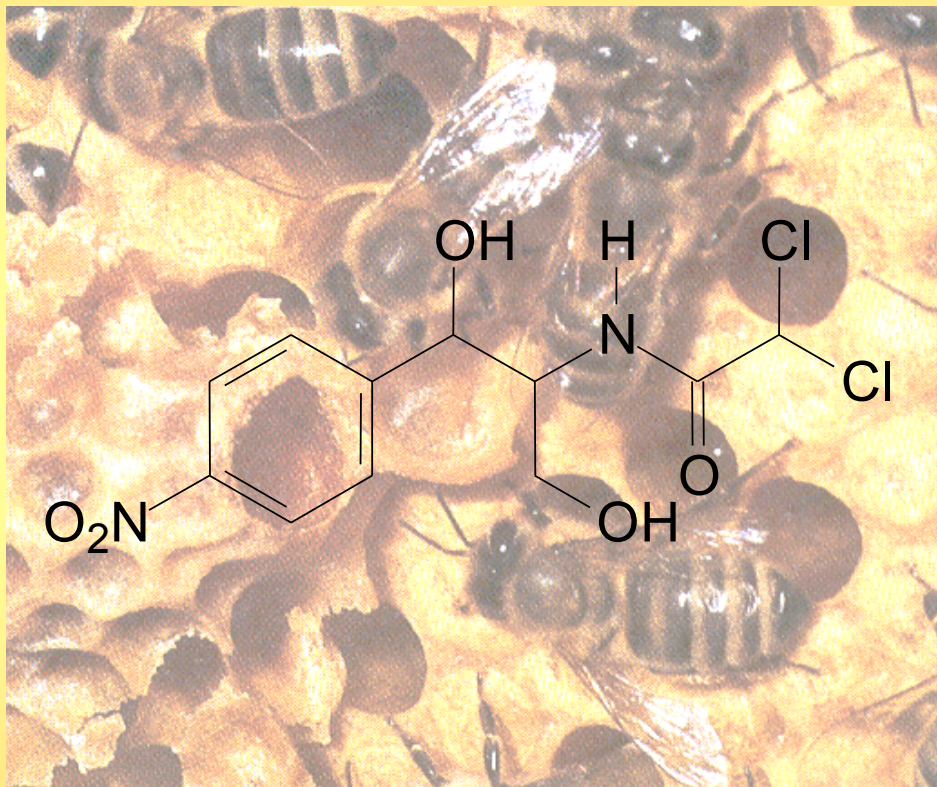


Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von Chloramphenicol in Bienenprodukten mittels LC-MS



Cuvillier Verlag Göttingen

Daniela Grotewahl

Aus dem Institut für Chemie und Technologie der Milch
Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel – Standort Kiel

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

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin
Daniela Grotewahl

aus Bad Harzburg

Kiel, 02.09.2005

Dekan: Prof. Dr. Siegfried Wolffram
1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Hans Meisel
2. Berichterstatter: Frau Prof. Dr. Elisabeth Wisker
Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2005

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2006

Zugl.: Kiel, Univ., Diss., 2006

ISBN 3-86537-882-X

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2006

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2006

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-882-X

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt im Besonderen Herrn Prof. Dr. Hans Meisel und Herrn Dr. Kurt-Peter Raezke für die interessante Themenstellung, die stete Diskussionsbereitschaft und die freundliche Betreuung.

Der Geschäftsleitung der APPLICA GmbH (namentlich: Frau Antje Raezke und Herrn Dr. Kurt-Peter Raezke) danke ich für die großzügige Bereitstellung aller zur erfolgreichen Durchführung dieser Arbeit benötigten Geräte und Chemikalien.

Weiterhin möchte ich mich beim gesamten Team der APPLICA GmbH für die nette Unterstützung bedanken.

Im Speziellen danke ich den Laborantinnen Sabine Runge, Annika Ludwig, Peggy Schüddekopf und Verena Kramer für ihre Hilfe bei der Durchführung der praktischen Arbeiten. Darüberhinaus bedanke ich mich bei meinen Kollegen Dr. Kirsten Peters, Melanie Koch, Barbara Blankenship, Dr. Torsten Peix, Dr. Lutz Elflein, Lothar Matter und Dr. Ralf Schubert für die ständige Diskussionsbereitschaft und die technische Unterstützung.

Frau Sabine Beckmann und Herrn Lars Küster danke ich für die Durchführung der Pollenanalysen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Partner Andreas-Sascha Wendt für seine ständige Unterstützung.

Ganz herzlich danke ich vor allem meinen Eltern und Großeltern dafür, dass Sie mir die Ausbildung und somit auch die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
AS	Autosampler
C18	Kohlenstoffkette mit 18 C-Atomen
CAP	Chloramphenicol
CID	Collision Induced Dissociation
d5	5-fach deuteriert
ECD	Electron Capture Detector – Elektroneneinfangdetektor
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EN	Europäische Norm
ESI	Electro Spray Ionisation
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
F	Peakfläche
FWHM	Full width of the peak at half its maximum height
GC	Gaschromatographie
H	Wasserstoffatom
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEC	International Electrotechnical Commission
ISO	International Organization for Standardization
LC	Liquid Chromatography – Flüssigchromatographie
M	Molekularmasse
MRPL	Minimum Required Performance Limit – Mindestleistungsgrenze
MS	Massenspektrometrie
MS-MS	Tandem-Massenspektrometrie
mTorr	Millitorr
m/z	Masse/Ladung
PDA	Photo Diode Array
Rf	Radio Frequency
RP	Reversed Phase – Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
s	seconds
SIM	Selected Ion Monitoring
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SPE	Solid Phase Extraction – Festphasenextraktion
SRM	Selected Reaction Monitoring
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
VO	Verordnung

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Honig	2
1.1.1. Geschichtliches.....	2
1.1.2. Definition von Honig.....	3
1.1.3. Blüten-und Honigtauhonig.....	3
1.1.4. Sortenhonige.....	3
1.1.5. Rohstoffsammeln durch die Bienen.....	4
1.1.6. Honigbereitung.....	5
1.1.7. Zusammensetzung des Honigs.....	6
1.2. Gelée Royale	8
1.2.1. Definition von Gelée Royale.....	8
1.2.2. Gewinnung des Gelée Royales.....	9
1.2.3. Zusammensetzung des Gelée Royales.....	9
1.2.4. Verwendung des Gelée Royales.....	10
1.3. Pollen	10
1.3.1. Definition von Pollen.....	10
1.3.2. Gewinnung der Pollen.....	10
1.3.3. Inhaltsstoffe der Pollen.....	11
1.3.4. Verwendung der Pollen.....	11
1.4. Bienenwachs	11
1.4.1. Definition von Bienenwachs.....	11
1.4.2. Gewinnung von Bienenwachs.....	12
1.4.3. Inhaltsstoffe des Bienenwachses.....	12
1.4.4. Verwendung des Bienenwachses.....	12
1.5. Propolis	12
1.5.1. Definition von Propolis.....	12
1.5.2. Gewinnung des Propolis.....	13
1.5.3. Inhaltsstoffe des Propolis.....	13
1.5.4. Verwendung des Propolis.....	13
1.6. Chloramphenicol (CAP)	14
1.6.1. Struktur und Wirkung.....	14
1.6.2. Toxikologie.....	14
1.6.3. Anwendung in der Imkerei.....	15
1.6.4. Rechtliche Grundlagen.....	15
1.6.5. Analytik.....	16
1.6.5.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	16
1.6.5.2. GC und GC-MS (Gaschromatographie und Kopplung von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie).....	16
1.6.5.3. LC, LC-MS und LC-MS/MS (Flüssigchromatographie, Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie bzw. mit Tandem- Massenspektrometrie).....	16

1.7.	LC-MS.....	17
1.7.1.	Massenspektrometer Techniken.....	17
1.7.1.1.	Ion-Trap.....	17
1.7.1.2.	Quadrupol-Massen-Analysator.....	18
1.7.2.	Ionisierungstechniken.....	19
1.7.2.1.	ESI (Electrospray-Ionisation).....	19
1.7.2.2.	APCI (Atmospheric pressure chemical ionisation).....	20
1.7.3.	LC-MS/MS.....	21
1.7.3.1.	Triple Quadrupole Massenspektrometer.....	22
1.7.3.2.	Ion-Trap Massenspektrometer.....	22
1.7.3.3.	Unterschied der Tandem-MS zur einfachen MS.....	23
1.8.	Problemstellung.....	23
1.8.1.	Hintergrund.....	23
1.8.2.	Stand der Forschung.....	25
1.8.2.1.	Begleitende Entwicklungen.....	26
1.8.3.	Ziele.....	26
2.	Material und Methoden.....	29
2.1.	Online-SPE-LC-MS(Online-Festphasenextraktion gekoppelt mit Flüssigchromatographie und Single Quadrupole Massenspektrometrie).....	29
2.1.1.	Online-SPE (Online-Festphasenextraktion).....	29
2.1.1.1.	Aufbau der Probenvorbereitungseinheit.....	29
2.1.1.2.	Aufbau der online-SPE-LC-MS.....	30
2.1.1.3.	Funktion der online-SPE.....	30
2.1.1.4.	SPE-Bedingungen.....	32
2.1.1.5.	Aufbau der Schaltung der APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit.....	32
2.1.1.6.	Steuerungsprogramm der APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit.....	32
2.1.2.	LC-Trennsystem.....	33
2.1.2.1.	Autosampler.....	33
2.1.2.2.	LC-System.....	33
2.1.2.3.	Gradient.....	33
2.1.3.	Detektion mittels Single Quadrupole Massenspektrometer.....	33
2.1.3.1.	Massenspektrometer-Einstellungen.....	33
2.1.3.2.	Massendetektion.....	34
2.1.4.	Analyse.....	34
2.1.4.1.	Herstellung der Standardlösungen.....	34
2.1.4.2.	Messung.....	35
2.1.4.3.	Auswertung.....	35
2.1.5.	Probenaufarbeitung.....	35
2.1.5.1.	Honig.....	35
2.1.5.2.	Frisches Gelée Royale.....	35
2.1.5.3.	Lyophilisiertes Gelée Royale.....	36
2.1.5.4.	Bienenwachs.....	36
2.1.5.5.	Pollen.....	36
2.1.5.6.	Honigwein, mit Honig gesüßter Saft, Ginseng-Gelée-Royale- Nahrungsergänzungs-Ampullen.....	36

2.2. LC-MS/MS (Flüssigchromatographie gekoppelt mit Triple Quadrupole Massenspektrometrie)	37
2.2.1. LC-Trennsystem.....	37
2.2.1.1. Autosampler.....	37
2.2.1.2. LC-System.....	37
2.2.1.3. Gradient.....	37
2.2.2. Triple Quadrupole Massenspektrometer-Detektion.....	37
2.2.2.1. Massenspektrometer-Einstellungen.....	37
2.2.2.2. Massendetektion.....	38
2.2.3. Analyse.....	38
2.2.3.1. Herstellung der Standardlösungen.....	38
2.2.3.2. Messung.....	39
2.2.3.3. Auswertung.....	39
2.2.4. Probenaufarbeitung.....	40
2.2.4.1. Honig.....	40
2.2.4.2. Frisches Gelée Royale.....	40
2.2.4.3. Lyophilisiertes Gelée Royale.....	41
2.2.4.4. Bienenwachs.....	42
2.2.4.5. Pollen.....	42
2.2.4.6. Propolis.....	43
2.2.4.7. Gelée Royale Ampullen.....	44
2.3. Online-SPE-LC-MS/MS (Online-Festphasenextraktion gekoppelt mit Flüssigchromatographie und Triple Quadrupole Massenspektrometrie)	45
2.3.1. Online-SPE (Online-Festphasenextraktion).....	45
2.3.1.1. SPE-Bedingungen.....	45
2.3.1.2. Aufbau der Schaltung der APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit.....	45
2.3.1.3. Steuerungsprogramm der APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit.....	45
2.3.2. LC-Trennsystem.....	45
2.3.2.1. Autosampler.....	45
2.3.2.2. LC-System.....	46
2.3.2.3. Gradient.....	46
2.3.3. Detektion mittels Triple Quadrupole Massenspektrometer.....	46
2.3.3.1. Massenspektrometer-Einstellungen.....	46
2.3.3.2. Massendetektion.....	46
2.3.4. Analyse.....	46
2.3.4.1. Herstellung der Standardlösungen.....	46
2.3.4.2. Messung.....	47
2.3.4.3. Auswertung.....	47
2.3.5. Probenaufarbeitung.....	47
2.3.5.1. Honig, frisches und lyophilisiertes Gelée Royale, Pollen.....	47
2.3.5.2. Bienenwachs.....	47
2.4. Pollenanalyse	48
2.4.1. Probenvorbereitung.....	48
2.4.2. Mikroskopie.....	48

2.5.	ELISA.....	49
2.5.1.	Prinzip der Methode.....	49
2.5.2.	Probenvorbereitung.....	50
2.5.3.	Test-Durchführung.....	50
2.5.4.	Plattenbelegung.....	51
2.5.5.	Messung.....	51
2.5.6.	Auswertung.....	51
2.6.	Migration von CAP.....	51
2.6.1.	Prinzip.....	51
2.6.2.	Durchführung.....	52
2.7.	Geräte und Software.....	52
2.8.	Chemikalien und Hilfsmittel.....	53
2.9.	Reagenzien.....	54
3.	Ergebnisse und Diskussion.....	55
3.1.	Bestimmung von CAP mittels online SPE-LC-MS (Single Quadrupole).....	55
3.1.1.	Aufarbeitung.....	55
3.1.1.1.	Einwaage.....	56
3.1.1.2.	Extraktionsmittel.....	57
3.1.1.3.	Carrez-Fällung.....	62
3.1.1.4.	Entfettung mit Hexan.....	63
3.1.2.	online-SPE-LC-MS.....	63
3.1.2.1.	Prinzip der Festphasenextraktion (SPE).....	63
3.1.2.2.	Vorteile der verwendeten online-Technik im Vergleich mit der manuellen Festphasenextraktion.....	65
3.1.2.3.	Auswahl des Festphasenmaterials.....	67
3.1.2.4.	Auswahl der Wasch- und Elutionslösung.....	68
3.1.3.	Chromatographie.....	68
3.1.3.1.	Säule.....	68
3.1.3.2.	Eluenten.....	69
3.1.3.3.	Ansäuerung/Alkalisierung des Fließmittels.....	69
3.1.4.	Massenspektrometrie.....	70
3.1.4.1.	Electrospray Ionisation (ESI) oder Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI).....	70
3.1.4.2.	Polarität.....	70
3.1.4.3.	Ionisierung.....	70
3.1.4.4.	Auswertung.....	71
3.2.	Bestimmung von CAP mittels LC-MS/MS (Triple Quadrupole).....	72
3.2.1.	Aufarbeitung.....	72
3.2.1.1.	Extraktionsmittel für die Gelée Royale-Aufarbeitung.....	73
3.2.1.2.	pH-Wert-Einstellung für die Gelée Royale Aufarbeitung.....	75
3.2.1.3.	Entwicklung einer Aufarbeitung zur Analyse von Propolis.....	83
3.2.2.	Chromatographie.....	87
3.2.2.1.	Säule.....	87

