

Die Bestimmung von Tetracyclinen in Schweinen und anderen Fleischproben unter Einsatz von Flüssigchromatographie in Verbindung mit Diodenarray- und Tandem-Massenspektrometrie-Detektoren

Quelle: Meat Science 96 (2014), 1332-1339

Tetracycline finden gewöhnlich als Antibiotika sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin Anwendung. Tetracycline sind eine gute Alternative zu Makroliden und beta-Lactam-Antibiotika, weil sie gegen ein weites Feld von grampositiven und gramnegativen Bakterien wirksam sind. Die Höchstgehalte für Tetracyclinrückstände im Fleisch von lebensmittelliefernden Tieren liegen bei 100 µg/kg (Verordnung (EG) Nr. 37/2010). Zwei hochleistungsflüssigkeitschromatographische Methoden (HPLC-DAD und LC-MS/MS) wurden entwickelt, um Tetracyclinrückstände in Schweinefleischproben zu analysieren. Die Methode umfasst eine Probenvorbereitung mittels fest-flüssig-Extraktion mit McIlvaine-Pufferlösung gefolgt von einer Festphasenextraktion (SPE) unter Verwendung von Strata-XL-Kartuschen. Die entwickelte Probenreinigungsmethode hatte ein selektives Chromatogramm im HPLC-DAD-Trennsystem und einen reduzierten Matrixeffekt bei der Analyse mit dem Tandem-Massenspektrometrie-System zur Folge. Außerdem wurden HPLC-Säulen in Core-Shell-Technologie für die Chromatographietrennleistung getestet, was die Empfindlichkeit und die Selektivität bei den durchgeführten analytischen Bestimmungen erhöhte. Die Validierung der beiden Methoden für Schweinefleischproben wurde durchgeführt nach Entscheidung der Kommission der Europäischen Union 2002/657/EU.

Darüber hinaus wurde die Validierung ebenso fertiggestellt für Rind-, Hähnchen- und Truthahnfleischproben unter Einsatz der HPLC-Diodenarray-Methode (HPLC-DAD). Die Leistungsdaten für die Bestimmungen wurden sowohl mit dotierten als auch mit Realproben evaluiert und systematisch miteinander verglichen. Es wurde festgestellt, dass die LC-MS/MS-Technik (Tandem-Massenspektrometrie-Technik) die genauere Messmethode für dotierte Proben ist. Jedoch führte die HPLC-DAD-Technik zu verlässlicheren Konzentrationsbestimmungen in den Realproben. Sowohl HPLC-DAD- als auch LC-MS/MS-Techniken sind zur Bestätigung von Tetracyclinen in vom Tier stammenden Lebensmittelproben zugelassen (2002/657/EG). Beide Methoden zeigten gute Empfindlichkeiten um niedrige Rückstandskonzentrationen von Tetracyclinen zu detektieren. Flüssigchromatographie in Kombination mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) scheint die bessere Wahl zu sein, falls Lebensmittel in Staaten (wie beispielsweise Russland), exportiert werden, wo hohe Empfindlichkeit und Selektivität der Analyse benötigt werden. Die umfassende Validierung und das Analysenverfahren für Realproben heben die Unterschiede zwischen den beiden Analysenverfahren hervor. Für die Validierung – ausgeführt gemäß EU-Richtlinie – zeigt die LC-MS/MS-Technik bessere Leistungscharakteristiken bezüglich Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und analytische Grenzbereiche als die HPLC-DAD-Technik. Darüber hinaus konnten bei Einsatz der LC-MS/MS-Technik Nachweis- und Bestimmungsgrenze weiter reduziert werden wegen der besseren Empfindlichkeit. Die Methodvalidierungen wurden durchgeführt mit dotierten Proben, bei denen Blindproben mit entsprechenden Standardverbindungen aufgestockt wurden. Im Fall der Methodenanwendung wurden Realproben gemessen. Daher würde die Technik für eine Überwachung geeignet sein, die genauere Bestimmungen für Realproben liefert. Die HPLC-DAD-Methode ermöglicht genauere Werte bei der Analyse von Realproben: die detektierten Konzentrationen lagen näher am ausgewiesenen Probenwert. Außerdem könnte die LC-UV-Methode, die für Fleisch optimiert ist, auch für Leberproben verwendet werden, während die LC-MS/MS-Methode weitere Optimierung benötigt, um verlässliche Konzentrationen in Leberproben zu detektieren. Obwohl der interne Standard (ISTD) Metacyclin während der tandemmassenspektrometrischen Detektion benutzt wurde, könnten koeluiierende Matrices die gemessenen Konzentrationen der Zielverbindungen beeinflusst haben. Das zeigt den signifikanten Matrix-Effekt an, der mit LC-MS/MS in unserer

Studie zu beobachten war. Obwohl der interne Standard Metacyclin neben dem Chlortetracyclin-Peak mit dem selben chemischen Hintergrund eluiert, war es nicht möglich den Rückgang des Ionenquellen-Ansprechverhaltens zu kompensieren, hervorgerufen durch coeluerende Matrixkomponenten. Es kann festgestellt werden, dass eine geeignete Probenvorbereitung und Optimierung des Messinstrumentes für die LC-MS/MS-Technik zwingend erforderlich ist. Isotopenmarkierte interne Standardverbindungen würden geeigneter sein als ein interner Standard um Matrixeffekte zu kompensieren. Die Verdünnung von Proben könnte die Matrixeffekte reduziert haben und führte zu einer genaueren Quantifizierung durch die LC-MS/MS-Methode.

Abschließend fassen die Autoren zusammen, dass zwei HPLC-Methoden entwickelt wurden, um Tetracyclinrückstände in Schweinefleisch unter Verwendung der gleichen Probenaufbereitungsmethode zu analysieren. Die LC-UV-Methode wurde während einer ausgedehnten matrixbezogenen innerbetrieblichen Validierung auch bei anderen Fleischprobenarten angewendet. Die flüssigchromatographische Trennung unter Verwendung unterschiedlicher Nachweistechiken ergab variierende Konzentrationen sowohl in dotierten als auch in Realproben. Die Flüssigchromatographie in Verbindung mit Tandemmassenspektrometrie ermöglichte genauere Konzentrationsangaben für dotierte Proben, die die Kriterien der EU für die Validierung erfüllten. Jedoch hatte die HPLC-DAD-Technik eine bessere Richtigkeit für Realproben. Obwohl die auch entwickelte LC-UV-Methode nicht alle Validierungskriterien erfüllte, kommt sie wegen ihrer hohen Genauigkeit in Realproben immer noch für Monitoringzwecke in Betracht. In Zukunft kann die Adaption der HPLC-DAD-Methode zur LC-Tandemmassenspektrometrie-Methode unter Einsatz der Isotopenverdünnungsmethode leichter durchgeführt werden.

SCHWIND