierten Probenvorbereitung. Es besteht aus dem Grundbaustein des FREESTYLE BASIC, das mit verschiedenen Modulen, je nach Anforderung der Anwender, ausgestattet werden kann.

Ausgerüstet mit dem SPE-Modul bearbeitet das FREESTYLE alle Methoden im Bereich der Festphasenextraktion. Durch die feste Verbindung der SPE-Säule mit dem Roboterarm lassen sich zum einen die Säulen an jeden Platz der Plattform bewegen. Darüber hinaus erlaubt sie aber auch eine kontrollierte Druckbeaufschlagung von bis zu 4 bar, die besonders wichtig ist bei Applikationen, bei denen Schwebstoffe die Säule blockieren können.

Mit dem FREESTYLE SPE lassen sich alle SPE Standard-Säulenformate (1, 3, 6, 8, 15 mL) aber auch Glassäulen von LCTech (bis 15 mL), automatisiert bearbeiten.

Die manuelle Festphasenextraktion kann ganz leicht auf das Robotiksystem zur automatisierten Probenvorbereitung mit dem FREESTYLE SPE übertragen werden. Die einfach zu bedienende Software des Systems bietet einen Methodeneditor, der Methodenentwicklung auf dem System schnell und unkompliziert macht. Durch Drag & Drop lässt sich in Sekundenschnelle die Grobstruktur der Methode definieren. Durch Verschieben von Balken können Parameter, wie z. B. Volumen und Geschwindigkeiten, angegeben werden.

The screenshot shows the software interface for configuring SPE steps. The main window is titled 'SPE Schritte: Schritt Nummer: 2' and 'ID: 522'. It displays the following parameters for the 'Laden' step:

- Transfer Typ: Transfer Proben-Aliquot über Nadelschleife
- Aufgabeglas Typ: Type1@16
- Probenvolumen: 10,0 mL
- Ansaug Geschwindigkeit: 6 mL / min
- Abgabe Geschwindigkeit: 2 mL / min
- Wartezeit nach Dosierung: 0 s
- Wartezeit nach Schritt: 5 s
- Abgabe: in Abfall, in Glas

The 'Zeitberechnung' panel shows a duration of 2,2 min. Below the main window, there are two tables:

| Aufgabegläser | | | | | |
|---------------|-------|--------|----------|----------|-----|
| Schritt Nr. | Name | Anzahl | Typ | Basistyp | ID |
| 2 | Laden | 1 | Type1@16 | LAD | 522 |

| Ergebnisgläser | | | | | |
|----------------|----------|--------|----------|----------|----|
| Schritt Nr. | Name | Anzahl | Typ | Basistyp | ID |
| 4 | Trocknen | 1 | Type1@60 | DRY | |

Abbildung 3: Bildschirm der FREESTYLE Software mit den verschiedenen SPE Schritten.

Folgende Schritte werden vom FREESTYLE vollautomatisiert durchgeführt:

Tabelle 3: SPE-Schritte bei der automatisierten Probenvorbereitung

| SPE-Schritte | automatisiert |
|-----------------------|--|
| Konditionieren | 3 mL Methanol, 1 mL/min. 5 mL Reinstwasser, 1 mL/min. |
| Laden | 9 mL Probe, 3 mL/min. |
| Waschen | 5 mL Reinstwasser, 3 mL/min. |
| Trocknen | 100 mL Luft mit Spritze, 100 mL/min. |
| Elution | 5 mL Ethylacetat/Methanol (80:20, v/v), 3 mL/min |
| Trocknen | 20 mL Luft mit Spritze, 10 mL/min. |

Die genauen Parametereinstellungen der Methode am FREESTYLE sind im nachfolgenden Methodenreport dargestellt:

