

Dosage de résidus de streptomycine dans le miel par HPLC avec postdérivatisation et détection fluorimétrique = Analysis of streptomycin residues in honey by liquid chromatography with postderivatization and fluorometric detection

Autor(en): **Edder, Patrick / Cominoli, André / Corvi, Claude**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **89 (1998)**

Heft 3

PDF erstellt am: **10.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983151>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Dosage de résidus de streptomycine dans le miel par HPLC avec postdérivatisation et détection fluorimétrique

Analysis of Streptomycin Residues in Honey by Liquid Chromatography with Postderivatization and Fluorometric Detection

Key words: Streptomycin, Honey, HPLC, Postcolumn derivatization, Fluorometric detection

Patrick Edder, André Cominoli et Claude Corvi
Service du chimiste cantonal, Genève

Introduction

La streptomycine, médicament vétérinaire à propriétés antibiotiques de la famille des aminoglycosides, est utilisée en apiculture pour lutter contre la loque des abeilles. Récemment, les laboratoires cantonaux ont été alertés par l'Office fédéral de la santé publique (OFSP) sur la présence de résidus de streptomycine dans les miels étrangers, et plus particulièrement des pays d'Amérique centrale et du sud (Mexique, Guatemala, etc.), qui sont de très gros exportateurs de miel. De plus, une grande partie des miels commercialisés sur le marché suisse sont en fait des mélanges de miels provenant de divers pays. Par une circulaire du mois de novembre 1997, l'OFSP a fixé une valeur de tolérance pour la streptomycine dans les miels de 0,1 mg/kg jusqu'en janvier 1999. Par la suite, cette valeur sera abaissée à 0,01 mg/kg en janvier 2000.

Si de telles teneurs de streptomycine n'ont pas d'effet toxique direct, de nombreux cas d'hypersensibilité allergique ont été signalés ces dernières années (1). La streptomycine peut produire des éruptions cutanées sévères particulièrement chez les enfants en bas âge. En outre, des résistances microbiennes à la streptomycine ont été mis en évidence chez les bactéries *Eschérichia coli*, *Salmonella* et *Shigella* (1). C'est pourquoi il est souhaitable de contrôler les teneurs en résidus de streptomycine dans l'alimentation courante.

Par conséquent, il est nécessaire de posséder une méthode analytique suffisamment sensible et spécifique. Les méthodes microbiologiques et le «Charm Test» ne répondent pas à ces critères (2, 3). Les tests immunologiques commercialisés sont

par contre très sensibles et peuvent être utilisés comme méthode de dépistage, toutefois les résultats obtenus par cette technique doivent être confirmés par une méthode plus spécifique, telle que la chromatographie (2, 3).

La streptomycine ne possède pas de groupements chromophores importants et est généralement dérivatisée pour obtenir un composé UV sensible ou fluorescent (4-9). Cette dérivatisation permet d'atteindre alors une sensibilité et une sélectivité satisfaisante pour l'analyse de résidus dans des matrices biologiques complexes.

Ce travail décrit une méthode d'analyse de la streptomycine basée sur les travaux de *Kocher* (4). Cependant, l'obtention de faibles rendements nous a conduit à optimiser la préparation de l'échantillon, et particulièrement les purifications d'extraits sur phase solide.

Une campagne d'analyse de résidus de streptomycine dans 64 miels d'origines diverses (Amérique centrale et du sud, Suisse, France, Italie, etc.) est également présentée. La streptomycine a été dosée au moyen d'un test immunologique (ELISA) et de la méthode chromatographique (HPLC). Les résultats obtenus au moyen de ces deux techniques sont également discutés.

Partie expérimentale

Appareillage

- Polytron PCU Kinematica
- Centrifugeuse Heraeus Megafuge 1,0
- HPLC Jasco avec pompes PU980, détecteur fluorimétrique FL920, four Jones Chromatography 7971
- Pompe SSI LC 300
- Bain thermostaté
- Coil de réaction en téfzel 1/16" de 10 m
- Kit ELISA Ridascreen streptomycine R-3101 (Dispolab AG)
- Spectrophotomètre avec lecture de l'absorbance à 450 nm.

Réactifs

- Hexane, Terbutylmethylether (TBME) pour analyses (Merck)
- Acétonitrile (ACN), Méthanol (MeOH) Lichrosolv (Merck) pour la chromatographie
- Acide perchlorique (HClO_4) 70% pour analyses, acide acétique glacial (Merck)
- Hydroxyde de sodium (NaOH) puriss, sodium dihydrogénophosphate monohydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), disodium hydrogenophosphate dihydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), chlorure de sodium (NaCl), 1-heptanesulfonate de sodium (AHS) LiChropur, acide 1,2 naphthoquinone-4-sulfonique (NQS) sel de sodium (Merck).

- Sulfate de streptomycine (Sigma)
- Miel de référence contenant 38 µg/kg de streptomycine (HKV1, Promochem GmbH).

Mode opératoire

Méthode HPLC

La représentation schématique de l'ensemble du mode opératoire est illustrée par la figure 1.

