

# Aufreinigung und Konzentration von *Chloramphenicol und Malachitgrün aus tierischen Produkten und Honig* für die Rückstandsanalytik

Dr. Frederik N. Wuppermann, LCTech GmbH



Multi-Mykotoxinsäule CrossTOX®



# Inhalt

1.	Einleitung .....	3
2.	Produkthighlight .....	4
3.	Bearbeitungsprotokoll .....	5
4.	Analytik .....	6
5.	Beladungskapazitäten .....	7
6.	Wiederfindungen und Chromatogramme .....	8
6.1	Wiederfindungen von Chloramphenicol in verschiedenen Matrices .....	8
6.2	Chromatographie Chloramphenicol M-H.....	9
6.3	Chromatographie D5-Chloramphenicol M-H .....	10
7.	Fazit .....	11

# 1. Einleitung



Chloramphenicol und andere Antibiotika findet man immer wieder in aquatischen Lebensmitteln wie Krabben, Garnelen, Muscheln aus intensiver Aquakultur, aber auch in Geflügel (Huhn, Pute) und anderen tierischen Produkten. Der Einsatz dieser Antibiotika unterliegt strengen Auflagen. Das Vorhandensein dieser und anderer in der Tiermedizin verwendeten Medikamente in Lebensmitteln ist verboten und wird streng kontrolliert (EU 2019/1871, EU 2021/808). Der sogenannte Reference point of action (RPA) wurde von der EU 2019/1871 bisher auf 0,15 ppb

für Chloramphenicol und auf 0,5 ppb für Malachitgrün gesetzt. Jedoch wären aufgrund der inzwischen erreichbaren, niedrigeren Bestimmungsgrenzen auch niedrigere Grenzwerte bis 0,1 und 0,05 ppb für Chloramphenicol möglich und in der Diskussion. Zur Analytik von Chloramphenicol und/oder Malachitgrün in tierischen und aquatischen Fleischerzeugnissen ist eine aufwendige Extraktion und Aufreinigung unumgänglich. Um eine Kontamination, Interferenzen während der Analytik oder einfach Verschmutzung der Analysengeräte durch Protein- und Fettbestandteilen zu verhindern, werden dazu üblicherweise selektive Extraktionen und Aufreinigungen eingesetzt um störende Bestandteile von den Analyten zu trennen und die Bestimmung zu erleichtern. Die Anwendung, die in dieser Applikationsnote vorgestellt wird, bietet eine ideale Kombination eines einfachen Extraktionsansatzes, verbunden mit einer effektiven Aufreinigung und Anreicherung der Analyten (Chloramphenicol und Derivate davon, Malachit- und Leukomalachitgrün) gerade für Fleischprodukte, Fisch und Meeresfrüchte und stellt damit eine neue, schnelle Möglichkeit dar, Proben mittels einer einfachen SPE-Methode der Analytik zuzuführen.



## 2. Produkthighlight

Die CrossTOX<sup>®</sup>-Säule ermöglicht eine hohe Matrixbeladung, effiziente Abreicherung von Störsubstanzen (Protein-, Fettanteilen oder Zucker), die die Analyse beeinflussen können.

Eine schnelle und einfache Extraktion, hohe Flussraten und eine hohe Matrixkapazität zeichnen die CrossTOX<sup>®</sup>-Säule aus und bieten eine hervorragende Möglichkeit, auch Spuren von Chloramphenicol nachzuweisen.

Nur 1 Extraktionsverfahren, nur 1 SPE-Säule, nur 1 Einengen der Proben notwendig – es wird Zeit und Material gespart.

