

# Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von Chloramphenicol in Bienenprodukten mittels LC-MS

Kurzfassung zur Dissertation von Lebensmittelchemikerin Daniela Grotewahl

Dr.-Vater: Prof. Dr. H. Meisel

Chloramphenicol (CAP) ist aufgrund seiner toxischen Eigenschaften EU-weit und in vielen anderen Ländern für die Anwendung bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, verboten. Wiederholte CAP-Funde in Shrimps und Honig chinesischer Herkunft führten zu einem Importverbot für Erzeugnisse tierischen Ursprungs aus China (Entscheidung 2002/69/EG). Chloramphenicol in Honig stellte ein bis dahin nicht bekanntes Problem dar, daher existierte zu diesem Zeitpunkt keine validierte Methode für die Analyse von CAP in Honig, die die rechtlich geforderte Selektivität und Sensitivität erreichte. In der Entscheidung 2003/181/EG wurde für Analysemethoden zur Bestimmung von Chloramphenicol eine Mindestleistungsgrenze (MRPL) von 0,3 µg/kg festgesetzt, so dass Methoden für die CAP-Analyse in Honig Bestimmungsgrenzen von 0,3 µg/kg und niedriger aufweisen müssen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Methoden zur Bestimmung von Chloramphenicol in Honig und in weiteren Bienenprodukten mittels LC-MS entwickelt, die sich speziell für ein großes Probenaufkommen eignen und dabei die geforderte Mindestleistungsgrenze erreichen. Bienenprodukte wie Wachs, Gelée Royale, Pollen und Propolis stellen sehr komplexe Proben dar, die sich sowohl untereinander als auch vom Honig chemisch stark unterscheiden. Trotzdem konnte die Analyse von CAP in Kombination mit einfach durchführbaren Aufarbeitungen auch auf diese Matrices übertragen werden. Für die Routineanalytik ist die Anzahl der für die Probenvorbereitung notwendigen Arbeitsschritte auf ein Minimum zu reduzieren, zudem muss eine Analyse schnell und kostengünstig sein und trotzdem maximale Sicherheit im Hinblick auf Identifizierung und Quantifizierung des Analyten erreichen.

Die Entwicklung einer LC-MS-Methode mit einer vorgeschalteten online-Festphasenextraktion (SPE) und einer LC-MS/MS-Methode erlaubt den Vergleich dieser beiden Techniken anhand der CAP-Analyse. Da bei der Detektion mittels Tandem-MS die Produkt-Ionen der isolierten Quasimolekülonen gemessen werden, erhält man gegenüber der erstgenannten Methode eine höhere Selektivität und kann trotz einer einfachen Aufarbeitung bei gleichzeitiger Verkürzung der Analysenzeit auf eine SPE verzichten. Jedoch kann durch eine Kopplung mit der online-SPE die Empfindlichkeit durch das größere Injektionsvolumen und die Aufkonzentrierung des Analyten zusätzlich erhöht werden. Mit der online-SPE-LC-MS/MS steht somit für die Analyse von CAP eine Methode zur Verfügung, die alle Anforderungen an die moderne Analytik erfüllt. Daher wurde für die dritte Methode zur weiteren Vereinfachung auf einen Extraktionsschritt verzichtet. Nach dem Lösen der Probe erfolgt die weitere Aufreinigung automatisch durch die online-SPE. Diese Methode kann nur semi-quantitativ verwendet werden, jedoch wird der MRPL-Wert von 0,3 µg/kg als Bestimmungsgrenze erreicht. Daher kann die Methode als eine Art Screeningmethode auf CAP-Belastungen  $\geq 0,3$  µg/kg genutzt werden. So sind sehr schnelle Aussagen über CAP-Kontaminationen möglich, da Aufarbeitung und Analyse zusammen nicht mehr als eine Stunde in Anspruch nehmen.

Desweiteren wurde ein Vergleich des für die Analyse von CAP eingesetzten Screeningverfahrens ELISA mit der LC-MS/MS-Methode über die mit beiden Analyse-Arten ermittelten Werte aufgestellt. Für die Matrix Honig zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen den Ergebnissen des ELISA und denen der LC-MS.

Anhand der statistischen Auswertung der CAP-Positiv-Befunde hinsichtlich der angegebenen geographischen Herkunft der Honige und Bienenprodukte konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass sich das „Chloramphenicol-Problem“ nicht nur auf China beschränkt. CAP-Rückstände konnten sowohl in Produkten aus Ländern Osteuropas als auch aus Ländern des asiatischen Raumes sowie Mittel- und Südamerikas nachgewiesen werden. Die angegebenen geographischen Zuordnungen konnten über Pollenanalysen eindeutig bestätigt werden. Somit ist eine Anwendung chloramphenicolhaltiger Arzneimittel in diesen Ländern sehr wahrscheinlich.

Die vorgelegte Arbeit liefert somit erstmals einen umfassenden Überblick zur Problematik der Rückstandsanalytik in Bienenprodukten am Beispiel des Breitbandantibiotikums Chloramphenicol. Die zur Verfügung stehenden Methoden zur Analytik werden kritisch reflektiert und die Anforderungen an moderne Methoden der Routine-Rückstandsanalytik zur Bestimmung dieses Antibiotikums definiert. Unter Einbeziehung der nationalen und internationalen lebensmittelrechtlichen Beurteilung wurden unterschiedlichste Methoden entwickelt, in ihren Vor- und Nachteilen diskutiert und letztendlich durch die Teilnahme an einem offiziellen internationalen Ringversuch abgesichert. Nach umfangreichen Reihenuntersuchungen von Honigen und Bienenprodukten aus allen Teilen der Welt erfolgte die statistische Aufbereitung der Daten. Es wurde abschließend über die CAP-Belastung der einzelnen Bienenprodukte in Abhängigkeit von ihrer geographischen Herkunft berichtet.