1. Extraction de la streptomycine dans le miel

L'extraction est réalisée sur 5 g de miel, préalablement homogénéisé, qui sont placés dans un tube à centrifuger de 100 ml. Après addition de 20 ml d'acide perchlorique à pH 2,0, le mélange est mixé 5 minutes au Polytron, puis centrifugé pendant 15 minutes à 2800 tr/min. Le surnageant est récupéré et filtré sur papier.

2. Purification par extraction sur phase solide

Le filtrat est alors purifié par SPE sur cartouche échangeuse de cations (acide sulfonique, 200 mg, Applied Separations) conditionnée avec 5 ml de HClO₄ pH 2,0. Après la charge de l'échantillon, la cartouche est lavée avec 5 ml de H₂O. La streptomycine est ensuite éluée avec 25 ml de tampon phosphate 0,2 M pH 8,0. Cette étape s'est révélée être la phase délicate de la méthode et l'utilisation de cartouche SPE contenant 500 mg de phase ou même parfois des phases provenant d'autres fournisseurs mène à une élution incomplète de la streptomycine.

On additionne alors à l'éluat 2 ml de solution AHS 0,5 M et le pH est réglé à 2,0 avec de l'acide phosphorique concentré. Après conditionnement d'une cartouche SPE C18 (500 mg, Baker) au moyen de 5 ml de MeOH et 10 ml d'une solution AHS 10 mM pH 3,3, l'échantillon est chargé sur la phase C18. La cartouche est ensuite lavée avec 10 ml d'eau, puis 4 ml d'un mélange TBME/hexane 4:1. L'élution de la streptomycine est réalisée avec 5 ml d'une solution méthanolique de AHS 10 mM. L'utilisation de l'agent de paire d'ions permet d'obtenir une élution plus quantitative de la streptomycine.

Comme l'évaporation à sec de la solution provoque généralement des pertes relativement importantes en streptomycine (peut-être dû à un phénomène de sublimation), l'éluat est transféré dans un ballon poire, où 2 ml de solution AHS 10 mM à pH 3,3 sont additionnés. Le méthanol est alors évaporé au rotavapeur (T = 65 °C, 100 mbar, pendant 30 min). L'extrait aqueux ainsi obtenu est collecté dans un ballon jaugé de 5 ml. Le ballon poire est rincé deux fois avec deux portions de 1 ml de AHS 10 mM pH 3,3, qui sont ajoutés dans le ballon jaugé, qui est complété à 5 ml.

3. Conditions chromatographiques

Précolonne HP Hypersil ODS 4 x 4 mm, 5 µm

Extraction

5 g d'échantillon
20 ml HClO₄ pH 2,0
Ultraturax 5 min.
Centrifugation 2800 tr/min 15 min
Filtration sur papier

**Purification sur cartouche
Echangeuse de cations**

cartouche SPE acide sulfonique (SCX, 200 mg)
Activation : 5 ml HClO₄ pH 2,0
Charge
Lavage : 5 ml H₂O
Elution : 25 ml tampon phosphate 0,2 M pH 8,0

Ajouter 2 ml AHS 0,5 M
Régler le pH à 2,0 avec H₃PO₄ conc.

Purification sur cartouche C18

Cartouche SPE C18 (Baker)
Activation : 5 ml MeOH, 10 ml AHS 10 mM pH 3,3
Charge
Lavage : 10 ml H₂O, 4 ml TBME/hexane 1:4 v:v
Elution : 5 ml AHS 10 mM/MeOH
Ajouter 2 ml AHS 10 mM pH 3,3
Evaporer 60 C, 120 mbar, 30 min
Diluer à 5 ml avec AHS 10 mM pH 3,3

Analyse HPLC

Colonne Hypersil BDS 100 x 4 mm, 3 µm
Précolonne Hypersil ODS 4 x 4 mm, 5 µm
Phase mobile :
A) AHS 10 mM, NQS 0,4 mM dans 20 % ACN, pH 3,3 / ACN 97%
B) ACN 3 %
Débit = 0,8 ml/min; T = 40 C
Postdérivatisation : NaOH 0,2 M, débit 0,6 ml/min
coil réaction : 10 m, Tréaction = 55 C
Détection fluorimétrique λ_{ex} = 260 nm, λ_{em} = 435 nm

Fig. 1. Représentation schématique de l'ensemble du mode opératoire

Colonne HP Hypersil BDS 100 x 4 mm, 3 μ m

Phase mobile: Eluant A: AHS 10 mM, NQS 0,4 mM dans 20% ACN

Eluant B: ACN

L'éluant A doit être protégé de la lumière afin d'éviter la photodégradation du réactif de dérivatisation (NQS)

Mode isocratique 97% A, 3% B

Débit = 0,8 ml/min, T = 40 °C

Réaction post-colonne: NaOH 0,2 M

Débit 0,6 ml/min

T_{réaction} = 55 °C, réaction coil de 10 m

Détection fluorimétrique: λ_{ex} = 260 nm; λ_{em} = 435 nm

Test immunologique ELISA

Après homogénéisation, 10 g de miel sont mélangés et homogénéisés avec 10 ml d'eau distillée. La solution est ensuite diluée 20 fois avec le tampon PBS (0,55 g NaH₂PO₄ x H₂O + 2,85 g Na₂HPO₄ x 2H₂O + 8,7 g NaCl dans 1 l d'eau distillée) avant le test.