| | | | | |
|---|--|---|---|-------------------|
| Schritt: Konditionieren_MeOH | | Basistyp: Konditionieren | | Schritt - ID: 670 |
|  Volumen: 3 ml | Ansaug Geschwindigkeit: 20 ml/min Wiederholungen: 0 Wartezeit nach Dosierung: 0 sec. | Abgabe Geschwindigkeit: 1 ml/min Wartezeit nach Schritt: 0 sec. | Port: 1 MeOH Abgabe: in Abfall | |
| Schritt: Konditionieren_H2O | | Basistyp: Konditionieren | | Schritt - ID: 671 |
|  Volumen: 5 ml | Ansaug Geschwindigkeit: 20 ml/min Wiederholungen: 0 Wartezeit nach Dosierung: 0 sec. | Abgabe Geschwindigkeit: 1 ml/min Wartezeit nach Schritt: 0 sec. | Port: 8 Water Abgabe: in Abfall | |
| Schritt: Laden | | Basistyp: Laden - Transfer Proben-Aliquot über Nadelschleife | | Schritt - ID: 672 |
|  Volumen: 9 ml Glas Typ: Type1@16 | Ansaug Geschwindigkeit: 10 ml/min Wartezeit nach Dosierung: 0 sec. | Abgabe Geschwindigkeit: 3 ml/min Wartezeit nach Schritt: 150 sec. | Abgabe: in Abfall | |
| ohne Nachspülen | | | | |
| Schritt: Waschen_H2O | | Basistyp: Waschen | | Schritt - ID: 673 |
|  Volumen: 5 ml | Ansaug Geschwindigkeit: 10 ml/min Wiederholungen: 1 Wartezeit nach Dosierung: 0 sec. | Abgabe Geschwindigkeit: 3 ml/min Wartezeit nach Schritt: 0 sec. Abgabe: in Abfall | Port: 8 Water | |
| Schritt: Trocknen | | Basistyp: Trocknen - Trocknung mit definiertem Luftvolumen | | Schritt - ID: 674 |
|  Luftvolumen: 100 ml | Ansaug Geschwindigkeit: 100 ml/min | Abgabe Geschwindigkeit: 100 ml/min | Abgabe: in Abfall | |
| Schritt: Eluieren_EE-MeOH_8:2 | | Basistyp: Eluieren | | Schritt - ID: 675 |
|  Volumen: 5 ml | Ansaug Geschwindigkeit: 10 ml/min Wiederholungen: 0 Wartezeit nach Dosierung: 0 sec. | Abgabe Geschwindigkeit: 3 ml/min Wartezeit nach Schritt: 0 sec. | Port: 11 EE-MeOH 8:2 Abgabe: in Abfall | |
| Schritt: Trocknen | | Basistyp: Trocknen - Trocknung mit definiertem Luftvolumen | | Schritt - ID: 676 |
|  Luftvolumen: 20 ml | Ansaug Geschwindigkeit: 100 ml/min | Abgabe Geschwindigkeit: 10 ml/min | Abgabe: verbleibe an Ort und Stelle | |

Abbildung 4: Parametereinstellungen der SPE-Methode am FREESTYLE SPE

2.6 Eluententausch

- Das Eluat (von manueller und automatisierter Aufreinigung) wird in eine Rundküvette überführt (Nano Reaktionsgläser, AD: 16 mm, 20 St., Art.-Nr.: 91680).
- Es wird mit 1 mL Ethylacetat/Methanol (80:20, v/v) nachgespült.
- Die Temperatur auf dem Thermoblock (Vario 4, Art.-Nr.: 919300) wird auf 40 °C eingestellt.
- Unter leichtem Stickstoffstrom wird das Eluat eingengt, mit Wasser/Acetonitril (95:5, v/v) auf 1 mL Volumen aufgefüllt und rückgelöst.
- Anschließend wird das Eluat injiziert.

2.7 Messung mittels LC-MS/MS

Die nachfolgende Messung wurde auf einem Agilent 1290 Infinity II System mit einem AB Sciex QTRAP 5500 MS Detektor durchgeführt.

Die folgende Konfiguration wurde dabei verwendet:

Tabelle 4: Konfiguration der LS-MS/MS mit Detektor.

| Säule | EC 150/2 NUCLEODUR® π2, 5 μm |
|-------------------|---|
| Eluent A | Wasser |
| Eluent B | Acetonitril |
| Gradient | 5-95 % B (in 7,5 min.) 9 5% B (1 min. halten) 95-5 % B (in 1 min.) 5 % B (5 min. halten) |
| Flussrate | 0,3 mL/min |
| Injektionsvolumen | 5 μL |
| Säulentemperatur | 35 °C |
| Detektion | MS/MS, AB Sciex QTRAP 5500 Ion source: Turbo Spray (ESI) Scan type: MRM Polarity: negative Curtain gas: 35 psig Ion spray voltage: -4500 V Temperature: 450 °C Gas 1 (nebulizer): 45 psig Gas 2 (turbo gas): 45 psig CAD gas: 6 psig |