- Effiziente nicht-dispersive Aufreinigungssäule
- Beladungskapazität bis zu 0,5 g Matrix (1000 ng Chloramphenicol WFR >90 %)
- Eignung für aquatische und tierische Produkte (Krabben, Garnelen, Scampi, Muscheln, Fisch und Geflügel, Honig)
- Kompatibel mit verschiedenen Extraktionsansätzen:  
Methanol-Verträglichkeit (bis 20 %), Acetonitril-Verträglichkeit (bis 10 %)  
Geringere Ladevolumina ohne Verlust an Sensitivität
- Einfacher Extraktionsprozess (Methanol/Wasser oder Acetonitril/Wasser)
- Laden, Waschen und Eluieren – selektive Aufreinigung
- Eignung für die Analyse von Chloramphenicol, Malachitgrün mittels LC-MS/MS



### 3. Bearbeitungsprotokoll

20 Gramm homogenisiertes Material werden mittels 100 mL Methanol/Wasser (80/20 (v/v)) für 3 - 5 Minuten extrahiert. Der Rohextrakt wird durch Filtration oder durch Zentrifugation bei 3000 x g für 5 Minuten geklärt. 2,5 mL Probe werden mit 17,5 mL deionisiertem Wasser (Isotopen-markierte Standards werden vor dem SPE Clean-up zugesetzt) gemischt und mit einer Flussrate von maximal 2 mL/min auf die CrossTOX®-Säule geladen. Hierzu können peristaltische Pumpen oder ein Vakuum Manifold oder ein Robotiksystem (FREESTYLE QuEChERS) für die Probenvorbereitung eingesetzt werden.

Das Vorlagengefäß wird mit 2 mL deionisiertem Wasser gespült und die Spüllösung ebenfalls auf die CrossTOX®-Säule geladen. Danach wird die Säule durch einen kurzen Luftstrom getrocknet und anschließend mit 1 mL Methanol versetzt. Zur Erhöhung der Elutionseffizienz sollte das Methanol 5 Minuten in das Säulenbett einwirken können, um eine vollständige Elution zu gewährleisten. Das Eluat wird danach aufgefangen und kann zur Analytik eingeeengt werden. Nach dem Einengen wird es mittels 50 - 150 µL Laufmittel zurückgelöst und kann in der LC-MS/MS analysiert werden.

Es ist empfehlenswert, bei starken Ausfällungen, eine Spritzenfiltration vor Injektion in die LC-MS/MS einzusetzen.



## 4. Analytik

Tabelle 1: LC-MS/MS- analytische Parametrierung

<b>UPLC</b>	Gradient
<b>Säulenofen</b>	38 °C
<b>Trennsäule</b>	Accucore Biphenyl 100 mm x 2,1 mm; 2,6 µm mit Vorsäule
<b>Flussrate, Laufmittel</b>	0,4 mL/min; Laufmittel A: HPLC-Wasser/Methanol (98/2 (v/v), 5 mM Ammoniumacetat, 1 % Essigsäure) Laufmittel B: HPLC-Wasser/Methanol (2/98 (v/v), 5 mM Ammoniumacetat, 1 % Essigsäure)
<b>0 - 2 min</b>	95 % A; 5 % B
<b>2 - 10 min</b>	15 % A; 85 % B
<b>10,1 - 18 min</b>	5 % A; 95 % B
<b>18,1 - 25</b>	95 % A; 5 % B
<b>Analytik</b>	Heated ESI 3500V (+); 3500 V (-); Ion-Transfer-Tube 325 °C; Verdampfer 350 °C; Collision gas 1,5 mTorr (Argon)

Tabelle 2: Precursor- und Produktionen für die Analyse der Analyten mittels LC-MS/MS

m/z	Precursor	Produkt-Ionen
<b>Chloramphenicol M+H</b>	323	<b>304,887</b> / 274,863 / 257,97 / 165,179 / 119,054
<b>Chloramphenicol M-H</b>	321	<b>257,077</b> / 193,893 / 176,167 / 152,149 / 121,13
<b>D5-Chloramphenicol M-H</b>	326	<b>262,077</b> / 199,893 / 181,167 / 157,149
<b>Malachitgrün M+H</b>	329	<b>207,99</b> / 241,190 / 313,000

## 5. Beladungskapazitäten

Die Kapazität der CrossTOX®-Säule für Chloramphenicol wurde für Konzentrationen von 50-1000 ng unter experimentellen Bedingungen getestet, um im Falle von massiven Überschreitungen der Grenzwerte quantifizierbare Ergebnisse zu liefern (Diagramm 1).