Dans chaque cuve, 50 μ l de la solution diluée d'enzymes conjugués (200 μ l de solution concentrée + 2 ml de tampon), 50 μ l de standard ou d'échantillon, et 50 μ l de solution d'anticorps de streptomycine diluée (200 μ l de solution concentrée + 2 ml de tampon) sont déposés. Le mélange est agité et incubé 2 h à température ambiante. Les cuves sont vidées complètement sur du papier absorbant et rincées avec 3 fois 250 μ l d'eau distillée. Après addition de 50 μ l de substrat et 50 μ l de chromogène dans chaque cuve, les cuves sont agitées vigoureusement et laissées incuber 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Un volume de 100 μ l de solution «stop» est ensuite ajouté dans chaque cuve. Après agitation l'absorbance à 450 nm est mesurée.

Résultats et discussion

Validation de la méthode

La méthode HPLC a été validée selon les directives pour le Manuel suisse des denrées alimentaires du 25 avril 1996 (10).

Sélectivité

La sélectivité de la méthode est excellente et les chromatogrammes provenant de l'analyse de divers miels n'ont montré aucun pic parasite gênant le dosage de la streptomycine. La figure 2 présente les chromatogrammes typiques provenant de l'analyse d'un miel sans et avec résidus (100 μ g/kg) de streptomycine.

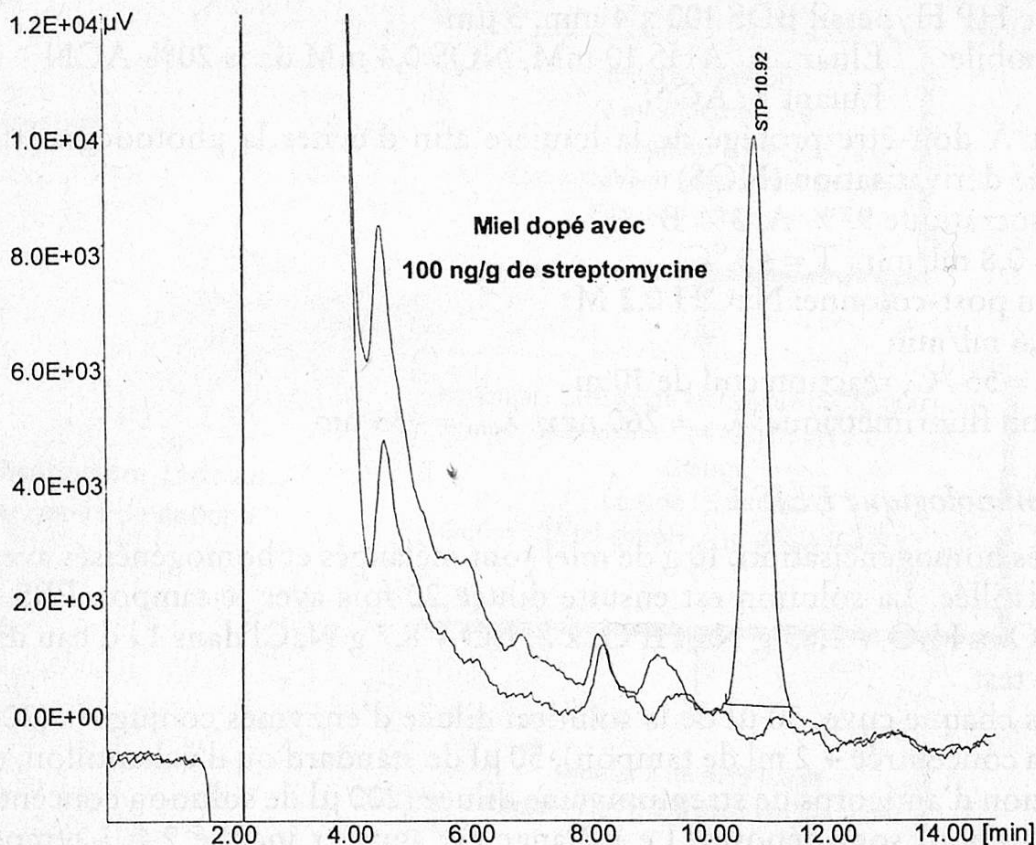


Fig. 2. Chromatogrammes provenant de l'analyse d'un miel avec et sans ajout de 0,1 mg/kg de streptomycine

Recouvrements et répétabilité

Sept portions de 5 g de miel sont dopées par 500 μ l de solution contenant 1 mg/kg de streptomycine (soit un échantillon contenant 100 μ g/kg de streptomycine, ce qui constitue la valeur limite actuellement admise). L'analyse est alors effectuée selon la méthode décrite précédemment.

Le recouvrement moyen, calculé par rapport à une injection directe de contenu équivalent en streptomycine, est de 91,1% avec une excellente répétabilité de 3,6% ($n = 7$).