2.8 Konfiguration FREESTYLE

| | |
|---|---------------------|
| 1. FREESTYLE BASIC | Produktnr. 12663-12 |
| 2. FREESTYLE SPE | Produktnr. 12668 |
| 3. Rack für Lösungsmittelversorgung | Produktnr. 13156 |
| 4. Greifring mit Klemmstreifen (3 mL) | Produktnr. 14612 |
| 5. Kappen für 3 mL-Säulen (wiederverwendbar) | Produktnr. 14862 |
| 6. Probenrack für bis zu 18 SPE-Säulen | Produktnr. 13946 |
| 7. Probenrack für 16 mL Flaschen | Produktnr. 11933 |
| 8. Träger für Racks (100 mm) | Produktnr. 11915 |
| 9. Adapter für SPE-Säulen (wiederverwendbar) | Produktnr. 13382 |
| 10. Gewindeflaschen (16 mL) | Produktnr. V0016 |
| 11. Verschlusskappe (16 mL) | Produktnr. V0016-SL |
| 12. Septen (16 mL) | Produktnr. V0016-D |

2.9 Verbrauchsmaterialien von MACHEREY-NAGEL

| | |
|-----------------------------------|----------------------|
| 1. CHROMABOND® HLB, 3 mL, 200 mg | Produktnr. 730924 |
| 2. EC 150/2 NUCLEODUR® π2, 5 µm | Produktnr. 760624.20 |
| 3. Nano Reaktionsglaser, AD 16 mm | Produktnr. 91680 |

3 Ergebnisse

3.1 Wiederfindungen

Tabelle 5: Vergleich der Wiederfindungsraten bei automatisierter und manueller Festphasenextraktion.

| Säule | Chloramphenicol | Chloramphenicol (interner Standard berücksichtigt) | Chloramphenicol-d5 |
|--------------------|--------------------|--|--------------------|
| Automatisierte SPE | 86,8 ± 4,4 (n = 4) | 90,8 ± 4,6 (n = 4) | 95,6 ± 4,5 (n = 4) |
| Manuelle SPE | 74,6 ± 2,7 (n = 3) | 92,9 ± 3,4 (n = 3) | 80,3 ± 4,7 (n = 3) |