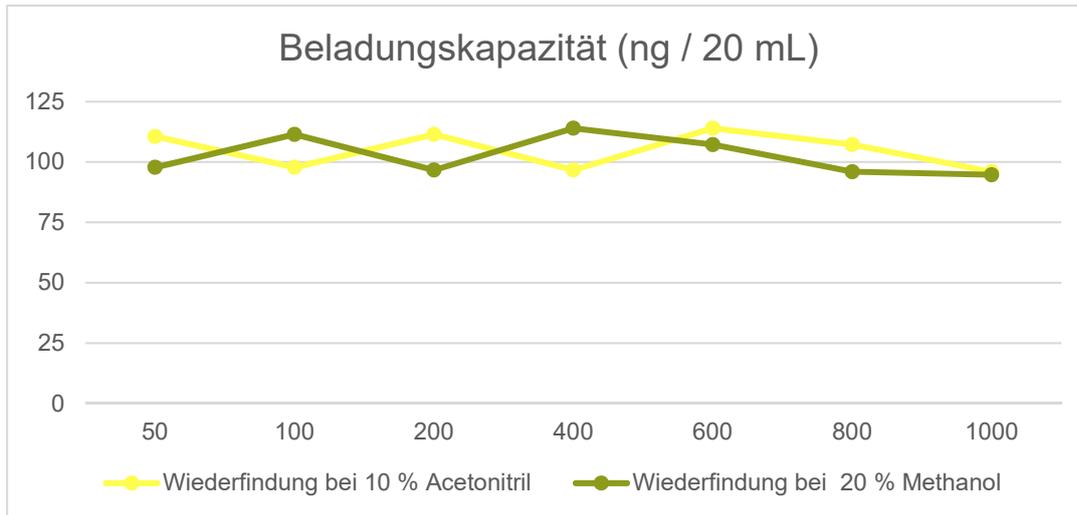


Diagramm 1: Beladungskapazität der CrossTOX®-Säule durch Chloramphenicol bei 10 % Acetonitril bzw. 20 % Methanol. Bei Einhaltung der Lösungsmittelkonzentrationen konnten konstant sehr gute Wiederfindungen erzielt werden.

Die Beladungskapazität konnte mit bis zu 1000 ng unter den Bedingungen der Probenaufarbeitung mit einer Wiederfindung von mehr als 90 % ermittelt werden. Um festzustellen, ob die Selektivität der CrossTOX®-Säule geeignet ist, auch geringste Spuren von Chloramphenicol zur Einhaltung der minimalen Bestimmungsgrenzen effektiv binden zu können, wurden Konzentrationen von 0,01 bis 50 ng Chloramphenicol in einer Matrixprobe (Krabben) getestet (Diagramm 2).

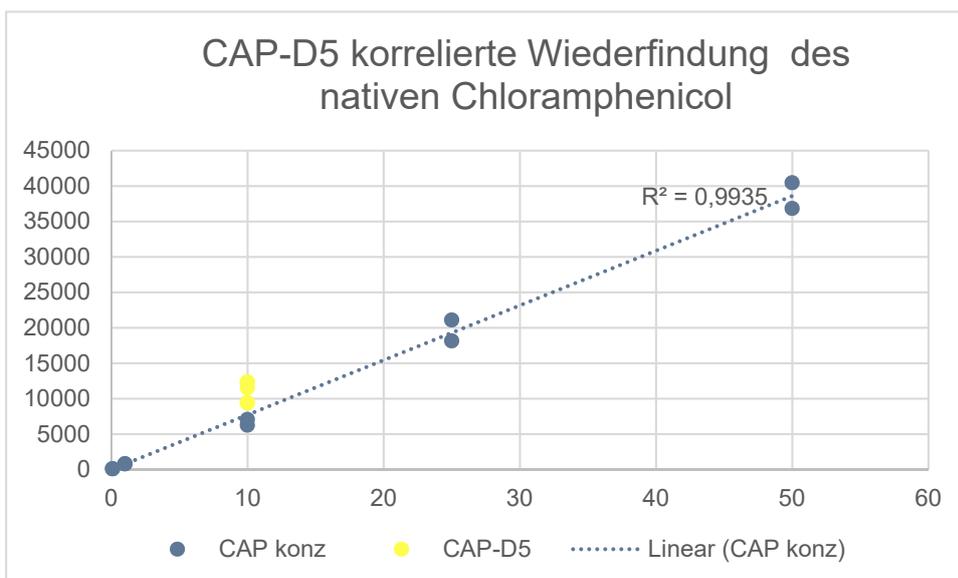


Diagramm 2: Kompensierung von Matrixeffekten durch D5-markiertes Chloramphenicol, welches ebenfalls mit aufgereinigt wurde.