Linéarité et exactitude

Des portions de 5 g d'échantillon de miel sont analysées après dopage par diverses quantités de streptomycine (10, 20, 50, 100, 200 et 400 μ g/kg).

La méthode est parfaitement linéaire pour cette gamme de concentration et le coefficient de corrélation obtenu est de 0,99992.

Le tableau 1 présente les concentrations mesurées (calculées par étalonnage externe), les écarts-type et les recouvrements observés sur tout le domaine de concentration. Les recouvrements sont très satisfaisants et compris entre 86 et 94%.

La méthode a également été testée sur un miel de référence contenant 38 μ g/kg de streptomycine. L'analyse a été effectuée en triple exemplaire et par deux personnes différentes.

Tableau 1. Exactitude et recouvrements entre 0,01 et 0,4 mg/kg

Cth. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Cm ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>n</i>	SD	$\eta\%$
10	8,6	3	1,08	86,0
20	18,4	3	0,67	92,2
50	45,5	2	0,42	91,0
100	90,8	2	2,62	90,8
200	187,9	2	0,57	94,0
400	370,8	3	3,48	92,7

Cth = concentration théorique; Cm = concentration mesurée
n = nbre de mesure; SD = déviation standard, η = recouvrement

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2 et montrent bien que l'exactitude (104% de la valeur théorique) et la répétabilité (6%) de la méthode conviennent parfaitement à l'analyse de résidus de streptomycine dans le miel.

Tableau 2. Analyse d'un miel de référence contenant 38 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de streptomycine

	Personne 1	Personne 2	Moyenne
Valeur mesurée ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	38,8	40,3	39,6
Ecart-type	3,1	2,0	2,4
Recouvrement %	102,1	106,1	104,1

Limites de quantification et de détection

La limite de quantification (LQ) est fixée à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La limite de détection (LD) est estimée à 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ avec un signal bruit supérieur à 3.

La figure 3 présente le chromatogramme obtenu après extraction de 5 g de miel dopé par 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de streptomycine.

Analyse des résidus de streptomycine dans des miels du commerce

La méthode a alors été appliquée à 64 miels vendus dans le commerce. Ces miels ont des origines diverses, mais la plupart sont des mélanges de miels provenant du monde entier.

La figure 4 présente graphiquement les résultats obtenus et montre qu'un nombre très important (42%) d'échantillons contient des résidus de streptomycine. Les concentrations en streptomycine mesurées sont comprises entre 7 et 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La plupart des miels possèdent des concentrations en streptomycine au-dessous de la valeur de tolérance édictée par l'OFSP (actuellement 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), excepté deux échantillons révélant des teneurs en streptomycine de 138 et 163 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Il faut tout de même noter que, soit les producteurs de miel d'Amérique centrale et du sud, soit