3.2 Chromatogramme

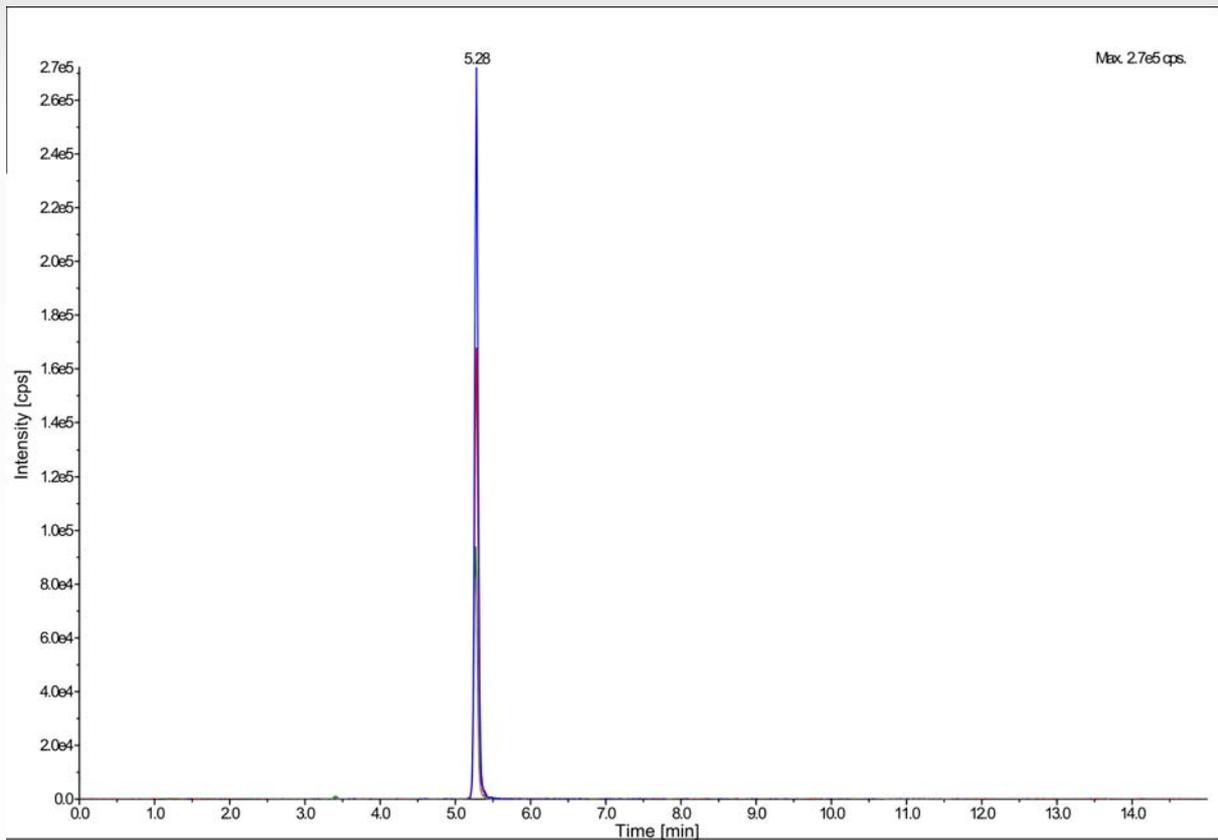


Abbildung 5: Chromatogramm einer Chloramphenicol-Standardlösung, $c = 5 \text{ ng/mL}$.

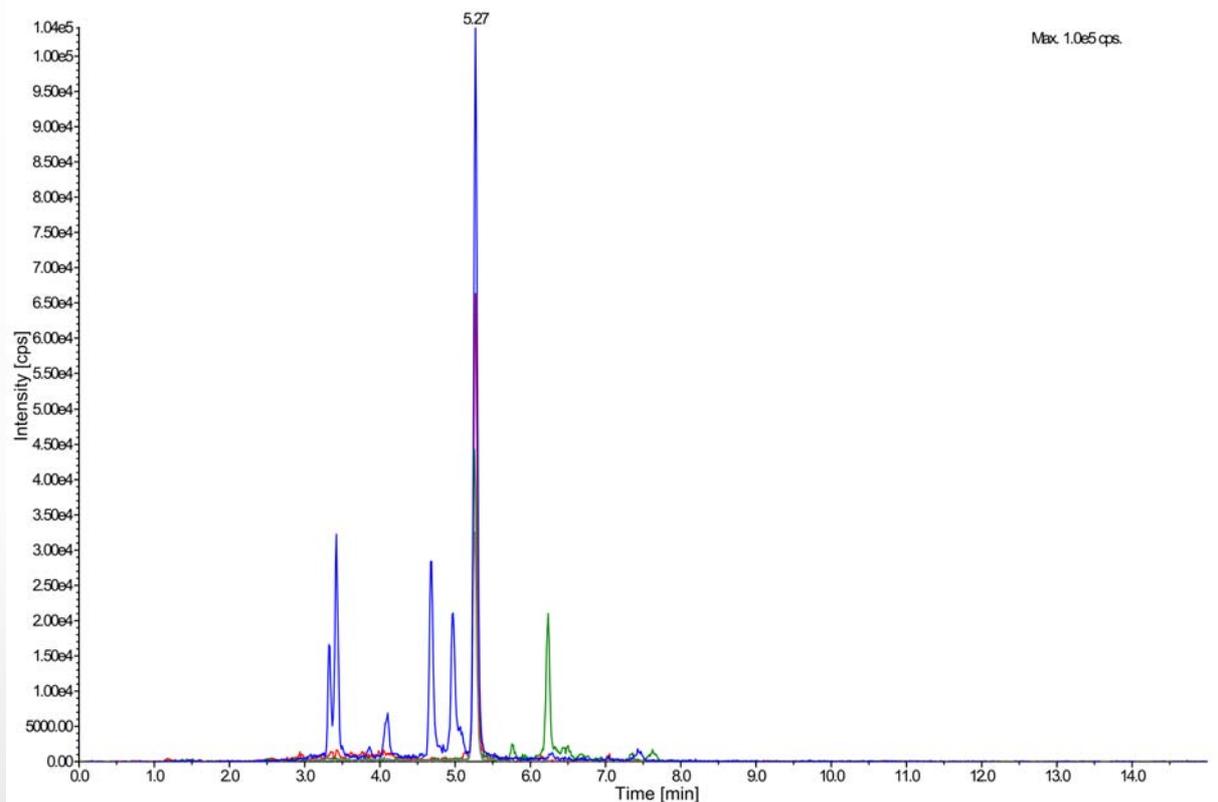


Abbildung 6: Chromatogramm einer dotierten Honigprobe, $1 \mu\text{g/kg}$

Tabelle 6: MRM transitions für Chloramphenicol und für Chloramphenicol-d5..