3.2.2.2.	Eluenten.....	87
3.2.3.	Auswertung.....	89
3.2.3.1.	Interner Standard.....	89
3.2.3.2.	Massenspektrum.....	89
3.2.4.	Fragmentierung des Chloramphenicols.....	92
3.2.5.	Kopplung mit der online-SPE.....	96
3.3.	Bestimmung von CAP mittels online-SPE-LC-MS/MS... 96	
3.3.1.	Aufarbeitung.....	96
3.3.1.1.	Einwaage.....	96
3.3.1.2.	Wahl des Extraktionsmittels.....	97
3.3.1.3.	Carrez-Fällung.....	100
3.3.1.4.	Entfettung mit Hexan.....	100
3.3.2.	online-SPE.....	101
3.3.2.1.	Auswahl des Festphasenmaterials.....	101
3.3.2.2.	Auswahl der Wasch- und Elutionslösung.....	101
3.3.3.	Chromatographie.....	101
3.3.4.	Massenspektrometrie.....	102
3.3.5.	Quantifizierung.....	102
3.4.	Abhängigkeit der Chloramphenicol-Analyse von Art und Beschaffenheit des Bienenproduktes.....	105
3.4.1.	Honig.....	105
3.4.2.	Gelée Royale.....	109
3.4.3.	Blütenpollen.....	110
3.4.4.	Propolis.....	110
3.5.	Validierungen.....	110
3.5.1.	online-SPE-LC-MS (vergl. Methode 2.1).....	111
3.5.1.1.	Linearität.....	111
3.5.1.2.	Präzision.....	114
3.5.1.3.	Wiederfindung.....	116
3.5.1.4.	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	116
3.5.1.5.	Messungenauigkeit.....	118
3.5.2.	LC-MS/MS (vergl. Methode 2.2).....	118
3.5.2.1.	Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – Honig.....	119
3.5.2.2.	Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – Honig.....	123
3.5.2.3.	Nachweis- und Bestimmungsgrenze – Honig.....	125
3.5.2.4.	Messungenauigkeit – Honig.....	125
3.5.2.5.	Laborinterne Reproduzierbarkeit – Honig.....	125
3.5.2.5.1.	Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – Honig.....	126
3.5.2.5.2.	Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – Honig.....	128
3.5.2.5.3.	Nachweis- und Bestimmungsgrenze – Honig.....	129
3.5.2.5.4.	Entscheidungsgrenze (CC α) und Nachweisvermögen (CC β) – Honig.....	129
3.5.2.5.5.	Messungenauigkeit – Honig.....	130
3.5.2.6.	Ringversuch – Honig.....	130
3.5.2.7.	Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – Gelée Royale.....	133
3.5.2.8.	Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – Gelée Royale.....	137
3.5.2.9.	Nachweis- und Bestimmungsgrenze – Gelée Royale.....	139
3.5.2.10.	Messungenauigkeit – Gelée Royale.....	139
3.5.2.11.	Laborinterne Reproduzierbarkeit – Gelée Royale.....	139
3.5.2.11.1.	Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – Gelée Royale.....	140

3.5.2.11.2.	Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – Gelée Royale.....	142
3.5.2.11.3.	Nachweis- und Bestimmungsgrenze – Gelée Royale.....	143
3.5.2.11.4.	Entscheidungsgrenze (CC α) und Nachweisvermögen (CC β) – Gelée Royale.....	143
3.5.2.11.5.	Messungengenauigkeit – Gelée Royale.....	143
3.5.2.12.	Wiederfindung und Präzision von Pollen, lyophilisiertem Gelée Royale und Wachs.....	144
3.5.2.12.1.	Pollen.....	144
3.5.2.12.2.	Gelée Royale (lyophilisiert).....	145
3.5.2.12.3.	Wachs.....	145
3.5.3.	online-SPE-LC-MS/MS (vergl. Methode 2.3).....	146
3.5.3.1.	Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – Honig.....	146
3.5.3.2.	Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – Honig.....	148
3.5.3.3.	Nachweis- und Bestimmungsgrenze – Honig.....	148
3.5.3.4.	Messungengenauigkeit – Honig.....	149
3.5.3.5.	Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – Gelée Royale.....	150
3.5.3.6.	Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – Gelée Royale.....	152
3.5.3.7.	Nachweis- und Bestimmungsgrenze – Gelée Royale.....	153
3.5.3.8.	Messungengenauigkeit – Gelée Royale.....	154
3.5.4.	Vergleich der Methoden anhand der Validierungsdaten.....	154
3.6.	ELISA.....	155
3.7.	Herkunftsbestimmung mittels Pollenanalysen.....	160
3.7.1.	Ergebnisse der Pollenanalysen.....	160
3.7.2.	Diskussion der Ergebnisse.....	162
3.8.	Migration des Chloramphenicols.....	162
3.8.1.	Hintergrund.....	162
3.8.2.	Ergebnisse.....	162
3.9.	Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse.....	163
3.9.1.	Honig.....	163
3.9.2.	Frisches Gelée Royale.....	163
3.9.3.	Lyophilisiertes Gelée Royale.....	168
3.9.4.	Pollen.....	169
3.9.5.	Wachs.....	170
3.9.6.	Propolis.....	171
3.9.7.	Zeitliche Entwicklung der CAP-Kontamination von Bienenprodukten.....	172
4.	Zusammenfassung.....	175
5.	Ausblick.....	181
6.	Literaturverzeichnis.....	183

1. Einleitung

Honig wird durch den Menschen schon sehr lange als Süßungs- und Genussmittel genutzt. Damals wie heute erwartet der Mensch ein hochwertiges und reines Naturprodukt. Diesem Aspekt trägt auch der Gesetzgeber Rechnung und hat den Qualitätsanforderungen für Honig einen gesetzlichen Rahmen gegeben.

Neben qualitätsbestimmenden Parametern wie Enzym- oder Zuckergehalt (geregelt in der Honigverordnung) werden auch besonders strenge Anforderungen an Arzneimittelrückstände in Honig gestellt – deutlich strenger als beispielsweise für andere tierische Lebensmittel wie Fleisch oder Eier (EU-TierarzneimittelrückständeVO), obwohl diese zumeist in erheblich größeren Mengen verzehrt werden. Hintergrund hierfür ist die bereits beschriebene Verbrauchererwartung, mit Honig ein besonders reines und naturbelassenes Lebensmittel zu verzehren, weitgehend frei von Rückständen der modernen Tiermedizin.

Jedoch sind Bienen ebenso wie andere Nutztiere Krankheitserregern und Schädlingen ausgesetzt, und der Imker verwendet sowohl therapeutisch als auch prophylaktisch diverse synthetisch-chemische Arzneimittel – jedoch nicht immer nur die in der EU gesetzlich zugelassenen. Hinzu kommt, dass der größte Teil des in der EU gehandelten Honigs aus sog. Drittländern wie z. B. Argentinien oder Brasilien stammt, in denen bezüglich der Behandlung von Bienen mit Tierarzneimitteln zum Teil andere, weniger strenge Regelungen gelten. Um dennoch eine hohe Qualität des auf dem Markt befindlichen Honigs zu gewährleisten, ist somit die routinemäßige Untersuchung von Honig auf Rückstände gängiger Arzneimittel durch unabhängige Labore sowie staatliche Stellen unerlässlich.

An dieser Stelle knüpft die vorliegende Dissertation an. Sie beschäftigt sich mit modernen Analysemethoden zur Bestimmung des Breitbandantibiotikums Chloramphenicol (CAP). Dieses Antibiotikum ist nicht nur hochwirksam, sondern verfügt auch über einige unerwünschte Nebenwirkungen. Aus diesem Grund ist der Einsatz von Chloramphenicol als Arzneimittel für lebensmittelliefernde Tiere in der EU verboten. Zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten zu dieser Dissertation im Jahre 2002 war der Einsatz von Chloramphenicol in der Imkerei üblich, insbesondere in China, dem Hauptexportland für Honig in die EU zum damaligen Zeitpunkt. Honig wurde damals jedoch nicht routinemäßig auf CAP untersucht, da das Problem von Chloramphenicol-Rückständen in Honig nicht bekannt war. Daher waren, als der sog. „Chloramphenicol-Skandal“ bekannt wurde, auch keine hinreichend empfindlichen Analysemethoden für die komplexe Matrix Honig verfügbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden zur Analyse mittels LC-MS entwickelt, die die vom Gesetzgeber verlangten niedrigen Bestimmungsgrenzen für CAP erreichen und gleichzeitig die Anforderungen an eine Analysemethode in der Routineanalytik erfüllen: eine Analyse muss schnell und kostengünstig durchzuführen sein und trotzdem maximale Sicherheit im Hinblick auf Identifizierung und Quantifizierung des Analyten bieten.

1.1. Honig

1.1.1. Geschichtliches

Das früheste Zeugnis für die Nutzung von Honig durch den Menschen sind Felszeichnungen in Ostspanien, die auf 10.000 v. Chr. datiert werden und Honigjäger erkennen lassen (siehe Abb. 1-1).

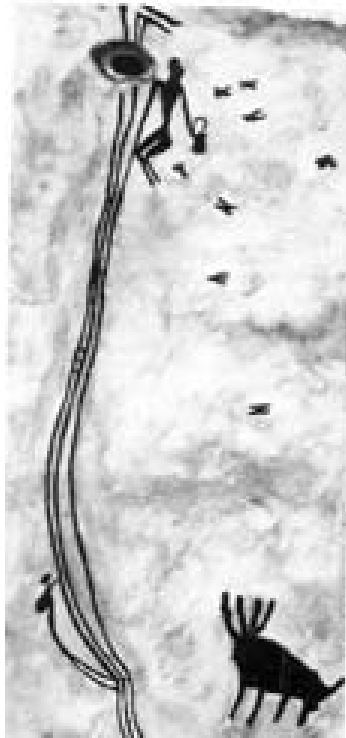


Abb. 1-1. Honigjäger – Felszeichnung
(Höhlen von Las Aranas, Ostspanien) [2]

In früheren Zivilisationen wurde der Honig als Substanz mit magisch-religiösem Charakter oder gar als Medizin angesehen. Die bis heute ersten bekannten Schriften über Honig sind Rezepte für Salben und Heilmittel auf Tontafeln, die im Irak entdeckt wurden und auf etwa 2100 v. Chr. zurückgehen.

Zeugnisse über die Nutzung von Bienenhonig als Nahrungs- und Genussmittel findet man im Alten Ägypten, in den Ländern des asiatischen Raumes, in der ältesten aller geheiligten Schriften Indiens, im Koran und in der Bibel. Erste naturwissenschaftliche Beobachtungen über Bienen und Honig wurden vom berühmten griechischen Philosophen Aristoteles beschrieben („Natürliche Geschichte“, 344 bis 342 v. Chr.). Die Verwendung von Honig als Nahrungs-, Heil- und Stärkungsmittel war demnach schon in früheren Zeiten nichts Außergewöhnliches und hat sich bis heute erhalten. Im Mittelalter war Honig um ein vielfaches billiger als der importierte Rohrzucker. Erst mit Einführung des Zuckerrübenanbaus in Europa vor ca. 150 Jahren stand einheimischer Rübenzucker als ein billiges Süßungsmittel zur Verfügung. Daher wurde Honig als Süßungs- und Nahrungsmittel durch den Zucker verdrängt. Durch den heutigen Trend der gesunden und natürlichen Ernährung bevorzugt der Verbraucher in letzter Zeit wieder mehr das Naturprodukt Honig. Zunehmende Bedeutung gewinnen Bienenprodukte auch als Naturheilmittel. Die Apitherapie

untersucht die Möglichkeit des Einsatzes von Bienenprodukten wie Gelée Royale, Propolis, Pollen und Bienengift zur Therapie von bestimmten Krankheiten [2] [5].

1.1.2. Definition von Honig

Der Gesetzgeber definiert Honig gemäß deutscher Honigverordnung vom 16. Januar 2004 als den natursüßen Stoff, „der von Honigbienen erzeugt wird, indem die Bienen Nektar von Pflanzen oder Sekrete lebender Pflanzenteile oder sich auf den lebenden Pflanzenteilen befindende Exkrete von an Pflanzen saugenden Insekten aufnehmen, durch Kombination mit eigenen spezifischen Stoffen umwandeln, einlagern, dehydratisieren und in den Waben des Bienenstocks speichern und reifen lassen“ [1].

1.1.3. Blüten- und Honigtauhonig

Aufgrund der Definition wird unterschieden zwischen Blütenhonig bzw. Nektarhonig und Honigtauhonig. Blütenhonig (Nektarhonig) stammt aus dem Nektar von Pflanzen, Honigtauhonig hauptsächlich aus auf lebenden Pflanzenteilen befindlichen Exkreten von an Pflanzen saugenden Insekten (Hemiptera), oder aus Absonderungen lebender Pflanzenteile [1].

Nektar ist das zuckerhaltige Ausscheidungsprodukt pflanzlicher Drüsen, den sogenannten Nektarien. Als Honigrohstofflieferanten sind die innerhalb der Blütenregion liegenden (floralen) Nektarien maßgebend. Nektar besteht zum größten Teil aus Wasser und enthält hauptsächlich Zucker, wobei Saccharose, Fructose und Glucose die wichtigsten Zuckerarten darstellen. Weiterhin enthält der Nektar Stickstoffverbindungen (Aminosäuren, Amide), Mineralstoffe, organische Säuren, Vitamine (z. B. Vitamin C) sowie Farb- und Aromastoffe [2].