Durch die Verwendung des D5-markierten Chloramphenicols können Matrixeffekte und Sensitivitätseffekte kompensiert werden. Eine Korrelation zwischen dem D5-markierten und dem nativen Chloramphenicol konnte unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen beobachtet werden (Diagramm 2).

Es konnte eine sehr gute Linearität zwischen der eingesetzten Konzentration und der ermittelten Konzentration erzielt werden. Eine Korrelation mit dem internen Standard wurde herangezogen um Matrixeffekte zu kompensieren. Die Wiederfindungen und Korrelationen erfüllen die gesetzlichen Mindestanforderungen in Bezug auf Empfindlichkeit, Linearität und Reproduzierbarkeit. Die Daten zeigen, dass auch weit unterhalb der gesetzlich geforderten minimalen Bestimmungsgrenzen Chloramphenicol in Lebensmitteln zuverlässig nachgewiesen werden kann.

## 6. Wiederfindungen und Chromatogramme

### 6.1 Wiederfindungen von Chloramphenicol in verschiedenen Matrices

Die Matrixabreicherung ermöglicht eine selektive Anreicherung der Analyten ohne die analytischen Geräte zu belasten. Die Analyse verschiedener tierischer Lebensmittel zeigte hervorragende Ergebnisse in Bezug auf die Wiederfindung und Messempfindlichkeit. Die Eignung der einfachen Extraktion und des 1-Schritt-Clean-up mittels der CrossTOX®-Säule erlaubt eine schnelle und effiziente Probenbearbeitung und die Eignung dieser Methode für verschiedenste tierische Matrices (Tabelle 3).

Tabelle 3: Wiederfindungen von Chloramphenicol aus verschiedenen tierischen Matrices mit unterschiedlichen Konzentrationen.

Matrix	Herkunft	Wiederfindung [%] bei 0,5 µg/kg	Wiederfindung [%] bei 5 µg/kg
Litopenaeus vannamei	Indonesien	105	96
Litopenaeus vannamei	Ecuador	101	87
Pandalus borealis	Norwegen	102	99
Mytilus sp.	Indonesien	108	105
Oncorhynchus mykiss	Dänemark	96	100
Gallus	Deutschland	101	99
Meleagris gallopavo	Deutschland	94	89



Tabelle 4: Testung der Aufreinigung und Wiederfindung von Chloramphenicol aus Honigproben

Matrix	Spiking-Level [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Wiederfindung [%]
Honig	0,1	90
Honig	0,5	96
Honig	1	82
Honig	5	98

Die Wiederfindungen für Honigproben entsprechen den Anforderungen der europäischen Durchführungsverordnung EU 2021/808. Die erzielten Empfindlichkeiten können durch Anpassung der Rücklösevolumina von 150  $\mu\text{L}$  auf bis zu 50  $\mu\text{L}$  bis auf 0,01 ppb abgesenkt werden (Tabelle 4).

Eine Linearität der Wiederfindung bei steigenden Chloramphenicol- oder Malachitgrünkonzentrationen konnte bis zu einer Beladung von 2000 ppb festgestellt werden.

Für aquatische und terrestrische Fleischerzeugnisse konnten Empfindlichkeiten bis 0,05 ppb erzielt werden, ohne Anpassungen/Reduktion der Matrixbeladung.