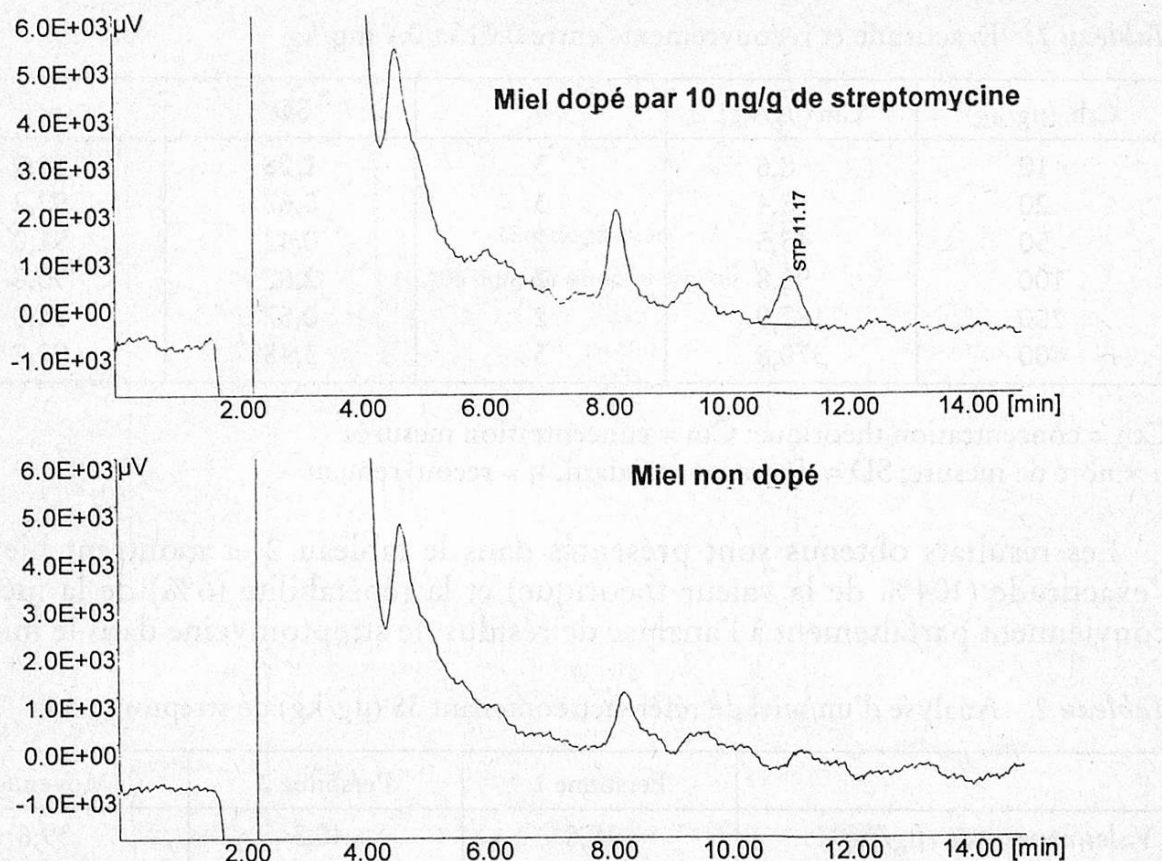


Fig. 3. Chromatogramme obtenu après extraction de 5 g de miel dopé par 0,01 mg/kg de streptomycine

les importateurs européens devront faire des efforts importants afin de diminuer ces résidus de streptomycine d'ici l'an 2000, puisque la valeur de tolérance sera abaissée alors à 10 µg/kg.

Il est également intéressant de considérer l'origine des miels contenant des résidus de streptomycine (voir fig. 5). En effet, non seulement les miels d'Amérique centrale et du sud, mais également les miels des grandes coopératives résultant de mélanges de production d'origines très diverses, dont une partie seulement provient du continent américain, sont presque tous positifs en streptomycine. Ces derniers montrent même parfois des teneurs supérieures aux miels provenant uniquement d'Amérique centrale ou du sud. Finalement, certains miels européens n'indiquent vraisemblablement pas l'origine exacte du (ou des) miel(s), mais seulement le lieu de conditionnement du produit final et contiennent également des résidus de streptomycine.

Comparaison avec le test immunologique ELISA

Nous avons comparé la technique HPLC avec les résultats obtenus au moyen d'un test immunologique ELISA. Les aspects qualitatifs et quantitatifs ont été

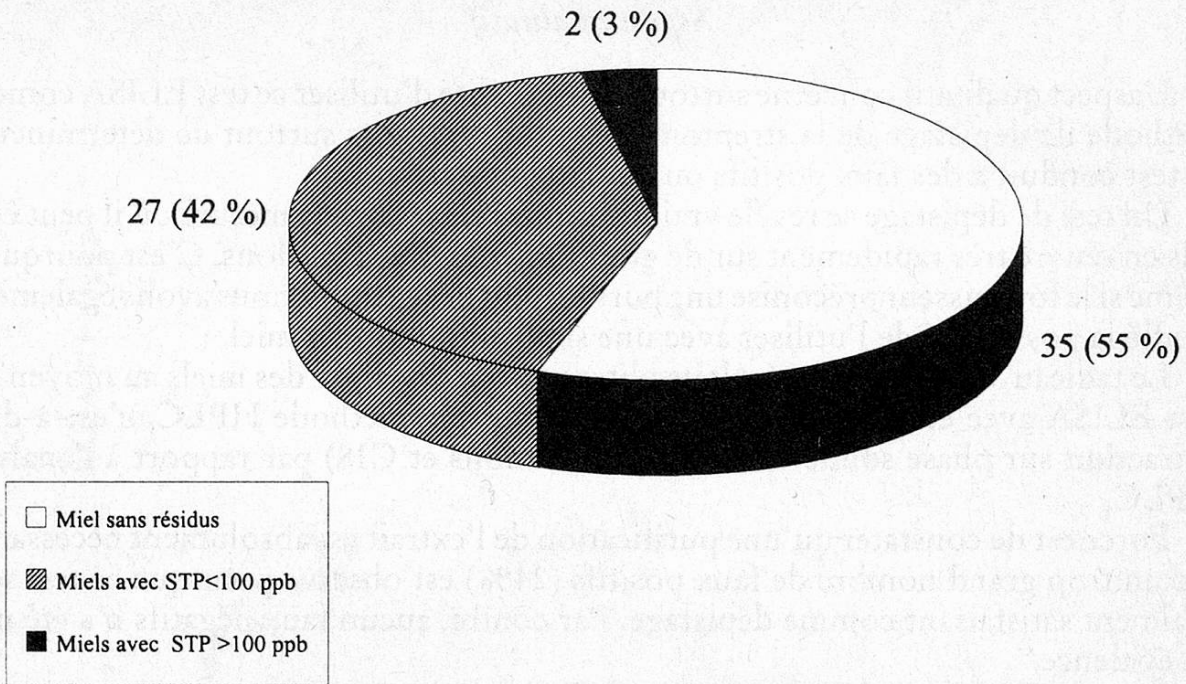


Fig. 4. Résultats obtenus pour l'analyse des résidus de streptomycine dans 64 miels actuellement commercialisés en Suisse

étudiés afin de déterminer d'une part, si ce test est utilisable comme dépistage de résidus de streptomycine dans le miel, d'autre part si les résultats quantitatifs donnent une bonne corrélation avec la méthode HPLC.