Honigtau ist das zuckerhaltige Ausscheidungsprodukt pflanzensaugender Insekten. Die wichtigsten Wirtspflanzen von Honigtauerzeugern sind unter den Nadelhölzern die Rottanne, die Weißtanne, verschiedene Kiefernarten (wie Pinie) und die Lärche, unter den Laubbäumen die Eiche, die Linde und der Ahorn. Den Hauptbestandteil des Honigtaus bilden verschiedene Zucker, des Weiteren findet man Sterine, Vitamine, Aminosäuren, organische Säuren und Enzyme. Honigtau kann neben den Hauptzuckern Saccharose, Glucose und Fructose auch Melezitose und Erlöse in beträchtlicher Menge sowie größere Mengen an Maltose, Raffinose und höhere Oligosaccharide enthalten. Häufig findet sich im Honigtau noch Trehalose, der „Blutzucker“ der Insekten. Im Gegensatz zum Nektar ist Honigtau mineralstoffreich [2][5].

1.1.4. Sortenhonige

Als Trachthonige gelten Honige, die im Sinne des § 3 Abs. 3 Nr. 1 der Honigverordnung vom 16. Januar 2004 überwiegend von bestimmten Blüten oder Pflanzen stammen. Die Gewinnung von Trachthonig ist ein natürlicher Vorgang, der auf Blütenstetigkeit der Bienen zurückgeführt werden kann. Es gibt Trachthonige sowohl von Blütentracht als auch von Honigtautracht.

In Tabelle 1-1 sind einige Beispiele für Trachthonige getrennt nach Blüten- und Honigtautrachten aufgeführt.

Blütentrachten	Honigtautrachten
Akazienhonig	Weißtannenhonig (Abies-Arten)
Edelkastanienhonig	Rottannenhonig (Piscea-Arten – Fichten)
Heidehonig	Pinienhonig
Kleehonig	
Lindenhonig	
Rapshonig	
Orangenhonig	
Sonnenblumenhonig	

Tab. 1-1. Beispiele für Trachthonige [2]

Die Unterscheidung und Identifizierung von Sortenhonigen erfolgt durch die Pollenanalyse. Jedoch sind zwischen den einzelnen Sorten auch starke Unterschiede in den sensorischen (Geruch, Geschmack, Farbe, Konsistenz) und physikalisch-chemischen Eigenschaften (Leitfähigkeit, pH-Wert, Fructose/Glucose-Verhältnis) vorhanden [2].

1.1.5. Rohstoffsammeln durch die Biene

Ein Bienenvolk besteht aus mehreren Zehntausend Arbeitsbienen, mehreren Hundert bis Tausend Drohnen und einer Königin. Weibliche Bienen entwickeln sich aus einem befruchteten Ei, während die Drohnen aus unbefruchteten Eiern entstehen.

Von den drei in einem Bienenstock lebenden Bienenarten (Königin, Arbeiterinnen und Drohnen) spielen nur die Arbeiterinnen eine Rolle in der Honigbereitung. Feste und flüssige Nahrungsstoffe werden von ihnen mit den Mundteilen aufgenommen. Der wichtigste Teil der Mundwerkzeuge (Mandibeln) der Biene ist der Saugrüssel. Er besteht aus einem von den Außenlappen der Mittelkiefer und den Unterlippentastern gebildeten Saugrohr, in welchem sich die Zunge vor und rückwärts bewegt und somit als Kolben fungiert (siehe Abb.1-2). Der Saugrüssel ist daher nicht immer geschlossen, sondern beruht auf dem lückenlosen Zusammenschluss der beteiligten Mundteile und der Arbeit der Schlundmuskulatur. So wird ein luftdichter Abschluss des Saugrohres erreicht, welcher der Biene erlaubt, flüssige Nahrung durch Mundhöhle, Schlund und Speiseröhre in die Honigblase zu pumpen. Mittels des Saugrüssels kann aber auch, zum Zwecke der Futterabgabe an andere Bienen, der Honigblaseninhalte wieder zurück in Schlund und Mundhöhle gepumpt (oder gesaugt) werden. Die Abgabe des Honigblaseninhaltes an andere Bienen erfolgt jedoch nicht durch den Saugrüssel selbst; dieser wird nach hinten eingeklappt und es entsteht ein klaffender Spalt, welcher zur Futterrinne, einer an der Zungenwurzel liegenden unbehaarten seichten Rinne, führt.

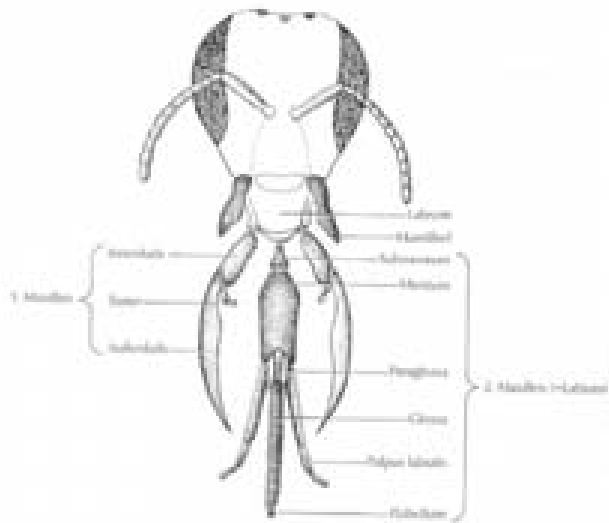


Abb. 1-2. Mundwerkzeuge der Honigbiene.

Der Saugrüssel wird von den Außenladeln der Mittelkiefer (= 1. Maxillen) und den Tastern der Unterlippe (= 2. Maxillen) gebildet. [5]

Die Honigblase ist anatomisch eine Erweiterung der Speiseröhre und stellt ein Sammelorgan dar. Gegen den Mitteldarm ist die Honigblase durch den Ventiltrichter abgeschlossen, der anatomisch zum vorderen Darm gehört. Der Ventiltrichter reguliert den Futterdurchgang aus der Honigblase in den Mitteldarm, um eine gewisse Menge des Sammelgutes dem bieneneigenen Kreislauf zugänglich zu machen; des Weiteren ist er für das Zurückhalten des flüssigen Sammelgutes in der Honigblase während des Transportes in den Stock zuständig. Der Ventiltrichter kann außerdem kleine feste Bestandteile (z. B. Pollenkörner, Sporen) aus dem Honigblaseninhalte abfiltrieren und zur Verdauung in den Honigmagen weitergeben. Dadurch wird dem Nektar ein Teil der Pollen entzogen und der in die Wabenzellen gelangende Saft wird von Sporen und Pilzen gereinigt. [5][7]

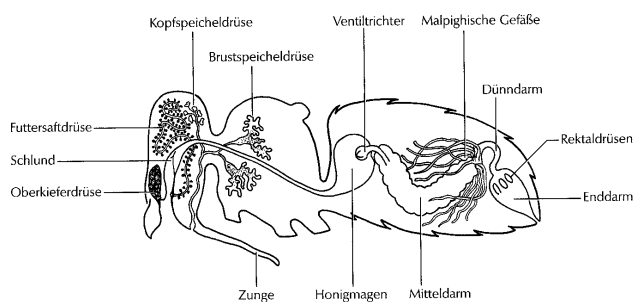


Abb. 1-3. Verdauungsapparat der Biene [5]

1.1.6. Honigbereitung

Aufgenommen werden die zuckerhaltigen Rohstoffe über den Rüssel. Über den Schlund werden sie dann weiter in die Honigblase transportiert. Schon während des Vorgangs der Aufnahme werden dem Nektar oder Honigtau fermentreiche Sekrete zugesetzt. Die Futtersaftdrüsen sondern ein Sekret ab, das die kohlenhydrat-

spaltenden Enzyme Diastase, Invertase (Saccharase) und Glucoseoxidase enthält. Im Stock wird der Inhalt des Honigmagens hervorgewürgt und an Stockbienen abgegeben, die dieses Sammelgut an andere Stockbienen weitergeben, wobei eine „Futterkette“ entsteht. Der eingetragene zuckerhaltige Rohstoff ist zu wasserreich, um über eine längere Zeit haltbar zu sein und muss daher eingedickt werden. Während des Honigreifungsprozesses kommt es deshalb im Stock zu einem Eindickungsvorgang, der in zwei Phasen zerfällt:

In der ersten Phase pumpen die Bienen den Inhalt ihrer Honigblase heraus, setzen ihn an der Unterseite ihres Rüssels als kleine Tropfen der etwa 30 bis 35 °C warmen Stockluft aus, wodurch ein Teil des Wassers verdunstet, und saugen ihn anschließend wieder ein. Diesen Vorgang wiederholen sie in schneller Folge über einen Zeitraum von etwa 15 bis 20 Minuten. Zusätzlich werden dem Rohstoff dabei noch Enzyme beigemischt, die u.a. für die Invertierung der im Nektar enthaltenen Saccharose sorgen. Da bei der Invertierung dem Zuckergemisch auf chemischem Weg Wasser entzogen wird, bedeutet dies eine zusätzliche Eindickung.

In der zweiten Phase wird der halbreife Honig in kleinen Tröpfchen oder als dünner Film an den Zellwänden oder am Zellboden abgelagert. Insbesondere während der Nacht wird trockene kühle Außenluft in das Stockinnere gebracht und erwärmt. Die relative Luftfeuchte sinkt ab, und im trockenen, warmen Luftstrom verdunstet das überschüssige Wasser aus dem halbreifen Honig, bis ein Wassergehalt von 20 % und weniger erreicht ist.

Ist der Honig reif, werden die Zellen mit Honig aufgefüllt und mit einem Wachsdeckel verschlossen. Der Verschluss verhindert weitestgehend eine nachträgliche Wasseraufnahme und -abgabe des Honigs und eine Kontamination mit Mikroorganismen. Verdeckelter Honig gilt beim Imker als reif und daher als schleuderbar [2][5].

1.1.7. Zusammensetzung des Honigs

Kohlenhydrate

Vorherrschende Zucker im Honig sind die Monosaccharide Fructose mit Gehalten zwischen 32,5 und 45,2 % und Glucose mit 24,3 bis 39,9 %. Daneben wurden mehr als 20 verschiedene Oligosaccharid-Verbindungen identifiziert. Aufgrund der zugegebenen Speichel-Saccharase (Invertase) bleibt im allgemeinen nur ein geringer Rest der Saccharose des Rohstoffs enthalten. Der Saccharosegehalt kann in Abhängigkeit vom Reifegrad des Honigs stark schwanken (0,05-6,2 %). Das Spektrum der Zuckerarten ist z.T. charakteristisch für manche Honigsorten. Jedoch kann man aufgrund des Zuckerspektrums nicht mit Sicherheit auf die Honigsorte schließen. Melezitose und Raffinose kommen nur in Honigtauhonigen vor [2][3][4][5].

Wasser

Der Wassergehalt des Honigs liegt durchschnittlich bei 16-19 %. Honige mit höheren Gehalten sind sehr anfällig gegenüber einer Vergärung durch osmophile Hefen. Außerdem sind erhöhte Wassergehalte oftmals ein Beweis für einen unreif geernteten Honig [2][3].

Enzyme

Die wichtigsten Enzyme im Honig sind α -Glucosidasen (Invertase, Saccharase), α - und β -Amylasen (Diastase), Glucoseoxidase, Katalase und saure Phosphatase [3].

Diastase

Die Diastase gehört zur Gruppe der Hydrolasen. Diastasen können Stärke direkt oder über Dextrine zu Maltose und Glucose abbauen.

Sie befinden sich im Kopfdrüsensekret der Biene (Bienenspeichel) und dienen im Bienenstock dem Abbau der Pollenstärke.

Die Diastase ist wärmeempfindlich und somit ein guter Indikator für die Abschätzung der thermischen Belastung, die ein Honig erfahren hat [2][3].

Saccharase

Saccharase bzw. Invertase spaltet Saccharose in Glucose und Fructose.

Die Saccharase ist empfindlicher gegen Wärme als die Diastase und kann schon von kleineren Temperaturerhöhungen beeinflusst werden, daher ist sie für die Beurteilung einer Wärmeschädigung kein geeigneter Indikator.

Praktisch die gesamte Invertaseaktivität eines Honigs stammt aus dem Speichel der Biene [2][3].

Glucoseoxidase

Die Glucoseoxidase geht ebenfalls auf die Biene zurück. Die enzymatische Oxidation von Glucose führt zu Gluconsäure, der Hauptsäure des Honigs, und Wasserstoffperoxid [2][3].

Proteine

Die Proteine des Honigs stammen zum Teil aus dem pflanzlichen Material, zum Teil von der Biene. Ihr Gehalt ist je nach Sorte stark schwankend (0,2 – 2 %) [2][3].

Aminosäuren

Honig enthält freie Aminosäuren in Mengen von 100 mg/100 g Trockenmasse. Prolin überwiegt stark und macht 50 – 85 % der Aminosäurefraktion aus [3].

Der Prolingehalt ist ein wichtiges Kriterium zur Untersuchung der Qualität des Honigs und gibt Aufschluss über dessen Reife [2]. Reife eines Honigs bedeutet nicht nur, dass er trocken genug ist, sondern er muss auch von den Bienen genügend bearbeitet, also bespeichelt worden sein. Ein charakteristischer Bestandteil des Bienenspeichels ist Prolin, daher lässt sich diese Aminosäure im Honig in um so höheren Konzentrationen nachweisen, je intensiver der Rohstoff (Nektar, Honigtau) durch die Biene bearbeitet wurde [6].

Mineralstoffe

Die Mineralstoffe im Honig stammen hauptsächlich aus den von der Biene gesammelten Rohstoffen. Honigtauhonige haben mit 40 bis 100 mg/100 g einen höheren Mineralstoffgehalt als Blütenhonig mit ca. 10 mg/100 g [2]. Das liegt daran, dass in den meisten Nektarien der Großteil der Mineralsalze rückresorbiert wird, während die Pflanzensauger den relativ hohen Mineralstoffgehalt des Phloemsafes im Honigtau fast unverändert ausscheiden. Aus dem daraus resultierenden hohen Mineralstoffgehalt des Honigtauhonigs lässt sich auch seine höhere elektrische Leitfähigkeit ableiten [5].

Säuren

Honig hat einen sauren pH-Wert. Obwohl Honigtauhonige mehr Säure enthalten als Blütenhonige, haben sie einen höheren pH-Wert (pH 4,0 - 5,4) als Blütenhonige (pH 3,6 - 4,5). Dies ist dadurch bedingt, dass Honigtauhonig mehr kolloidale und auch andere Eiweißsubstanzen, Mineralstoffe und Salze enthält, die den Säuregehalt des Honigs abpuffern und so einen höheren pH-Wert bewirken.

Die Hauptsäuren im Honig sind die organischen Säuren Gluconsäure, Essigsäure, Buttersäure, Milchsäure, Citronensäure, Ameisensäure, Maleinsäure und Oxalsäure [2][5].