## 6.2 Chromatographie Chloramphenicol M-H

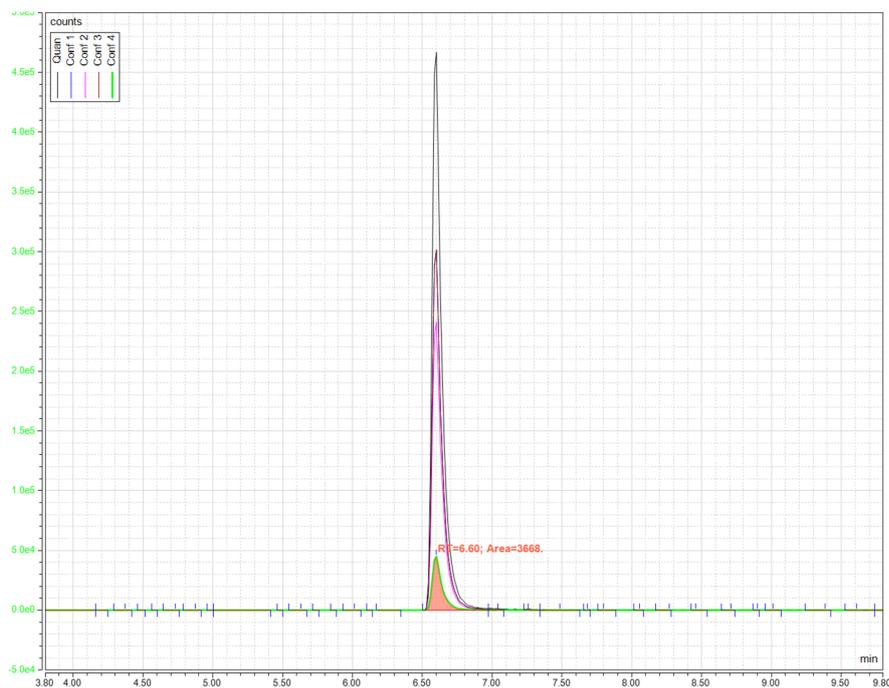


Abbildung 1: Chromatographie der Produktionen von Chloramphenicol unter den in Tabelle 1 und 2 beschriebenen Parametern.

### 6.3 Chromatographie D5-Chloramphenicol M-H

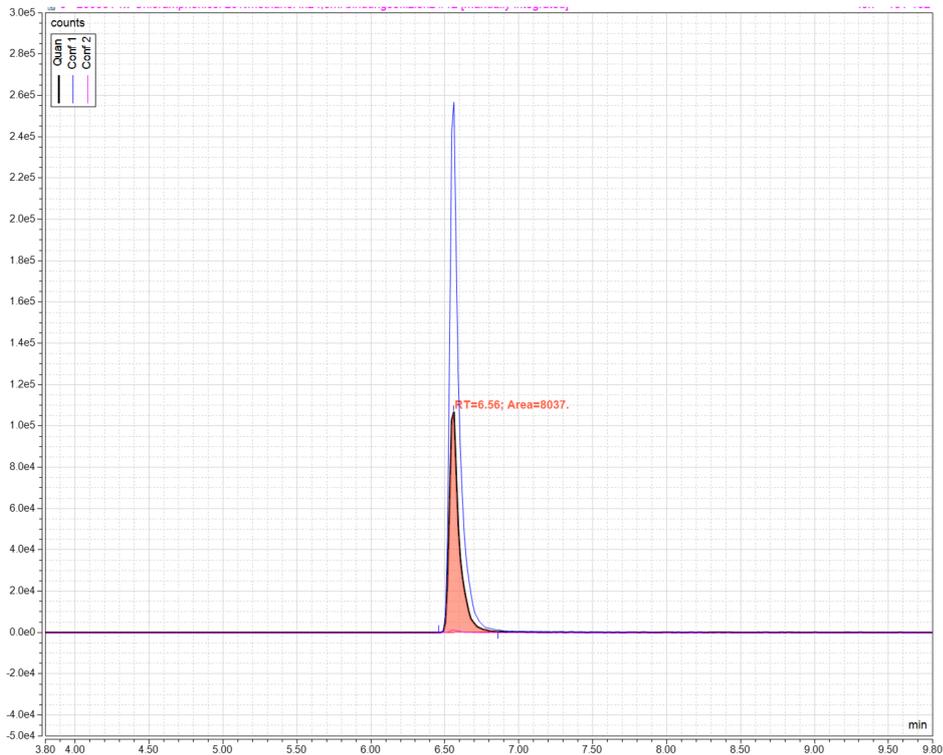


Abbildung 2: LC-MS/MS Chromatographie des D5-markierten Chloramphenicol und der entsprechenden Produktionen bei der Verwendung der unter Tabelle 1 und 2 genannten analytischen Parameter.