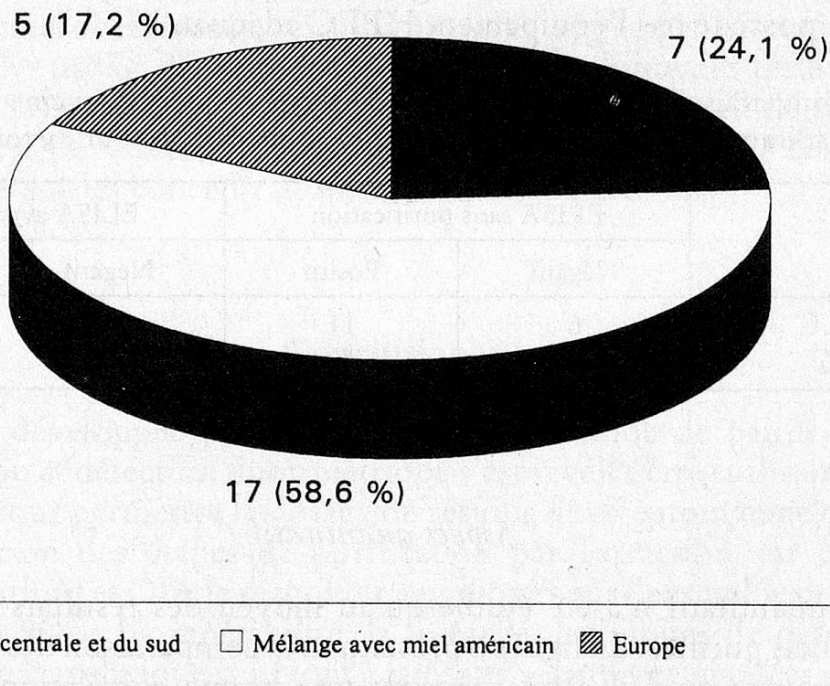


Fig. 5. Pays d'origine des miels du commerce de détail contenant des résidus de streptomycine

Aspect qualitatif

L'aspect qualitatif concerne surtout la possibilité d'utiliser ce test ELISA comme méthode de dépistage de la streptomycine. Il s'agit donc surtout de déterminer si ce test conduit à des faux positifs ou des faux négatifs.

Un test de dépistage se révèle vraiment intéressant dans la mesure où il peut être mis en œuvre très rapidement sur de grandes séries d'échantillons. C'est pourquoi, même si le fournisseur préconise une purification des extraits, nous avons également étudié la possibilité de l'utiliser avec une simple dilution du miel.

Le tableau 3 présente les résultats obtenus pour l'analyse des miels au moyen du test ELISA avec et sans purification (identique à la méthode HPLC, c'est-à-dire extraction sur phase solide échangeuse de cations et C18) par rapport à l'analyse HPLC.

Force est de constater qu'une purification de l'extrait est absolument nécessaire, car un trop grand nombre de faux positifs (24%) est observé pour que ce test soit vraiment satisfaisant comme dépistage. Par contre, aucun faux négatifs n'a été mis en évidence.

Après purification de l'extrait, les résultats obtenus correspondent tout à fait à ceux observés par HPLC et ne présentent presque plus de faux positifs (4%). Cependant, comme chaque résultat positif obtenu par ELISA doit de toute façon être confirmé par HPLC, l'utilité d'un tel test dans ces conditions peut être sujet à discussion. En effet, d'une part le coût des kits ELISA (soit ~20 frs par échantillon) ajouté à celui des cartouches SPE (~10 frs par échantillon) est très élevé, d'autre part le gain de temps normalement escompté par l'utilisation d'un test de dépistage est minime, car la partie prépondérante du temps d'analyse HPLC réside justement dans les étapes d'extraction et de purification. Finalement, cette approche n'apparaît vraiment souhaitable que lors de très grandes séries d'analyse ou si le laboratoire d'analyse ne possède pas l'équipement HPLC adéquat.

Tableau 3. Comparaison qualitative entre les analyses de streptomycine par HPLC et par test immunologique ELISA avec et sans purification sur cartouches SPE

	ELISA sans purification		ELISA avec purification	
	Négatif	Positif	Négatif	Positif
Négatif HPLC	6	11	15	2
Positif HPLC	0	29	0	29

Aspect quantitatif

L'aspect quantitatif n'a été étudié qu'au moyen des résultats obtenus sur les extraits de miels purifiés. La figure 6 présentant la comparaison des résultats HPLC et ELISA montre qu'il y a relativement une bonne corrélation entre les deux techniques. La droite obtenue présente une ordonnée à l'origine de $2,06 \pm 2,24$ et