1.2. Gelée Royale

1.2.1. Definition von Gelée Royale

Gelée Royale hat im Bienenvolk eine wichtige Funktion bei der Ernährung und Differenzierung der Königin, die sich trotz gleicher Gene anatomisch und physiologisch von der Arbeitsbiene unterscheidet. Sog. Ammenbienen produzieren aus den Rohstoffen Pollen und Honig in ihren Futtersaft- und Mandibeldrüsen Gelée Royale. Die Futtersaftdrüsen befinden sich bei den Arbeitsbienen in der Kopfkapsel, während sie dem Drohn und der Königin gänzlich fehlen.

Die Entwicklung der drei Bienenwesen findet in unterschiedlichen Zellen statt. In den typischen sechseckigen Zellen entwickeln sich Arbeiterinnen und Drohnen. Die Königinnenzelle, auch Weichselzelle genannt, entsteht aus einem nach unten geöffneten Näpfchen, in welches von der Königin das Ei gelegt wird. Die Larve der Königin erhält ausschließlich das hochkonzentrierte Gelée Royale, während die Larven der Arbeiterinnen und Drohnen diese Nahrung in verdünnter Form nur die ersten dreieinhalb Tage erhalten und danach nur noch Honig und Pollen bekommen. Die Königinnenzelle wird am 8. Tag mit einem Wachsdeckelchen verschlossen. Zuvor erhält die Larve einen großen Futternvorrat an Gelée Royale, den sie bis zum Schlupf aufbraucht. Durch die intensive Fütterung der Larve mit Gelée Royale im Zusammenhang mit der intensiven Betreuung durch die Ammenbienen entsteht aus dieser Larve eine Königin. Daher wird Gelée Royale auch als Königinnenfuttersaft bezeichnet. Gelée Royale enthält wesentlich mehr Mandibeldrüsensekret als der Arbeiterinnen- und der Drohnenfuttersaft. Die durch Gelée Royale bewirkte Differenzierung der Larve zur Königin führt zur Ausbildung der paarigen Ovarien und Ovidukte und der Spermatheka. Des Weiteren werden spezielle Duftdrüsen zur Produktion von Pheromonen gebildet, die das königintypische Duftbouquet bewirken, das zur Durchsetzung der königlichen Autorität und Kommunikation im Bienenvolk

unersetzlich ist. Zusätzlich bewirkt Gelée Royale wichtige Verhaltensänderungen (z.T. auf genetischer Ebene), so dass z. B die Königin zum Begattungsflug ausfliegt und sich der Eiablage widmet. Die Königin hat mit 3 - 4 Jahren eine viel höhere Lebenserwartung als die Arbeiterinnen, die im Sommer nur drei Wochen und im Winter sechs Monate leben [7][8].

1.2.2. Gewinnung des Gelée Royales

Bei der Gewinnung von Gelée Royale wird durch spezielle Bienenzucht der Trieb der Bienen, bei Verlust der Königin eine neue nachzuziehen, ausgenutzt. Wird besonders starken Bienenvölkern die Königin entnommen, so sind die Bienen bestrebt, mindestens eine neue Königin aus der vorhandenen Brut nachzuziehen. Zur Sicherheit und zur Selektion legen die Bienen Dutzende neuer Königinnenzellen an. Hierzu bringt der Imker Rähmchen mit vorgefertigten Königinnennäpfchen, die mit einer wenige Millimeter großen Larve bestückt sind, in das Bienenvolk ein. Diese Larven werden von den Ammenbienen mit Gelée Royale versorgt. Vor der Verdeckelung der Königinnenzellen entfernt der Imker die Larven und saugt den Vorrat an Gelée Royale ab. Eine Zelle liefert ca. 0,3 g Gelée Royale, der Gesamtertrag eines Volkes kann innerhalb eines Jahres mehrere hundert Gramm betragen. Im Handel wird neben frischem auch lyophilisiertes (gefriergetrocknetes) Gelée Royale angeboten. Das Lyophilisat ist einfacher zu lagern und zu transportieren. Während das frische Gelée Royale bei 0 - 5 °C oder tiefgefroren gelagert werden muss, kann man das Lyophilisat bei Raumtemperatur in gut schließenden dunklen Gefäßen aufbewahren.

Die Gewinnung von Gelée Royale ist sehr arbeitsaufwändig und lohnt sich in gemäßigten Klimaregionen wie Deutschland aufgrund der kurzen Vegetationsperiode nicht. In wärmeren Gebieten ist die Vegetationsperiode der Bienenvölker und Trachtpflanzen länger und intensiver, so dass erheblich größere Mengen an Gelée Royale produziert werden können. Mit ca. 1,5 t pro Jahr hat China einen Anteil von 90 % an der Weltproduktion [7][9].

1.2.3. Zusammensetzung des Gelée Royales

Die wichtigsten Inhaltsstoffe des frischen Gelée Royales im Überblick [8] [4]:

Inhaltsstoff	Menge in %
Wasser	60-70
Zucker	11-23 (hauptsächlich Fructose und Glucose)
Proteine und Aminosäuren	9-18
Fette	4-8
10-Hydroxy-2-decensäure	1-6
weitere Bestandteile:	
Vitamine (Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, Niacin, Pantothensäure, Biotin, Folsäure)	
Sterine	
Bioterin und Neopterin	
Mineralstoffe und Spurenelemente	

Tab. 1-2. Inhaltsstoffe des frischen Gelée Royales

1.2.4. Verwendung des Gelée Royales

Gelée Royale wird als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben. Es wird frisch oder gefriergetrocknet (lyophilisiert) zur direkten Einnahme oder als Kapsel bzw. Ampulle mit Zusätzen anderer Stoffe (z. B. Ginseng) angeboten. Die Verwendung als Nahrungsergänzung geht nicht auf einen hohen Gehalt an ernährungsphysiologisch wertvollen Substanzen wie Vitamine oder Mineralstoffe zurück, sondern beruht auf dem allgemeinen stimulierenden und therapeutischen Wert, der ihm aufgrund seiner Wirkung auf die Bienen nachgesagt wird. Fundierte wissenschaftliche Beweise für positive Effekte auf den Menschen existieren jedoch noch nicht.

Zusätze von Gelée Royale werden auch für Kosmetika, speziell für Hautcremes, verwendet. [22]

1.3. Pollen

1.3.1. Definition von Pollen

In der Blüte der Samenpflanzen sind die geschlechtlichen Keimzellen in besonderen Organen eingeschlossen, die männlichen in den Pollenkörnern, die weiblichen (Eizellen) in den Samenanlagen. Die Pollen bestehen aus einer festen Hülle (Exine), einer nach innen sich anschließenden weichen Hülle (Intine) und dem von den Hüllen umschlossenen Zellplasma [10]. Soll eine Befruchtung stattfinden, so müssen die Pollenkörner zu den Samenanlagen gelangen. Die Befruchtung geschieht durch die Vereinigung eines Kernes des Pollenschlauches mit dem Kern der Eizelle. Die Bestäubung, d.h. die Übertragung des Pollens auf die Narbe bzw. die Samenanlage ist einer der wichtigsten Abschnitte in der Fortpflanzung der Samenpflanzen. Für die Bestäubung spielen neben anderen Insekten auch die Bienen eine große Rolle. Um eine ausreichende Bestäubung zu erreichen, bieten die Pflanzen Lockspeisen wie Nektar und Pollen. Das Insekt wiederum ist an diesen Produkten der Blüte als Futterquelle interessiert, die Pollenübertragung geschieht dabei zufällig (vergl. 1.3.2) [11].

Unter dem Begriff Pollen versteht man darüber hinaus den durch die Bienen gehöselten und den als Futterreserve in den Waben gespeicherten Pollen (vergl. 1.3.2) [15][16].

1.3.2. Gewinnung der Pollen

Sammelorgane für die Pollen sind neben dem Oberkiefer die starke Behaarung des Bienenkörpers (fast alle Körperstellen sind mit einem feinen Haarflaum bedeckt) und die Beine der Biene, an denen sich spezielle Werkzeuge wie Pollenkamm, Bürstchen und Körbchen befinden. Wenn die Biene eine Blüte besucht, um Pollen zu höseln, bearbeitet sie die Staubbeutel mit ihren Mundwerkzeugen und der Zunge, wobei unreife Staubbeutel aufgebissen werden und die Pollen durch heftige Bewegungen der Vorderbeine und des Kopfes ausgeschüttelt werden. Die lockeren Pollen werden fortwährend mit dem Rüssel angefeuchtet, wozu entweder Honig oder der Nektar aus den beflogenen Blüten verwendet wird. Die Pollen, die zunächst in das Haarkleid der Bienen gelangt sind, werden während des Fluges mittels der Pollenbürste (ein mit steifen Haaren besetztes verbreitertes Fersenglied des Bienenbeins) ausgekämmt und zum außen am Bein im Körbchen (Corbicula) liegenden Pollenhöschen geformt [12]. Die Bienen verändern die von verschiedenen Pflanzen

gesammelten Pollen, indem sie sie mit Nektar, Honigtau oder dem Inhalt des Honigmagens befeuchten und mit körpereigenen Enzymen anreichern. Die Pollenhöschen werden von Sammelbienen zu Nahrungszwecken in das Volk eingetragen, von den Beinen abgestreift und in Wabenzellen eingelagert. Beim Einlagern setzen die Bienen Sekrete zu, die die Pollen konservieren und enzymatisch vorverdauen (Bienenbrot). Durch die ideale Bruttemperatur setzt in den festgestampften Pollen eine Milchsäuregärung ein. In dieser Form sind die Pollen jahrelang haltbar.

Die Ernte der Pollen durch den Imker erfolgt durch Pollenfallen vor den Fluglöchern. Es werden Käbme oder Lochplatten verwendet, die vor dem Flugloch des Bienenstockes angebracht werden. Der Abstand der Zähne bzw. der Abstand der Löcher ist so gewählt, dass die Biene, wenn sie in den Stock zurückkehren will, durchschlüpfen kann, aber dabei einen Teil der Pollenhöschen verliert [16]. Die so gesammelten Pollenhöschen werden anschließend gereinigt und getrocknet [13].

1.3.3. Inhaltsstoffe der Pollen

Die wichtigsten Inhaltsstoffe der Pollen im Überblick [10]:

Inhaltsstoff	Menge in % (Mittelwert)
Zucker	30
Proteine	20
freie Aminosäuren	10
Wasser	unter 10
Fette	5
weitere Bestandteile: Enzyme: Invertase, Diastase, Glucoseoxidase, etc. Vitamine Mineralstoffe und Spurenelemente (Kalium, Eisen, Chrom, etc.) Aromastoffe Farbstoffe weitere sekundäre Pflanzenstoffe (Flavonoide, etc.)	

Tab. 1-3. Inhaltsstoffe der Pollen

1.3.4. Verwendung der Pollen

Pollen werden als Nahrungsergänzungsmittel verwendet. Ihr Wert für die menschliche Ernährung wurde wissenschaftlich bisher nicht bewiesen. Aufgrund einer weitverbreiteten Allergie vieler Menschen auf Pollen aller Art ist die Verwendung von Pollen in Nahrungsmitteln sehr eingeschränkt [22].

1.4. Bienenwachs

1.4.1. Definition von Bienenwachs

Wachs ist das Baumaterial der Bienen. Bienen im Alter von ca. 13 bis 20 Tagen haben ihre Wachsdrüsen optimal entwickelt und können Wachs produzieren, sie werden daher als Baubienen bezeichnet. Die Wachsdrüsen sind Hautdrüsen auf der Bauchseite des Hinterleibes. Das produzierte Wachs wird in flüssiger Form von den Drüsen ausgeschieden und verändert sich beim Abkühlen zu schneeweißen

Wachsplättchen. Das aus den Bauchschuppen heraustretende Wachsplättchen wird zunächst mit den Beinen zu den Mundwerkzeugen (Mandibeln) geführt, dort geknetet und dabei mit Speichel angefeuchtet. Bei diesem Vorgang bekommt das zunächst weiße Wachs je nach Tracht seine Färbung [14]. Rohstoffe für die Wachsproduktion sind Kohlenhydrate (Honig bzw. Fructose) [17].

1.4.2. Gewinnung von Bienenwachs

Bienenwachs kann durch verschiedene Methoden gewonnen werden. Zum einen durch Extraktion des Wachses aus den Waben mit Hilfe von Lösungsmitteln, zum anderen durch Schmelzen. Zum Schmelzen werden kochendes Wasser, Wasserdampf-, Elektro- oder Sonnenenergie verwendet.

Nach der Extraktion ist das Wachs nicht rein und muss deshalb durch heißes Wasser und Filtration gereinigt werden [18].

1.4.3. Inhaltsstoffe des Bienenwachses

Die wichtigsten Inhaltsstoffe des Wachses der Bienenart *Apis mellifera* sind [19]:

Inhaltsstoff	Menge in % (Mittelwert)
Ester	67
Kohlenwasserstoffe	14
Freie Säuren	12
Alkohole	1

Tab. 1-4. Inhaltsstoffe des Bienenwachses

1.4.4. Verwendung des Bienenwachses

Bienenwachs wird in der Regel in der Imkerei recycelt (z.B. bei der Verwendung als Mittelwände), darüber hinaus wird es in vielen technologischen Anwendungen vielseitig eingesetzt. Neben der Verwendung in Kosmetika (z.B. Lippenstiften, Mascara oder Cremes) und in Polituren wird es auch in der Lebensmittelindustrie als Überzugsmittel genutzt. In einigen Bereichen ist Bienenwachs durch günstigere Ersatzstoffe verdrängt worden, so z.B. durch Paraffin in der Kerzenherstellung [22].

1.5. Propolis

1.5.1. Definition von Propolis

Propolis kann auch als Kittharz der Bienen bezeichnet werden. Spalträume im Bienenstock werden damit von den Bienen zum Schutz vor Zugluft und Eindringlingen abgedichtet. Das Einflugloch wird zum einen mit Propolis verkleinert, um das Eindringen anderer Tiere zu verhindern, zum anderen wirkt Propolis aufgrund seiner antibakteriellen Wirkung wie eine „Fußmatte“. In den Stock eingedrungene und dort abgestorbene Lebewesen werden aus hygienischen Gründen mit Propolis mumifiziert.

Die Bienen sammeln das für Propolis als Rohstoff dienende Harz hauptsächlich von Knospen, aber auch von Blättern, Zweigen oder von der Rinde der Bäume. Das Harz wird von den Bienen mit der Zunge gesammelt und direkt in das Körbchen des

dritten Beinpaares gepackt. Beim Sammeln wird von den Mandibeldrüsen Sekret hinzugegeben, so dass das Harz geschmeidiger wird. Die Propolishöschen werden von den Sammelbienen in das Volk eingetragen und anschließend von den Baubienen Stück für Stück abgebissen und vermauert.