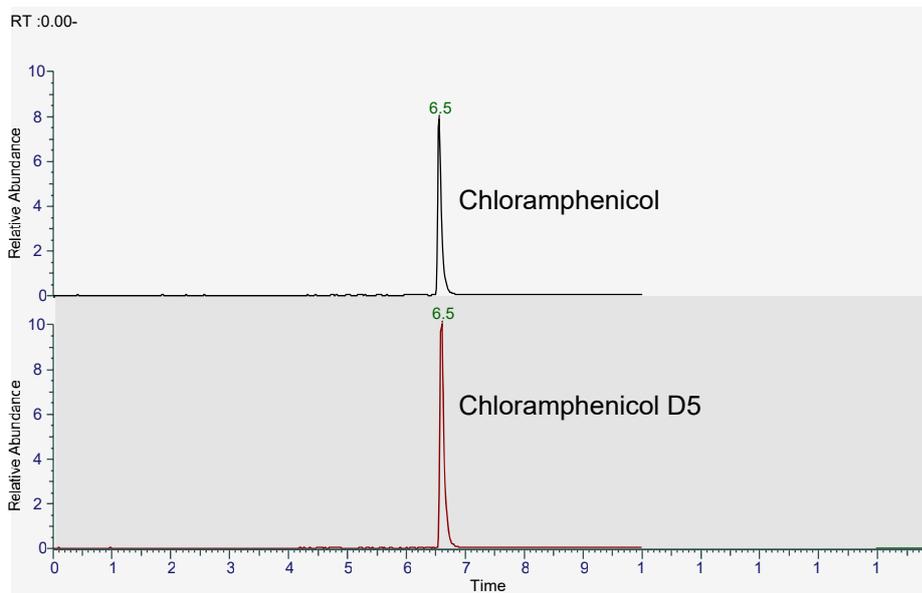


Abbildung 3: Gleichzeitige Analyse von Chloramphenicol, D5-Chloramphenicol im SRM-Modus der LC-MS/MS mit entsprechenden Retentionszeiten.



## 7. Fazit

Die CrossTOX<sup>®</sup>-Säule ist aufgrund ihrer nicht-dispersiven Aufreinigungseigenschaften eine ideale Säule für die Anreicherung von Antibiotika wie Chloramphenicol oder auch Malachitgrün, die häufig in der Aquakultur und in der Massentierhaltung zur Vorbeugung von Infektionen in Tierbeständen eingesetzt werden. Damit können diese Analyten auch weit unterhalb der gesetzlichen Grenzwerte sicher bestimmt werden. Durch die irreversible Bindung von Fetten an das Säulenmaterial können Substanzen wie Chloramphenicol und Malachitgrün selektiv eluiert und der Analytik zugeführt werden. Die hohe Matrixkapazität und Matrixkompatibilität prädestinieren die CrossTOX<sup>®</sup>-Säule für die Probenvorbereitung in der Lebens- und Futtermittelkontrolle.

Bei einer Beladungskapazität im Bereich von 0 - 1000 ng Chloramphenicol bei 20 mL Probenvolumen und 20 % Methanolgehalt wurden Wiederfindungen linear mit über 90 % bestimmt. Mit dieser Applikation kann eine zweistufige Aufreinigung mittels 2 SPE-Säulen und ein damit verbundener Lösungsmittelaustausch vermieden werden. Durch die hervorragenden Aufreinigungseigenschaften der CrossTOX<sup>®</sup>- Säule werden Matrixbestandteile, die die Analytik oder die Messempfindlichkeit negativ beeinflussen, massiv reduziert, was zu einer schnelleren, besseren und zuverlässigen Untersuchung von Fleisch-, Fisch- und Honigproben auf Chloramphenicol oder Malachitgrün führt.

Any Questions?  
Do not hesitate to contact us:

Coverimage: © Adobe Stock 607116794