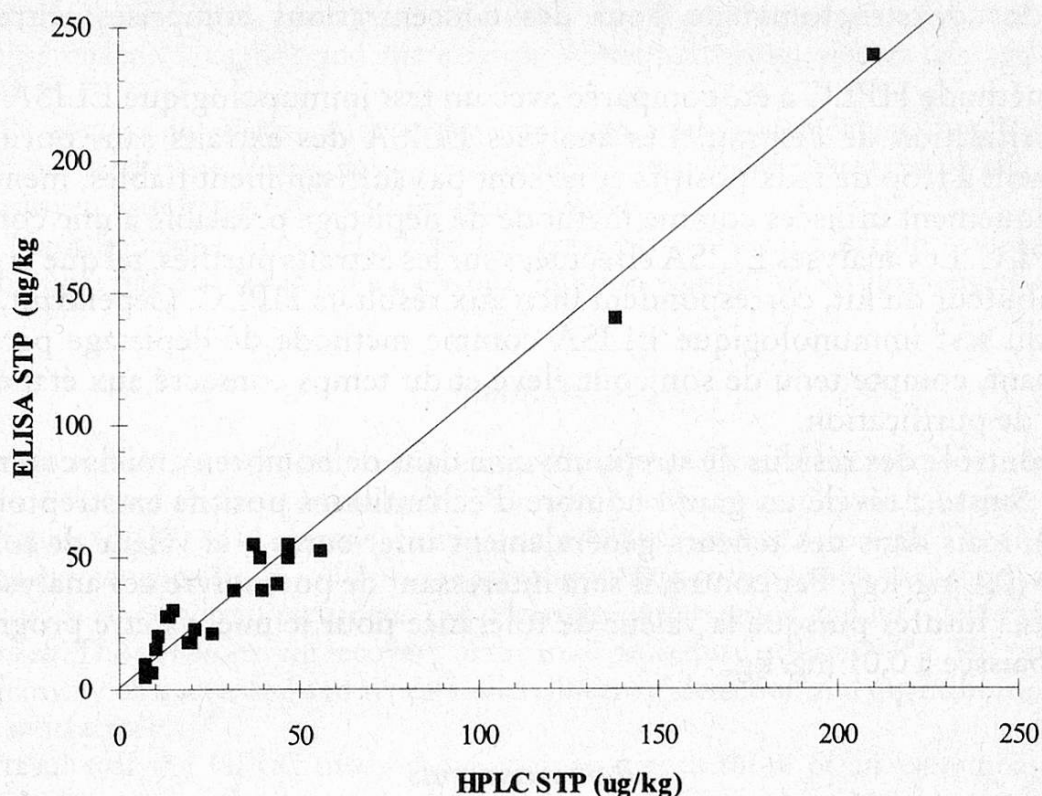


Fig. 6. Corrélation des résultats quantitatifs obtenus par HPLC et test immunologique ELISA après purification des extraits

une pente de $1,07 \pm 0,037$ avec un coefficient de corrélation de 0,987. Un test de Student avec un intervalle de confiance de 95% montre que l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 et que la pente n'est pas significativement différente de 1,0.

L'analyse du miel de référence, certifié à $38 \mu\text{g}/\text{kg}$ a également donné un excellent résultat, $37,3 \pm 3,9 \mu\text{g}/\text{kg}$. Notons encore que la répétabilité des résultats obtenus par ELISA (~11%) est moins bonne qu'en HPLC (~5%) du fait de la calibration logarithmique, car de faibles variations d'absorbance conduisent à des différences plus importantes sur les concentrations correspondantes.

Conclusions

La méthode développée par chromatographie liquide de paires d'ions avec postdérivatisation et détection fluorimétrique s'est révélée être suffisamment sélective et sensible pour permettre le dosage de résidus de streptomycine dans le miel. Après optimisation des étapes de purification par extraction sur phase solide échangeuse de cations et C18, le recouvrement moyen sur l'ensemble de la procédure est d'environ 90%. La répétabilité, la linéarité, les limites de détection et de quantification de la technique sont tout à fait satisfaisantes et adaptées aux analyses

de résidus de streptomycine pour des concentrations comprises entre 10 et 400 µg/kg.

La méthode HPLC a été comparée avec un test immunologique ELISA avec et sans purification de l'extrait. Les analyses ELISA des extraits sans purification conduisent à trop de faux positifs et ne sont pas suffisamment fiables, même pour être uniquement utilisées comme méthode de dépistage préalable à une confirmation HPLC. Les analyses ELISA effectuées sur les extraits purifiés, tel que le prévoit le distributeur du kit, correspondent bien aux résultats HPLC. Cependant, l'utilisation du test immunologique ELISA comme méthode de dépistage paraît peu intéressant, compte tenu de son coût élevé et du temps consacré aux étapes fastidieuses de purification.

Le contrôle des résidus de streptomycine dans de nombreux miels commercialisés en Suisse a révélé un grand nombre d'échantillons positifs en streptomycine (~42%), mais dans des teneurs généralement inférieures à la valeur de tolérance actuelle (0,1 mg/kg). Par contre, il sera intéressant de poursuivre ces analyses dans les années futures puisque la valeur de tolérance pour le miel va être progressivement abaissée à 0,01 mg/kg.