Die Farbe des Propolis liegt, je nach Herkunft, zwischen den Farbstufen Grün über Braun bis zum tiefsten Rot. Propolisharze werden von vielen verschiedenen Bäumen und Sträuchern gesammelt. Jede Region und Kolonie scheint dabei ihre eigenen bevorzugten Harzquellen zu haben, was sich in der großen Vielfalt in Farbe, Geruch und Zusammensetzung widerspiegelt [18][20][21][22].

1.5.2. Gewinnung des Propolis

Für die Gewinnung von Propolis kann vom Imker das Bestreben der Bienen undichte Stellen der Bienenbehausung abzudichten, genutzt werden. Den Bienen werden zusätzliche Stellen zum Abdichten gegeben; dies kann z. B. durch ein Kunststoffgitter geschehen [20]. Licht und Belüftung sind wichtig, um die Verwendung von Propolis anzuregen [22].

1.5.3. Inhaltsstoffe des Propolis

Die Zusammensetzung des Propolis hängt stark von der botanischen Herkunft ab. Es setzt sich zusammen aus den gesammelten Pflanzenexsudaten, dem beigefügtem Wachs, zufällig enthaltenen Pollen, sowie den Sekreten der Biene. Bisher wurden schon mehr als 200 einzelne Substanzen in Propolis identifiziert.

Die wichtigsten Inhaltsstoffe des Propolis sind [20]:

Inhaltsstoff	Anteil in Rohpropolis [%]
Kohlenwasserstoffe, Wachse, hochmolekulare Ester, Ether und Ketone, höhere Fettsäuren, Steroide	5-40
Polyphenole: Chalkone, Dihydroxychalkone, Flavonone, Flavone, Flavonole	5-50
Aromatische Säuren, Ester aromatischer Säuren mit Alkoholen, Terpenoide, Alkohole, Aldehyde, Ketone	1-25
Aminosäuren, Zucker, Vitamine, Mineralstoffe	1-10

Tab. 1-5. Inhaltsstoffe des Propolis

1.5.4. Verwendung des Propolis

Propolis wird hauptsächlich in Kosmetika verwendet. Seine Wirkung auf die Hautregeneration und sein antibakterieller und fungizider Effekt sind gut erforscht. Des Weiteren wird es in der Medizin sowohl innerlich als auch äußerlich angewendet, so z. B. in den Bereichen Zahnpflege, Dermatologie, Krebsbehandlung und Inhalation. Ein großer Nachteil des Propolis ist jedoch sein nachweislich starkes allergenes Potential.

Zusätzlich findet Propolis Verwendung in Holzanstrichen [20][22].

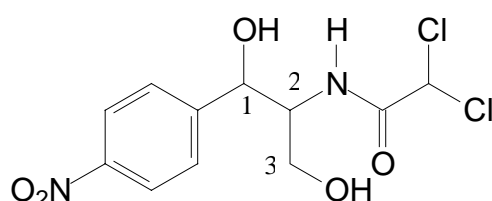
1.6. Chloramphenicol (CAP)

1.6.1. Struktur und Wirkung

Chloramphenicol (abgekürzt: CAP) ist ein Phenylethylamin-Derivat. Aufgrund zweier asymmetrischer C-Atome an den Positionen 1 und 2 sind vier Stereoisomere möglich. Nur das natürliche Isomer mit der D(-)-threo-Konfiguration ist antibakteriell aktiv.

Chloramphenicol ist ein Breitband-Antibiotikum und wirkt bakteriostatisch, d.h. es tötet die Bakterien nicht ab, sondern hindert sie lediglich an ihrer Vermehrung.

Es wurde 1947 zum ersten Mal aus *Streptomyces venezuelae* isoliert und wird seit 1950 synthetisch hergestellt [23].



CAS-Name	2,2-Dichloro-N-[(1R,2R)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrophenyl)ethyl]acetamide
Summenformel	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$
Molare Masse	323,13 g/mol

Abb. 1-4. Strukturformel Chloramphenicol (CAP)

Das Wirkungsspektrum umfasst die meisten Gram-positiven und -negativen Bakterien, Rickettsien, Chlamydien, Mykoplasmen, Leptospiren und Bacteroiden. Ein wechselnder Prozentsatz der Stämme von *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus* und *Shigella* ist resistent gegen Chloramphenicol. CAP wirkt nicht gegen Mykobakterien, Pilze, Protozoen, Viren und die meisten *Pseudomonas*-Stämme [24].

Resistenz entsteht am häufigsten durch R-Plasmid-induzierte Chloramphenicol-modifizierende Enzyme. Vorherrschend ist die Acetylierung der 1- oder 1,3-ständigen Hydroxylgruppen. Eine solche Modifikation der Propandiol-Seitenkette hebt die antibakterielle Aktivität des Moleküls auf, da die Integrität der Propandiol-Seitenkette für die stereospezifische Reaktion essentiell ist. CAP hemmt die Proteinsynthese nach Bindung an Rezeptoren auf den 50 S-Untereinheiten bakterieller Ribosomen, indem es eine bestimmte Peptidbindung beim Aufbau der Proteine blockiert [23]. Chloramphenicol dient als Reservemittel bei schweren Infektionen, wenn risikoärmere Antibiotika nicht verabreicht werden können [24].

1.6.2. Toxikologie

Chloramphenicol kann dosisunabhängig eine sehr seltene, aber tödliche Knochenmarksschädigung (aplastische Anämie) auslösen. Sie kann schon nach der ersten Dosis oder erst einige Wochen nach Absetzen des CAP auftreten. Der ursächliche Mechanismus ist unbekannt [23].

Auch dosisunabhängige reversible Knochenmarksschädigungen (Grey-Syndrom) mit Erbrechen, Hypothermie, Atemstörungen, grauer Hautverfärbung und Kreislaufversagen können bei der Gabe von Chloramphenicol auftreten [24]. Außerdem können neurotoxische Reaktionen, zentralnervöse Störungen, dyspeptische Beschwerden und Leberzellschädigungen auftreten.

Die Maximal-Tagesdosis für einen Erwachsenen beträgt: 3 (- 4) g/Tag, die Maximal-Gesamtdosis: 25 g [23].

1.6.3. Anwendung in der Imkerei

Bienen-Erkrankungen, gegen die Antibiotika eingesetzt werden, sind insbesondere die europäische und die amerikanische Faulbrut. Hierbei handelt es sich um bakterielle Infektionen [26]. Wegen des breiten Wirkungsspektrums und der damit verbundenen Treffsicherheit bei Infektionen kann Chloramphenicol sowohl therapeutisch als auch prophylaktisch als universelles Breitspektrum-Antibiotikum angewendet werden [24]. Die Behandlung der Bienen kann durch Fütterung mit antibiotikahaltigem Zuckerwasser erfolgen, oder es werden die Waben direkt, z.B. durch Besprühen, behandelt. Die Möglichkeit einer Kontamination des Honigs mit Antibiotika ist bei beiden Methoden sehr hoch.

Mit der medikamentösen Behandlung kann nie ein vollständiger Bekämpfungserfolg erreicht werden, da ausschließlich die Vermehrungsform (vegetative Form) der Bakterien abgetötet wird. Das Futter bzw. der Honig enthalten dann immer noch große Mengen von Sporen [25]. Die Behandlung muss daher in kurzen Zeitabständen wiederholt werden. In den Ländern der EU und in der Schweiz sind Antibiotika-Anwendungen bei Bienenvölkern verboten [26].

1.6.4. Rechtliche Grundlagen

Laut Artikel 5 der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (TierarzneimittelrückständeVO) wird ein Stoff in das Verzeichnis des Anhangs IV dieser VO aufgenommen, wenn für Rückstände dieses in Tierarzneimitteln verwendeten Stoffes keine Höchstmenge festgesetzt werden kann, weil Rückstände des betreffenden Stoffes in jeder Konzentration eine Gefahr für die Gesundheit des Verbrauchers darstellen. Die Verabreichung eines in Anhang IV aufgeführten Stoffes an Tiere, die zur Nahrungsmittelerzeugung genutzt werden, ist in der ganzen Gemeinschaft verboten.

1994 wurde Chloramphenicol in diesen Anhang IV der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 aufgenommen und ist somit für die Anwendung bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, grundsätzlich verboten [27]. Das Anwendungsverbot bedeutet im Grunde eine absolute analytische Nulltoleranz, d.h. dass Chloramphenicol nicht nachweisbar sein darf. Dies führt zwangsläufig zu Problemen speziell zwischen den amtlichen und privaten Laboratorien, bedingt durch unterschiedliche Leistungsgrenzen aufgrund verschiedener Geräteausstattungen und Analysemethoden.

Zur Harmonisierung der Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse hat die EU-Kommission in der Entscheidung 2002/657/EG eine sogenannte Mindestleistungsgrenze (Minimum Required Performance Limit, MRPL-Wert) festgelegt [28]. Dieser Wert ist der Mindestgehalt eines Analyten in einer Probe, der mindestens nachgewiesen und bestätigt werden muss. Er soll die analytische

Leistungsfähigkeit von Methoden für Stoffe, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, harmonisieren [29]. Die Entscheidung 2003/181/EG nennt explizit für die Matrices Fleisch, Eier, Milch, Urin, Erzeugnissen aus Aquakultur und Honig eine Mindestleistungsgrenze von 0,3 µg/kg für Chloramphenicol [30].

Schon in der Bezeichnung „Mindestleistungsgrenze“ ist ein Konflikt im Hinblick auf das Harmonisierungsziel angelegt. Die Formulierung „Mindest-“ legt nahe, dass es freigestellt ist, tiefere analytische Grenzen zu erreichen [28]. Daher wurde in Artikel 2 der Entscheidung der Kommission 2005/34/EG vom 11. Januar 2005 zur Festlegung einheitlicher Normen für die Untersuchung von aus Drittländern eingeführten Erzeugnissen tierischen Ursprungs auf bestimmte Rückstände festgesetzt, dass für die Kontrolle auf Rückstände bestimmter Stoffe, deren Verwendung in der Gemeinschaft verboten oder nicht zugelassen ist, unabhängig von der untersuchten Matrix als Referenzwert für Maßnahmen die Mindestleistungsgrenzen (MRPL) verwendet werden [31].

Da für Chloramphenicol ein MRPL-Wert von 0,3 µg/kg angegeben ist, kann dieser Wert als Reaktionswert angesehen werden, ab dem die zuständige Behörde Maßnahmen ergreift. Für Erzeugnisse, die Rückstände unterhalb des MRPL-Wertes enthalten, wird ein Einbringen in die Lebensmittelkette nicht verboten. Die zuständige Behörde führt jedoch für den Fall des wiederholten Auftretens Aufzeichnungen. Sollten sich daraus Schlüsse auf wiederkehrende Positiv-Befunde aus einem speziellen Ursprungsland ziehen lassen, so muss die zuständige Behörde die Kommission und die anderen Mitgliedsstaaten unterrichten.

1.6.5. Analytik

1.6.5.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Beim ELISA wird mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion auf der Grundlage kompetitiver Enzymimmunoassays im Mikrotitersystem auf Chloramphenicol untersucht. Die Messung erfolgt photometrisch. Der ELISA-Test ist sehr spezifisch, kann aber zu Falsch-Positiv-Ergebnissen führen. Es handelt sich hierbei um eine Screeningmethode, deren Ergebnis bei Positiv-Befunden durch eine weitere Methode bestätigt werden muss [32].

1.6.5.2. GC und GC-MS (Gaschromatographie und Kopplung von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie)

Da das CAP-Molekül zwei Chloratome enthält, die über eine hohe Elektronenaffinität verfügen, kann zur Detektion der ECD (Electron Capture Detector) genutzt werden. Die Detektion erfolgt häufig auch durch MS (Massenspektrometrie).

Die gaschromatographische Analyse von Chloramphenicol erfordert die Derivatisierung der polaren funktionellen Gruppen, um die Flüchtigkeit des Analyten zu erhöhen. Angewendet wird hier hauptsächlich die Silylierung [33][34].

1.6.5.3. LC, LC-MS und LC-MS/MS (Flüssigchromatographie, Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie bzw. mit Tandem-Massenspektrometrie)

Da Chloramphenicol über eine starke Absorption im UV-Bereich verfügt, kann es direkt und ohne vorherige Derivatisierung mittels UV- bzw. Photodiodenarray (PDA)-Detektor bei einer Wellenlänge im Bereich von 270 – 290 nm detektiert werden.

Jedoch reicht die Spezifität und Sensitivität der UV-Detektion nicht aus, um CAP mit der nötigen Spezifität in dem gesetzlich geforderten Konzentrationsbereich nachzuweisen.

Bei der LC-MS-Technik hingegen wird der gesuchte Analyt von der übrigen Matrix chromatographisch abgetrennt und selektiv mit einem Massenspektrometer detektiert. Durch die erreichte hohe Selektivität und Empfindlichkeit ist LC-MS grundsätzlich die Methode der Wahl [34].

Zur Spurenanalytik bei komplexen Matrices eignet sich darüber hinaus besonders die LC-MS/MS-Technik. Dabei wird das im ersten Schritt isolierte Molekölion durch Stöße energetisch angeregt und fragmentiert. Durch die so erhaltenen Tochterionen werden Matrixeinflüsse, die sich bei der einfachen MS-Technik relativ stark bemerkbar machen, durch die Isolierung und erneutes Stoßen einer Masse reduziert, so dass das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert wird. Gleichzeitig erhält man eine verbesserte Selektivität [40].

1.7. LC-MS

1.7.1. Massenspektrometer Techniken

Für die Detektion mittels MS, bzw. zur Trennung der erzeugten Ionen, existieren verschiedene Techniken: z.B. Sektorfeld, Time-of-Flight, Quadrupole, Ion-Trap. Da für die Analyse des Chloramphenicols hauptsächlich die Detektion mittels Ion-Trap- und Quadrupol-Geräte erfolgt, werden nur diese beiden Techniken näher erläutert.