| Analyt | [M-H] ⁻ | Q1 (Quantifier) | Q2 (Qualifier) |
|--------------------|--------------------|-----------------|----------------|
| Chloramphenicol | 320,9 | 152,0 | 256,0 |
| Chloramphenicol-d5 | 325,9 | 156,6 | 261,8 |

3.3 Kalibrationsgeraden

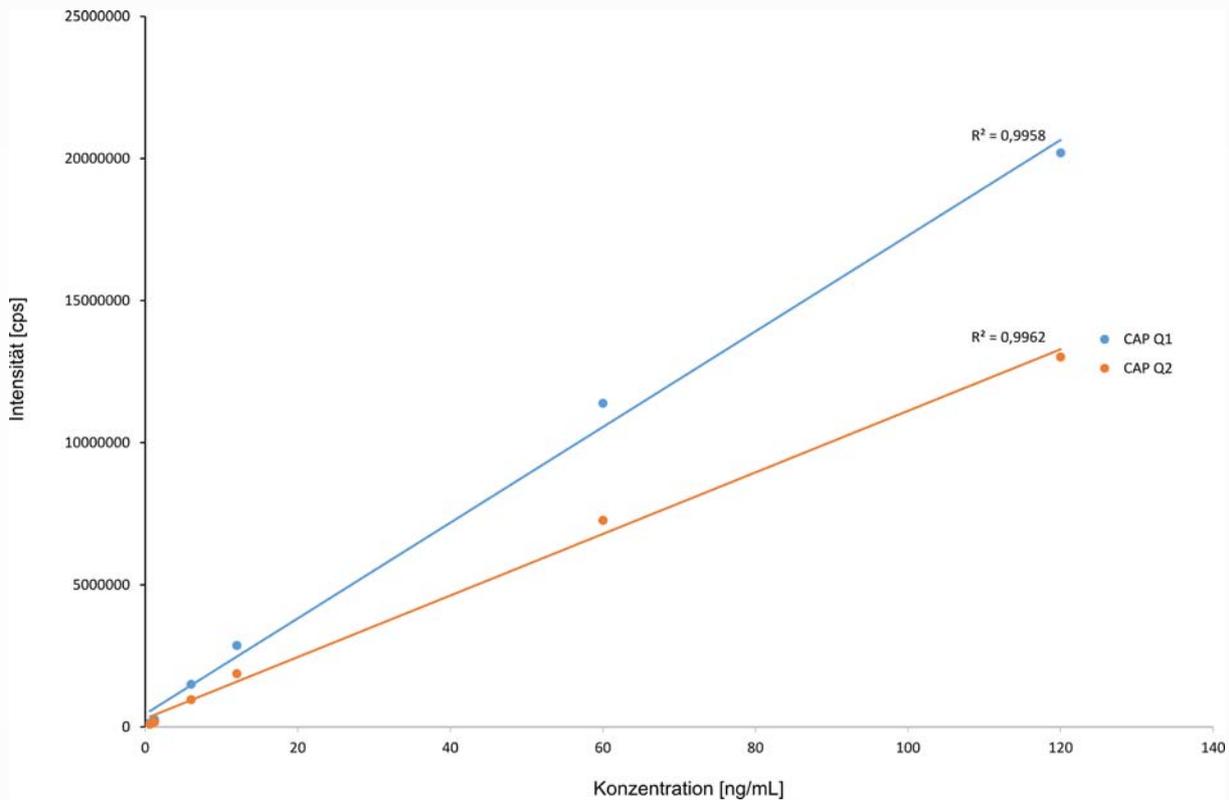


Abbildung 7: Kalibrationsgeraden von Chloramphenicol, Konzentrationsbereich 0,5-100 ng/mL.