Remerciements

Nous remercions Mlle *Frédérique Berger* pour la partie pratique des analyses.

Résumé

Une méthode de dosage de résidus de streptomycine dans les miels par chromatographie liquide de paires d'ions avec postdérivatisation au moyen de l'acide 1,2 naphthoquinone-4-sulfonique (NQS) et détection fluorimétrique est présentée. La purification de l'extrait de miel est effectué par extraction sur phase solide, premièrement avec une cartouche échangeuse de cations, deuxièmement avec une cartouche C18. La sélectivité alors obtenue est excellente. Le recouvrement sur l'ensemble de la procédure est d'environ 90%. La méthode est caractérisée quantitativement et la répétabilité, la linéarité, les limites de détection et de quantification sont tout à fait satisfaisantes.

La méthode HPLC est ensuite comparée avec un test immunologique ELISA avec et sans purification de l'extrait. La purification s'est révélée nécessaire afin de diminuer le nombre important de faux positifs (~25%).

Le contrôle des résidus de streptomycine dans de nombreux miels vendus dans le commerce a révélé un grand nombre d'échantillons positifs en streptomycine (~42%).

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren für die Bestimmung von Streptomycinrückständen in Honig beschrieben. Das Verfahren beruht auf einer Ionenpaar-Chromatographie (HPLC), einer Nachkolonnenderivatisierung mit 1,2 Naphthochinon-sulfonsäure-(4) (NQS) und Fluoreszenzdetektion. Zur Extraktreinigung dient eine Kationenaustauschkartusche, gefolgt von

einer C18-Festphasenkartusche. Die Selektivität, die Wiederfindungsraten (ca. 90%), die Erfassungsgrenzen (5 µg/kg) und die relative Wiederholbarkeit werden als ausreichend eingestuft.

Die Ergebnisse des Verfahrens werden mit jenen eines immunchemischen Verfahrens (ELISA), mit und ohne Vorreinigung, verglichen. Ohne Vorreinigung muss mit etlichen falsch positiven Resultaten (ca. 25%) gerechnet werden.

Eine Marktkontrolle von 64 Honigproben ergab etwa 42% mit Streptomycinrückständen, wobei aber nur 3% der Proben die Konzentration von 100 µg/kg übersteigen.

Summary

A simple and sensitive procedure is presented for the analysis of streptomycine in honey. The method is based on a separation by ion pair liquid chromatography with β -naphthoquinone-4-sulfonate (NQS) postcolumn derivatization and fluorescence detection. The clean up of the honey extract consists of solid phase extractions, first with a cation exchange cartridge, secondly with an octadecyl cartridge. The selectivity is very good and no interfering peaks are observed. The streptomycin recovery of the total procedure is about 90%. The procedure is quantitatively characterised and repeatability, linearity, detection and quantification limits are very satisfactory.

The results of the HPLC method are compared with those of an immunoassay test (ELISA) and the possibility of using this test for screening with and without solid phase extraction clean up is discussed as well. In order to avoid the wrong positive ELISA results, a clean up step is necessary.

The control of streptomycin residues in commercial honeys from various countries has revealed a very important number of samples containing residues of streptomycin (~42%).

Bibliographie

1. World Health Organization: Twelfth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Technical report series N° 430 WHO 16.-18., Geneva 1969.
2. *Salisbury, C.*: Chemical analysis for antibiotics used in agriculture. In: AOAC Int., Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K., McNeil, J.D., 307-332, Arlington 1995.
3. *Shaikh, B.* and *Allen, E.H.*: Overview of physical-chemical methods for determining aminoglycoside antibiotics in tissues and fluids of food-producing animals. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**, 1007-1013 (1985).
4. *Kocher, U.*: Nachweis von Streptomycin-Rückständen in Honig mittels Charm II-Test und Absicherung der Befunde durch HPLC mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion. Lebensmittelchemie **50**, 115-117 (1996).
5. *Shaikh, B.* and *Moats, W.A.*: Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. J. Chromatogr. **643**, 369-378 (1993).
6. *Kurosawa, N.*, *Kuribayashi, S.*, *Owada, E.* and *Ito, K.*: Determination of streptomycin in serum by high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **343**, 379-385 (1979).
7. *Gerhardt, G.C.*, *Salisbury, C.* and *McNeil, J.D.*: Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in animal tissue by on-line sample enrichment liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **77**, 334-337 (1994).

8. Gerhardt, G.C., Salisbury, C. and McNeil, J.D.: Analysis of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **77**, 765–767 (1994).
9. Kubo, H., Kobayashi, Y. and Kinoshita, T.: Fluorescence determination of streptomycin in serum by reversed-phase ion-pairing liquid chromatography. *Anal. Chem.* **58**, 2653–2655 (1986).
10. Buxtorf, U.P., Camenzind, R., Gerber, R., Meier, P., Walter, E. und Zürcher, K.: Validierung von Methoden für das Schweizerische Lebensmittelbuch. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **88**, 202–208 (1997).

Dr Patrick Edder
Service du chimiste cantonal
22, Quai Ernest-Ansermet
Case postale 166
CH-1211 Genève 4