1.7.1.1. Ion-Trap

In den Ionenfallen werden Ionen eingefangen, für variable Zeiten gehalten und dann zeitlich getrennt nach ihrer Masse analysiert. Sie bestehen aus einer ringförmigen Elektrode, die auf beiden Seiten von einer Endkappe überdeckt ist und an die ein Hochfrequenzfeld angelegt wird. Dadurch können die Ionen über einen breiten Massenbereich stabil im Inneren der Falle gehalten werden, wobei dies durch einen bestimmten Druck an Helium unterstützt wird. Durch Variation der Amplitude der angelegten Hochfrequenz verlieren Ionen eines bestimmten m/z (Masse/Ladungs)-Verhältnisses ihren Stabilitätszustand innerhalb der Falle, werden aus der Ionenfalle herausgeschleudert und dann detektiert [35]. Da unter den angewandten schonenden Ionisierungsbedingungen der Betrag der Ladungszahl z normalerweise ± 1 ist, entspricht das m/z -Verhältnis der Masse des Ions.

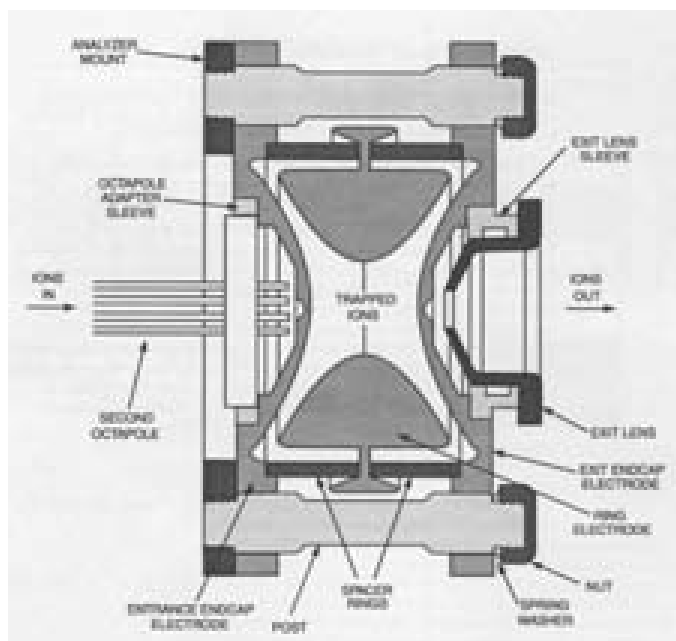


Abb. 1-5. Querschnitt durch eine Ion-Trap [39]

Englisch	Deutsch
Analyzer Mount	Analysatorhalterung
Octapole Adapter Sleeve	Octapol-Adapter Halterung
Ions In	Ioneneinlass
Second Octapole	Zweiter Octapol
Entrance Endcap Electrode	Eingangsendkappenelektrode
Post	Pfosten
Spacer Rings	Abstandsringe (Justierringe)
Spring Washer	Federunterlegscheibe
Nut	Mutter
Ring Electrode	Ringelektrode
Exit Endcap Electrode	Ausgangsendkappenelektrode
Exit Lens	Austrittslinse
Ions Out	Ionenauslass
Exit Lens Sleeve	Ausgangslinsehalterung
Trapped Ions	Eingefangene Ionen

Tab. 1-6. Erläuterungen zu der Beschriftung in Abb.1-5

1.7.1.2. Quadrupol-Massen-Analysator

Ein Quadrupol-Massen-Analysator besteht aus vier parallel angeordneten Metallstäben. Bei der Massentrennung zeigen jeweils gegenüberliegende Stäbe die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung, nebeneinanderliegende Stäbe die entgegengesetzte Polarität und eine um 180 Grad versetzte Phase. Beim Scannen werden Gleichspannung und Amplitude des Wechselfelds erhöht, ihr Verhältnis zueinander wird aber konstant gehalten. Unter diesen Bedingungen beschreiben die Ionen beim Durchqueren der Stabanordnung Oszillationen. Bei einem bestimmten Potential- und Frequenzzustand werden nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert auf einer stabilen Flugbahn durch das Stabsystem gehalten und erreichen den Detektor, Ionen mit anderen m/z -Werten werden aussortiert. [35]

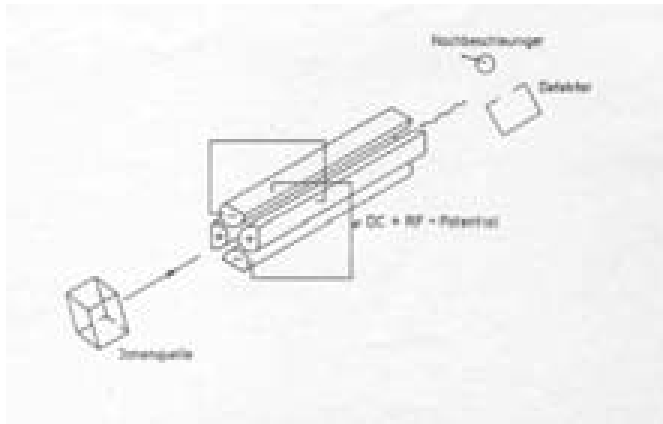


Abb. 1-6. Aufbau eines Quadrupoles [35]

1.7.2. Ionisierungstechniken

Unter Ionisierung versteht man die Bildung geladener Teilchen aus elektrisch neutralen. So entstehen bei der Massenspektrometrie durch verschiedene Techniken aus neutralen Molekülen positiv oder negativ geladene Molekülionen bzw. Fragmente daraus.

1.7.2.1. ESI (Electrospray-Ionisation)

Bei dieser Ionisierung wird die Substanzlösung, bestehend aus Analyten und Eluent aus der LC, durch eine Kapillare, an die eine hohe Spannung angelegt ist, geleitet. Je nach Polarität der angelegten Spannung werden die Moleküle positiv oder negativ ionisiert. Die ESI-Kapillare versprüht die Lösung, so dass ein feiner Nebel entsteht, der aus an der Oberfläche elektrisch geladenen Tröpfchen besteht. Unter Verdampfung des Lösungsmittels verstärkt sich die elektrische Ladung an der Oberfläche der Tropfen, bis der Punkt erreicht ist, an dem sich der Tropfen in kleinere Tröpfchen teilt, da die elektrostatische Abstoßung stärker wird als die Oberflächenspannung (Rayleigh stability limit). Dieser Prozess wiederholt sich einige Male, so dass sich sehr kleine Tröpfchen bilden. Aus diesen sehr kleinen Tröpfchen gehen die Analytionen aufgrund der elektrostatischen Abstoßung in die Gasphase über [36][37].

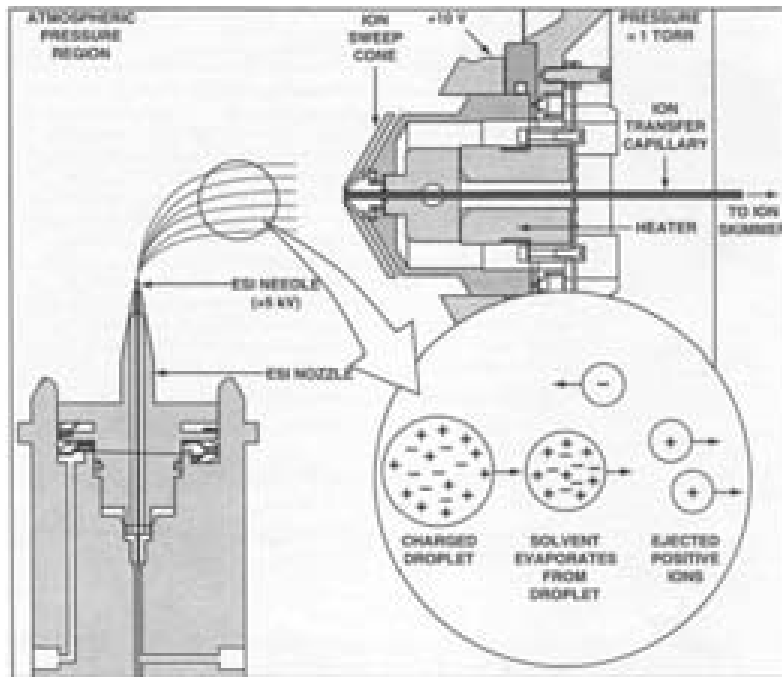


Abb.1-7. Funktion einer ESI-Quelle [37]

Englisch	Deutsch
Atmospheric Pressure Region	Region unter Atmosphärendruck
ESI Needle	ESI Nadel
ESI Nozzle	ESI Düse
Ion Sweep Cone	Ionenstrahl-Schild
Pressure	Druck
Ion Transfer Capillary	Ionentransferkapillare
Heater	Heizung
To Ion Skimmer	Zur Ionenskimmer-Region
Charged Droplet	Geladener Tropfen
Solvent Evaporates from Droplet	Lösungsmittel verdampft vom Tropfen
Ejected Positive Ions	Freie positive Ionen

Tab. 1-7. Erläuterungen zu der Beschriftung in Abb.1-7

1.7.2.2. APCI (Atmospheric pressure chemical ionisation)

Bei der APCI wird die Substanzlösung durch eine Kapillare zu einem feinen Nebel versprüht. Die entstandenen Tropfen werden dann in einer beheizten Röhre verdampft. Direkt am Ausgang dieser Röhre befindet sich eine Nadel, an die eine hohe Spannung angelegt ist. Diese hohe Spannung erzeugt eine Lichtbogen-Entladung, die sowohl zu Analytionen, als auch zu Begleitreaktionen mit den Lösungsmittelmolekülen führt. Weiterhin entstehen Lösungsmittelionen, die mit den Analytmolekülen zu Analytionen reagieren. Abhängig von der Polarität der angelegten Spannung entstehen so aus den Molekülen der Substanzlösung positiv oder negativ geladene Ionen [37].

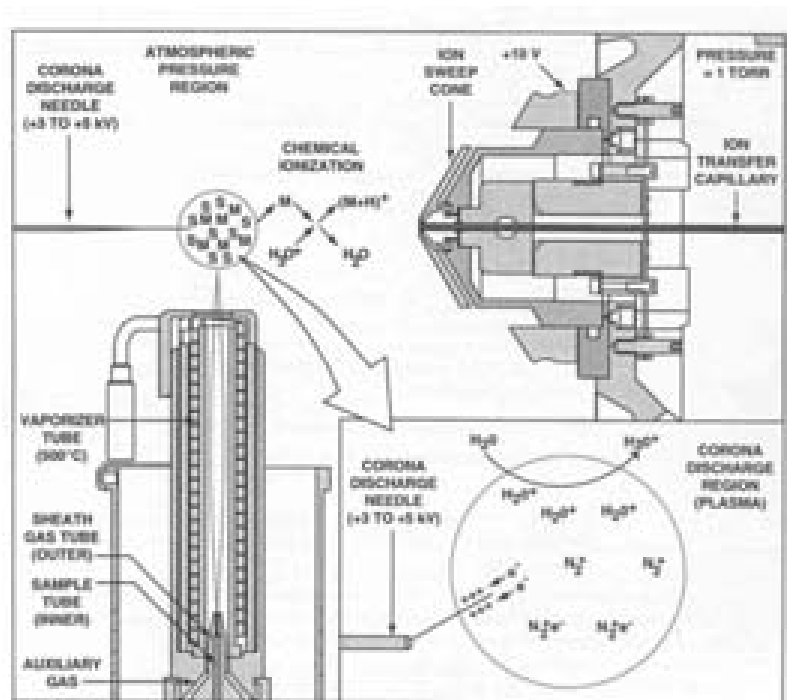


Abb. 1-8. Funktion einer APCI-Quelle [37]

Englisch	Deutsch
Atmospheric Pressure Region	Region unter Atmosphärendruck
Corona Discharge Needle	Koronaentladungsnadel
Chemical Ionisation	Chemische Ionisation
Ion Sweep Cone	Ionenstrahl-Schild
Pressure	Druck
Ion Transfer Capillary	Ionentransferkapillare
Vaporizer Tube	Verdampfungsrohr
Sheath Gas Tube (Outer)	Sprühgaskapillare (außen)
Sample Tube (Inner)	Probenkapillare (innen)
Auxillary Gas	Verwirbelungsgas
Corona Discharge Region (Plasma)	Koronaentladungsbereich (Plasma)

Tab. 1-8. Erläuterungen zu der Beschriftung in Abb.1-8

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Ionisierungstechniken getestet, jedoch erwies sich nur die Ionisierung mittels ESI für den zu untersuchenden Analyten als geeignet.

1.7.3. LC-MS/MS

Die schonende chemische Ionisierung mittels ESI oder APCI bei der LC-MS produziert Quasimolekülionen, die Informationen über die Molekülmasse liefern. Dagegen erhält man bei der Tandem-Massenspektrometrie durch die erneute Anregung und Fragmentierung der Quasimolekülionen darüberhinaus ein Fragmentmuster, das zur Identifizierung und Strukturaufklärung genutzt werden kann. Gleichzeitig erhöht die Tandem-Massenspektrometrie die Selektivität und Empfindlichkeit, indem sie weitere Informationen zu ausgewählten Ionen liefert und Interferenzen durch Ionen mit ähnlicher Retentionszeit und den allgemeinen Untergrund minimiert [34][38].

1.7.3.1. Triple Quadrupole Massenspektrometer

Die Ionen, die die Ionenquelle verlassen, werden im ersten Quadrupole getrennt. Die interessierenden Ionen werden isoliert und in eine Stoßkammer gelenkt. Durch den Zusammenstoß mit dem darin befindlichen Gas wird die kinetische Energie dieser Ionen teilweise in Vibrationsenergie umgewandelt, wodurch sie fragmentieren (collision induced dissociation – CID) und in einem weiteren Quadrupol aufgetrennt und analysiert werden [36][37].