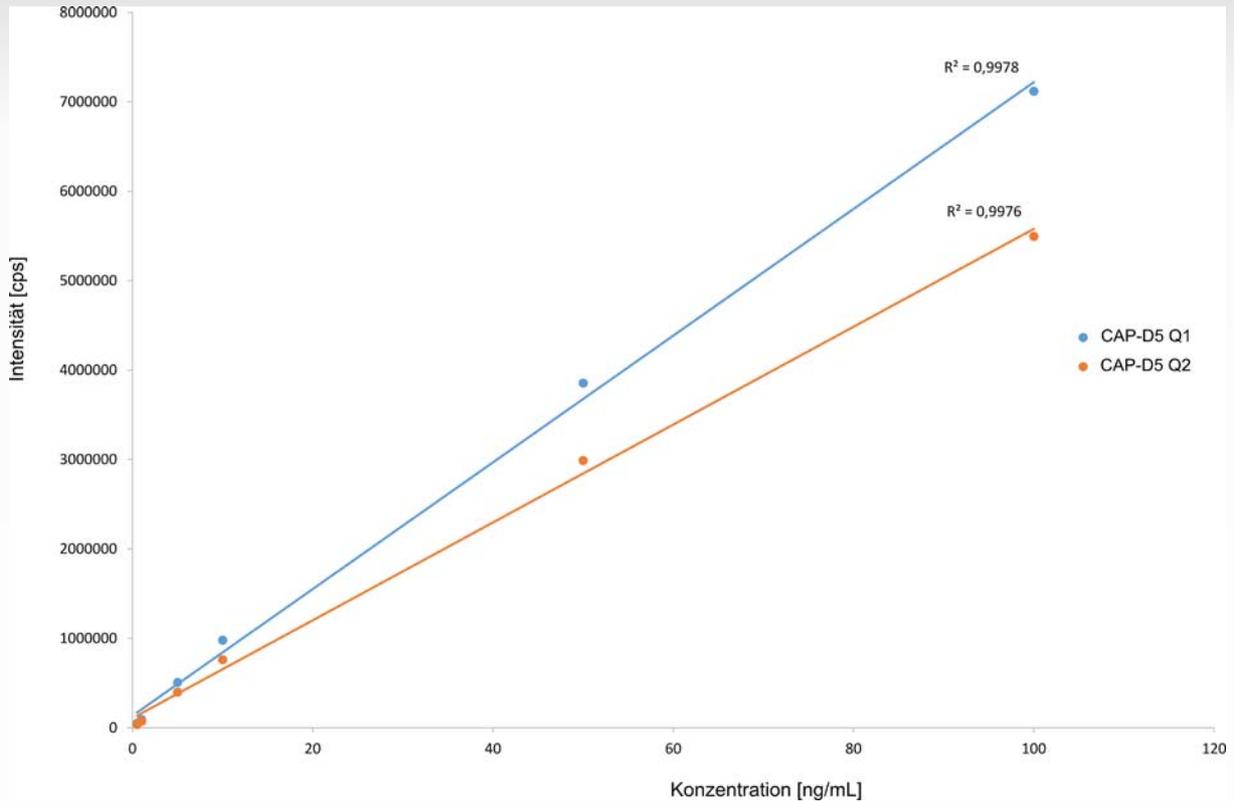


Abbildung 8: Kalibrationsgeraden von Chloramphenicol-d5, Konzentrationsbereich 0,6-120 ng/mL.

3.4 Zusammenfassung

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass eine Festphasenextraktion von Chloramphenicol mit CHROMABOND® HLB aus der Matrix Honig zu sehr guten Wiederfindungsraten führt. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, führt die automatisierte Bearbeitung im Vergleich zur manuellen sogar zu höheren Wiederfindungsraten bei gleichzeitig guter Reproduzierbarkeit (< 5 %).

Aus den Chromatogrammen wird ersichtlich, dass sich der Peak für Chloramphenicol deutlich von den Matrix Interferenzen trennt und sich somit sehr gut identifizieren und quantifizieren lässt.

Kontakt

LCTech GmbH
Daimlerstraße 4
84419 Obertaufkirchen
Deutschland

Tel.: +49 8082 2717-0
Fax: +49 8082 2717-100
E-Mail: info@LCTech.de

www.LCTech.de
www.LCTech-online.com

SOLUTIONS BY