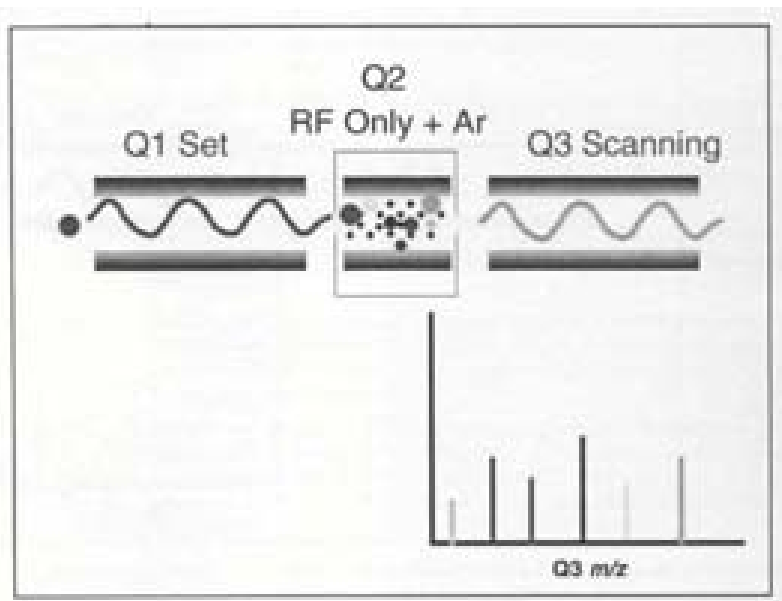


Abb. 1-9. Tandem-MS mittels Triple Quadrupole [37]

Q1 Set	Selektion der Vorläuferionen im ersten Quadrupol (Q1)
Q2 RF Only + Ar	Stoßinduzierter Zerfall; als Stoßkammer dient ein umschlossenes Quadrupol-Stabsystem (Q2), das zur Fokussierung des Ionenstrahls mit einer Wechselspannung (Rf, radio frequency) betrieben wird; als Stoßgas wird Argon (alternativ auch Helium, Stickstoff oder Xenon) eingesetzt
Q3 Scanning	Massenscan zur Aufnahme des Tochterionen-Spektrums im dritten Quadrupol (Q3)

Tab. 1-9. Erläuterungen zu Abb.1-9 [40]

1.7.3.2. Ion-Trap Massenspektrometer

Aus den in der Ionenquelle gebildeten Ionen wird in der ersten Stufe das Vorläuferion eines bestimmten m/z -Wertes selektiert. Dies geschieht, indem die Trap zunächst mit einem Massenscan unterhalb des Vorläuferions entleert wird. Massen oberhalb des Vorläuferions werden anschließend durch ein Frequenzsignal an den Endkappen beseitigt. Durch energiereiche Stöße der ausgewählten Ionen mit neutralen Gasmolekülen erfolgt anschließend die Fragmentierung (CID). Der stoßinduzierte Zerfall wird durch eine zusätzliche Wechselspannung an den Endkappen des Ion-Trap-Analysators ausgelöst. Wenn die Frequenz der angelegten Wechselspannung mit der Umlauf-Frequenz der ausgewählten Ionen gleich ist, nehmen diese durch Resonanz Energie auf. Die so angeregten Vorläuferionen

kollidieren mit den anwesenden Helium-Molekülen. Dabei wird die kinetische Energie der Vorläuferionen durch den Stoß in interne Energie umgewandelt, die zu einer substanzspezifischen Fragmentierung durch Auftrennung oder Neuorientierung von Bindungen und Abspaltung von Neutralteilchen führt. Es entsteht ein Gemisch von Tochterionen mit niedrigen m/z -Werten. Zur Massenanalyse der Tochterionen wird eine zweite massenspektrometrische Auftrennung erforderlich, daher werden die gebildeten Tochterionen bei niedrigen R_f (Regulated Frequency)-Werten der Ringelektrode gespeichert und nach Abschluss der CID-Phase durch einen Massenscan detektiert [40].

1.7.3.3. Unterschied der Tandem-MS zur einfachen MS

Das Signal-Rausch-Verhältnis nimmt mit der Anzahl der Aufreinigungsschritte bei der Probenaufarbeitung zu, da durch eine aufwändigere Aufarbeitung störende Matrixbestandteile besser entfernt werden. Jedoch verringert eine aufwändige Probenvorbereitung die potentielle Signalintensität durch Probenverluste.

Bei der Tandem-Massenspektrometrie wird im ersten Schritt das Ion des Analyten von einem Großteil der Probenmatrix abgetrennt, daher kann die erste Trennstufe als massenspezifischer „Clean-up“ gewertet werden. Nach einer sich anschließenden induzierten Fragmentierung des ausgewählten Ions erfolgt die Identifizierung des Analyten über das charakteristische Massenspektrum der Tochterionen und dessen Quantifizierung über substanzspezifische Signale.

Daher hat der Einsatz der LC-MS/MS gegenüber der LC-MS enorme Vorteile, wenn die Probenmatrix stark zum Rauschen beiträgt, eine Coelution mit Verunreinigungen auftritt und die Quantifizierung mit höchster Empfindlichkeit in schwierigen Matrices erforderlich ist [40].

1.8. Problemstellung

1.8.1. Hintergrund

Chloramphenicol (CAP) wird seit über 40 Jahren sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch zur Behandlung lebensmittelproduzierender Tiere wie Geflügel, Kälber, Schweine, Schafe und Fische eingesetzt. Aufgrund seiner toxischen Eigenschaften wurde CAP durch die Aufnahme in Anhang IV der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 1994 EU-weit für die Anwendung bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, verboten. Auch in vielen anderen Ländern wie z.B. in Kanada und in den USA ist CAP für diese Anwendung verboten. Fleisch, Eier oder Milch werden in diesen Ländern regelmäßig auf CAP-Rückstände überprüft [34].

Wiederholte CAP-Funde in Shrimps und Honig aus China führten am 30. Januar 2002 zu einem Importverbot für Erzeugnisse tierischen Ursprungs aus China in die Mitgliedsstaaten der EU (Entscheidung 2002/69/EG). Da Chloramphenicol in Honig ein bis dahin nicht bekanntes Problem darstellte, existierte zu diesem Zeitpunkt noch keine validierte Methode für die Analyse von Honig, mit der Chloramphenicol in dieser Matrix mit der rechtlich geforderten Selektivität und Sensitivität bestimmt werden konnte. Aufgrund des nach der Tierarzneimittelrückstandsverordnung 2377/90 geltenden Anwendungsverbots für Chloramphenicol bei lebensmittelliefernden Tieren, galt eine absolute analytische Nulltoleranz, d.h. dass bei der Untersuchung einer Probe kein CAP-Messsignal resultieren darf, das sich noch mit hinreichender Zuverlässigkeit auswerten lässt [28]. Dies stellte hohe

Anforderungen an die eingesetzte Analytik. Es mussten analytische Leistungsgrenzen am Rande des technisch Möglichen erreicht werden.

In der Entscheidung 2003/181/EG wurde für die Analysemethode von Chloramphenicol eine Mindestleistungsgrenze (MRPL) von 0,3 µg/kg für die Matrices Fleisch, Eier, Milch, Urin, Erzeugnisse der Aquakultur und Honig festgesetzt. Diese Mindestleistungsgrenze ist der Mindestgehalt eines Analyten in einer Probe, der mindestens nachgewiesen und bestätigt werden muss. Er soll die analytische Leistungsfähigkeit von Methoden für Stoffe, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, harmonisieren [29]. Dabei handelte es sich um einen Richtwert, nicht um einen gesetzlich festgelegten MRL-Wert (Maximum Residue Level - Grenzwert). Daher konnten amtliche Laboratorien auch Beanstandungen aussprechen, wenn sie in der Lage waren, Rückstände unterhalb dieses MRPL-Wertes eindeutig nachzuweisen. Dies macht deutlich, dass bei den zu entwickelnden Methoden für die Analyse von Chloramphenicol in Honig eine Bestimmungsgrenze von 0,3 µg/kg und gegebenenfalls niedriger erreicht werden musste.

Für die Bestimmung von Chloramphenicol sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben.

Mittels TLC (Dünnschichtchromatographie) wird Chloramphenicol unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen getrennt und durch seine natürliche gelb-grüne Farbe visuell detektiert, oder es werden die sich durch das Besprühen mit Fluorescamin bildenden fluoreszierenden Derivate bei 366 nm analysiert [41-42]. Eine weitere Möglichkeit ist die Detektion mittels Bioautographie unter Verwendung von *Bacillus subtilis* als Testorganismus [43]. Diese Methoden erfüllen in Bezug auf ihre Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit nicht die oben genannten Anforderungen, die an moderne Analysemethoden zur Bestimmung von Chloramphenicol in komplexen Matrices gestellt werden.

Eine weitere Methode zur Bestimmung von Chloramphenicol ist der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Hierbei handelt es sich jedoch nur um eine Screeningmethode, die sehr verlässliche Ergebnisse für Negativbefunde liefert. Positivbefunde müssen jedoch durch die Analyse mit einer zweiten Methode, zumeist GC-MS oder LC-MS, abgesichert werden [44][52][56].

Die Gaschromatographie ist für die Bestimmung von Chloramphenicol-Rückständen weit verbreitet. Das CAP-Molekül enthält zwei Chloratome, die über eine starke Elektronenaffinität verfügen. Daher ist eine Detektion mittels ECD (Elektroneneinfang-Detektor) möglich [45-52][87-88]. Um allerdings die Identität des Analyten abzusichern, wird häufig die Analyse mittels GC-MS durchgeführt [46][52-56][88]. Bei allen gaschromatographischen Bestimmungen von CAP muss, um den schwerflüchtigen Analyten in die Gasphase zu überführen, eine Derivatisierung, zumeist eine Silylierung, der polaren funktionellen Gruppen erfolgen [34]. Dieser Derivatisierungsschritt macht die Aufarbeitung aufwändiger. Wie bei jedem nasschemischen Verfahren kann auch er zu Probenverlusten führen. Im Vergleich zur Probenvorbereitung für die Analyse mittels LC ist dies ein zusätzlicher Aufarbeitungsschritt.

Bei der Analyse mittels Flüssigchromatographie kann Chloramphenicol, da es sich durch ein starkes Absorptionsvermögen für ultraviolette Strahlung auszeichnet, direkt und ohne weitere Derivatisierung mittels UV- oder PDA-Detektor bei 270 - 290 nm bestimmt werden [52][58-64][89].

Allerdings kann nur durch die LC-MS die Spezifität und Selektivität erreicht werden, um die durch die gesetzlichen Regelungen geforderten sehr niedrigen Nachweisgrenzen einzuhalten [34][56][65-82].

Die hier aufgeführten Methoden waren jedoch nicht für die Analyse von CAP in Honig, sondern in Fleisch, Fisch, Shrimps, Eiern und Milch entwickelt worden. Nur wenige erreichten die heutige gesetzlich geforderte Mindestleistungsgrenze von 0,3 µg/kg für Chloramphenicol. Auch die amtlichen Untersuchungsverfahren nach § 35 für die Bestimmung von Chloramphenicol-Rückständen mittels GC in Milch und in Muskelfleisch haben eine Bestimmungsgrenze von 0,5 bzw. 1,0 µg/kg und erreichen somit nicht den festgesetzten MRPL-Wert [86].

1.8.2. Stand der Forschung

Winkeler et al. [90] analysierten 2002 Chloramphenicol in Honig mittels Single Quadrupole-Massenspektrometrie. Der Honig wird über eine Säulenchromatographie aufgearbeitet. Dazu wird er 10 min bei 60 °C im Ultraschallbad gelöst. Danach wird die abgekühlte wässrige Lösung auf eine Chromabond XTR-Säule gegeben und eine Stunde inkubiert. Die Säule wird mit Hexan/Ethylacetat v/v 95/5 gewaschen, anschließend wird mit Hexan/Ethylacetat v/v 1/1 eluiert. Der Extrakt wird einkonzentriert, in Methanol/Wasser v/v 1/1 aufgenommen und mikrofiltriert. Nach Ionisierung mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) im negativen Ionen Modus erfolgt die Detektion über die aufgrund der Chlorisotopie auftretenden zwei Quasimolekülionenmassen des CAP mit m/z 321 ($\text{Cl}^{35/35}$, M-H)⁻ und m/z 323 ($\text{Cl}^{35/37}$, M-H)⁻. Die Bestimmungsgrenze für CAP beträgt 0,01 µg/kg Honig. Diese Methode arbeitet ohne internen Standard.

Eine andere Methode [91] beschreibt die simultane Bestimmung von Florfenicol, Thiamphenicol und Chloramphenicol in Honig mittels Ion Trap-LC-MS. Es handelt sich hierbei jedoch um eine qualitative Bestätigungsmethode. Auch diese Bestimmung arbeitet ohne internen Standard. Die Aufarbeitung erfolgt mittels flüssig-flüssig-Extraktion mit Ethylacetat, Aufnehmen des getrockneten Extraktes in Wasser, Ausschütteln mit Hexan und anschließender manueller Festphasenextraktion.

Vanhoenacker et al. [92] bestimmten Chloramphenicol in Honig und Shrimps mittels Quadrupole- und Ion Trap-LC-MS. Die Probenvorbereitung für Honig erfolgt über eine Säule zur Durchführung einer Flüssig-flüssig-Extraktion. 5 g Honig werden in 20 mL Wasser gelöst, mit internem Standard versetzt und auf eine Kartusche gegeben. Nach 5 min Einwirkzeit wird mit 50 mL Ethylacetat eluiert. Das Eluat wird getrocknet, in Wasser/Methanol (v/v 9/1) gelöst und direkt injiziert. Mit dieser Methode können 0,1 µg/kg CAP bei der Verwendung des Triple Quadrupole-MS als Detektor und 0,04 µg/kg bei Verwendung der Ion Trap detektiert werden.

Verzegnassi et al. [93] veröffentlichten 2003 eine Methode zur Bestimmung von Chloramphenicol in Honig mittels LC-MS/MS, mit einer Nachweisgrenze < 0,1 µg/kg. Der Honig wird in einer mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 5 eingestellten Natriumacetat-Lösung gelöst und für 15 min in einem Wasserbad auf 55 °C erwärmt. Danach erfolgt eine Festphasenextraktion. Das erhaltene Eluat wird einkonzentriert und der Rückstand in einer Pufferlösung (pH 6,5) aufgenommen. Mit einem Mix aus Acetonitril/Dichlormethan (v/v 4/1) wird anschließend eine doppelte Flüssig-flüssig-Extraktion durchgeführt. Nach einer erneuten Einkonzentrierung und Aufnahme des Extraktes in Wasser wird diese Lösung direkt mittels LC-MS/MS analysiert.

1.8.2.1. Begleitende Entwicklungen

Zeitgleich zu der vorliegenden Arbeit analysierten 2004 Ortelli et al. [83] 75 in der Schweiz kommerziell erworbene Honige. Zur Probenvorbereitung versetzen sie 10 g Honig mit 40 mL Wasser und 40 mL Ethylacetat. Nach 15-minütigem Mischen und anschließender Zentrifugation wird die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Der zur Trockene einkonzentrierte Extrakt wird in 1 mL Methanol gelöst und mit 20 mL 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8) verdünnt. Die weitere Aufreinigung erfolgt mittels SPE über C18-Kartuschen, die mit 5 mL Methanol und 10 mL 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8) konditioniert werden. Nach dem Waschen mit 5 mL Methanol/0,1 M Phosphatpuffer (pH 8; v:v, 10:90) und 2 ml Hexan und dem Trocknen der Kartusche wird der Analyt mit 2 mL Methanol eluiert. Die Lösung wird auf 100 µL einkonzentriert und mikrofiltriert. Diese Lösung wurde mittels LC-MS/MS unter Verwendung eines Triple Quadrupole Massenspektrometers analysiert. Als interner Standard wird CAP-d5 verwendet.

Forti et al. [84] entwickelten 2005 eine weitere Methode zur Bestimmung von Chloramphenicol in Honig. Dafür wird der Honig in Wasser gelöst und das CAP mit einer Mischung aus Dichlormethan und Aceton extrahiert. Die organische Phase wird einkonzentriert; die weitere Aufreinigung erfolgt über eine C18-Phase. Der erhaltene Extrakt wird unter Verwendung von CAP-d5 als internen Standard mittels LC-MS/MS analysiert. Diese Methode erreicht eine Entscheidungsgrenze ($CC\alpha$) von 0,07 µg/kg und ein Nachweisvermögen ($CC\beta$) von 0,10 µg/kg.

1.8.3. Ziele

Die unter 1.8.2 aufgeführten Methoden arbeiten entweder nicht mit internem Standard, sind nur zur qualitativen Bestätigung einsetzbar oder benötigen eine Personal-, Zeit- oder Material-intensive Aufarbeitung. Sie sind somit für ein großes Probenaufkommen in einem Routinelabor wenig geeignet.

Die Verwendung eines internen Standards bietet den Vorteil, dass er Verluste des Analyten während der Probenaufarbeitung kompensieren kann. Wird er am Anfang der Probenaufarbeitung hinzugegeben, erfährt er bei chemischer Ähnlichkeit zum Analyten annähernd dieselben Verluste. Die LC-MS bietet den Vorteil, dass isotope markierte nicht radioaktive Analoge der Analysesubstanz eingesetzt werden können (SIVA - Stabilisotopenverdünnungsanalyse). Deuterierte Standards kommen dem Anspruch an ein vergleichbares Verhalten in Aufarbeitung und Analyse am nächsten [40]. Somit kann bei der LC-MS der interne Standard auch zur Abschätzung der Retentionszeit des Analyten genutzt werden.

Einer der Hauptfaktoren zur Beurteilung der Eignung einer Analysenmethode, speziell für die Routineanalytik, ist die Durchführung der Probenaufarbeitung. In der Routineanalytik muss eine Analyse schnell und kostengünstig sein und trotzdem maximale Sicherheit im Hinblick auf Identifizierung und Quantifizierung des Analyten bieten.

Die Isolierung eines Analyten aus einer komplexen biologischen Matrix wie Honig kann sehr zeitaufwändig und personalintensiv sein. Eine Aufreinigungstechnik sollte jedoch möglichst einfach, effizient und gleichzeitig material- und lösungsmittel-sparend sein. Es ist wichtig, die Anzahl der in der Probenvorbereitung notwendigen Arbeitsschritte zu minimieren, da jeder zusätzliche Arbeitsschritt einen weiteren Beitrag zur Erhöhung der Messunsicherheit liefert. Im Idealfall erhält man Extrakte, die den Analyten mit einer hohen Wiederfindung enthalten und frei von

Störungskomponenten sind. Deshalb ist die Probenvorbereitung von entscheidender Bedeutung für die Qualität und Wirtschaftlichkeit einer analytischen Bestimmung.

Mit der LC-MS steht eine leistungsfähige Analysetechnik zur Verfügung, die aufgrund ihrer Sensitivität und Selektivität die Möglichkeit bietet, sie mit einer einfachen Probenaufarbeitung zu koppeln.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine in der Routine-Analytik anwendbare LC-MS-Methode für die Bestimmung von CAP in Honig und in anderen Bienenprodukten zu entwickeln. Wenn Chloramphenicol-Rückstände in Honig auftreten, ist es naheliegend, dass sich Rückstände dieses Antibiotikums auch in anderen Bienenprodukten wie Gelée Royale, Pollen, Wachs und Propolis nachweisen lassen. Diese Bienenprodukte sind z.T. sehr komplexe Matrices, die sich untereinander und vom Honig chemisch stark unterscheiden. Untersuchungen und Daten zur Kontamination von Bienenprodukten lagen bisher nicht vor.

Besonderes Augenmerk sollte bei der Methodenentwicklung auf eine stark vereinfachte und effiziente Probenaufarbeitung gerichtet werden. Darüber hinaus sollte eine Harmonisierung der Probenvorbereitung erfolgen, d.h. dass die Aufarbeitungsschritte für die verschiedenen Bienenprodukte zu einem großem Teil identisch ablaufen, um alle Produkte im Routine-Betrieb parallel mit minimaler Fehleranfälligkeit bearbeiten zu können.

Jede LC-MS Analyse besteht aus vier Teilschritten:

1. Lösen der Probe in einem geeigneten Lösungsmittel:
Die Art und die Menge des verwendeten Lösungsmittels sind dabei so zu wählen, dass sich der in einer Probe enthaltene Analyt praktisch vollständig löst, während Matrixbestandteile möglichst nicht in Lösung gehen.
2. Extraktion des Analyten:
Die Extraktion muss möglichst vollständig sein. Matrixbestandteile sollten weitestgehend abgetrennt werden, so dass zur weiteren Analyse eine Lösung erhalten wird, die im Idealfall nur noch den Analyten selbst enthält. Dies geschieht z.B. durch Flüssig-flüssig-Extraktion und/oder Festphasenextraktion.
3. Trennung mittels HPLC:
Bei der Trennung mittels HPLC erfolgt eine Trennung nach Polaritäten, so dass eventuell mitextrahierte Matrixbestandteile abgetrennt werden können, wenn sie sich in ihrer Polarität stark vom Analyten unterscheiden.
4. Detektion mittels MS:
Im Massenspektrometer werden die Substanzen nach ihren Molekularmassen getrennt bzw. nur die interessierenden Massen analysiert (Quasimolekülonen, Fragmente oder Tochterionen des Analyten).

Von diesen vier Teilschritten ist Schritt zwei der zeitaufwändigste und birgt neben Teilschritt eins das höchste Risiko an Probenverlusten. Um die Extraktion des Analyten möglichst effektiv zu gestalten, bietet sich die Möglichkeit einer vollautomatischen online-Festphasenextraktion mittels der Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP2000 an. Aus der Kopplung dieser Probenvorbereitungseinheit mit der LC-MS sollte schließlich eine empfindliche und selektive Methode mit hochgradig automatisierter Probenaufarbeitung zur Bestimmung von Chloramphenicol mittels online-SPE-LC-MS resultieren.

Da zur Analyse zwei LC-MS Systeme - Single Quadrupole und Triple Quadrupole - zur Verfügung standen, sollte ein Vergleich der Leistungsfähigkeit dieser Systeme

im Hinblick auf Spezifität, Selektivität und Bestimmungsgrenzen erfolgen. Für diesen Vergleich wird die Bestimmung des Gehaltes an CAP in Honig herangezogen. Des Weiteren sollten die LC-MS Messergebnisse von CAP in der Matrix Honig mit den Ergebnissen des ELISA-Tests als Screeningmethode verglichen werden. Alle zu analysierenden Honigproben werden zuerst mittels ELISA gemessen und abgesehen von Negativkontrollen, die zur Überprüfung des ELISA-Tests mittels LC-MS gemessen werden, nur Positiv-Befunde mittels LC-MS bestätigt. Somit liegt vor der LC-MS-Analyse bereits der mittels ELISA erhaltene Wert für CAP vor. Durch den Vergleich der Werte sollte ermittelt werden, inwieweit ELISA- und LC-MS-Ergebnisse miteinander korrelieren und ob das Ergebnis des ELISA-Tests zur Abschätzung der im Honig enthaltenen CAP-Konzentration genutzt werden kann. Aufgrund der Fülle der vorliegenden Ergebnisse sollte eine statistische Auswertung der CAP Positiv-Befunde hinsichtlich der geographischen Herkunft der Honige und sonstigen Bienenprodukte erfolgen. Dadurch sollte eine Aussage darüber getroffen werden, ob sich das „Chloramphenicol-Problem“ nur auf China konzentriert. Die Kenntnis über weitere betroffene Gebiete ermöglicht, Chloramphenicol-Analysen in Zukunft gezielter durchführen zu können. Darüber hinaus sollte die geographische Herkunft einzelner Honige bestimmt werden, um Zusätze von chinesischem Honig ausschließen zu können. Des Weiteren sollten andere Kontaminationsquellen wie die mögliche Migration aus wiederverwendetem Wachs identifiziert werden.

2. Material und Methoden

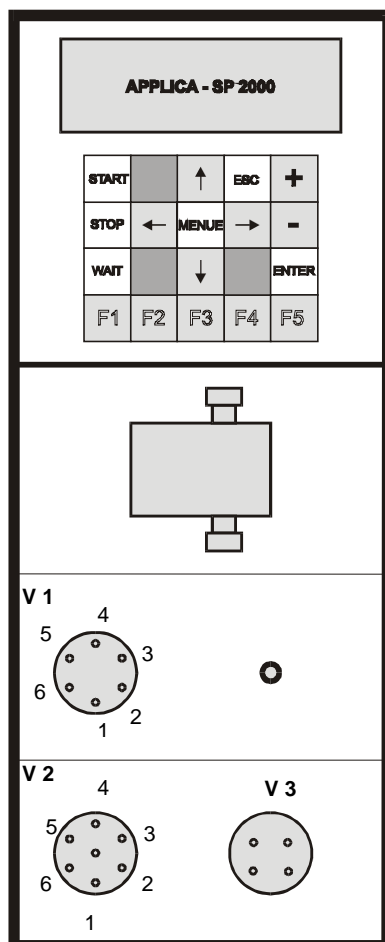
2.1. Online-SPE-LC-MS

(Online-Festphasenextraktion gekoppelt mit Flüssigchromatographie und Single Quadrupole Massenspektrometrie)

2.1.1. Online-SPE (online-Festphasenextraktion)

Die Festphasenextraktion erfolgt vollständig automatisiert durch die der HPLC-Trennung vorgeschalteten Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP2000.

2.1.1.1. Aufbau der Probenvorbereitungseinheit



Programmierung

menügeführt
5 Programme mit bis zu 50 Anweisungen

Pumpe

Doppelkolbenpumpe 0,01 - 9,99 mL/min

Ventile

V1: 6-Positions-2-Wege-Säulenschaltventil
V2: 6-Positions-1-Weg-Eluentauswahlventil
V3: 4-Positions-2-Wege-Bypass-Ventil

Abb. 2-1. Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP2000 zur automatischen Festphasenextraktion

2.1.1.2. Aufbau der online-SPE- LC-MS

Die Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP2000 zur online-Festphasenextraktion wird in das bestehende LC-MS-System zwischen Autosampler und Trennsäule integriert. Die einzelnen Schritte der Festphasenextraktion werden durch ein Programm, das mit der Injektion des Autosamplers gestartet wird, im Gerät abgespeichert.

LC-Pumpe **SP2000** LC-Autosampler MS-Detektor
 inklusive Säule

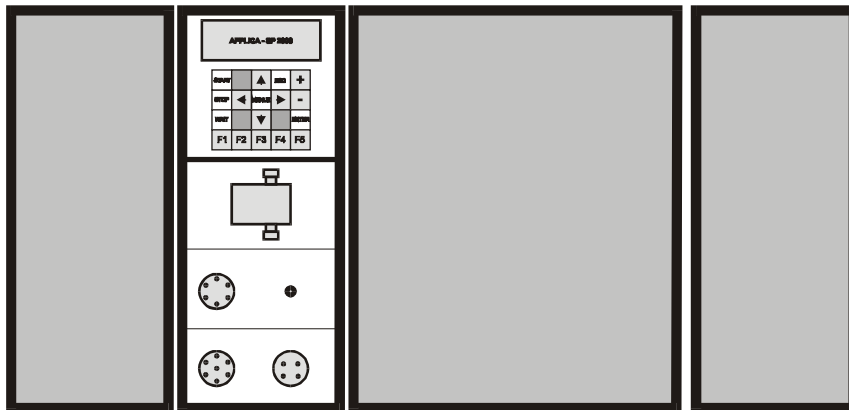


Abb. 2-2. schematischer Aufbau der online-SPE-LC-MS-Kopplung



Abb. 2-3. Anlage zur online-SPE-LC-MS

2.1.1.3. Funktion der online-SPE

Die zur SPE genutzte Kartusche (2 cm x 3 mm ID) kann mit praktisch jedem handelsüblichen SPE-Material gefüllt werden. Das SPE-Material wird so ausgewählt, dass der Analyt zunächst daran gebunden wird, Matrixbestandteile dagegen nicht. Eine Füllung reicht für etwa 50 - 500 Analysen (je nach SPE-Material, Analyseverfahren und Matrix). Als Indikatoren für den nötigen Wechsel des Kartuschen-Füllmaterials werden ein Abfall der Empfindlichkeiten und ein Durchbrechen von Matrixbestandteilen herangezogen. Dies äußert sich in den Chromatogrammen der Standardlösung und der Proben (speziell werden hierfür die Chromatogramme dotierter Proben mit bekannter Analytkonzentration herangezogen) durch zu kleine Flächen für den Substanzpeak und viele Matrix-Störpeaks.

Bei der Probenaufgabe injiziert der Autosampler direkt auf die mit dem jeweiligen SPE-Material gefüllte SPE-Kartusche statt wie sonst üblich auf die HPLC-Säule (siehe Abb. 2-4). Hierzu fördert die geräteeigene Pumpe die in der Probenschleife befindliche Probe über Kapillarverbindungen auf die SPE-Kartusche. Nicht adsorbierte Matrixbestandteile werden in den Abfall gepumpt, der Analyt wird zurückgehalten und somit aufkonzentriert. Im folgenden Waschschrift pumpt das Modul die Waschlösung über die Kartusche in den Abfall und sorgt so für eine weitere Reinigung. Der Transfer des Analyten erfolgt, indem nach Schaltung des Ventils V1 (vergl. Abb. 2-1) der HPLC-Eluent, von der HPLC-Pumpe kommend, über die SPE-Kartusche fließt und auf diesem Weg den Analyten auf die Trennsäule transferiert (siehe Abb. 2-5). Dies geschieht in der Regel im Rückfluss, d.h. in der entgegengesetzten Flussrichtung des Aufbringens auf die Kartusche, um eine komprimierte Überführung des Analyten zu erzielen. Nach erneuter Schaltung in die Ausgangsposition wird die SPE-Kartusche mit Methanol gereinigt und mit Wasser rekonditioniert. Danach steht sie für eine weitere automatisierte Probenvorbereitung zur Verfügung. Währenddessen läuft die LC-Trennung über die Trennsäule weiter.

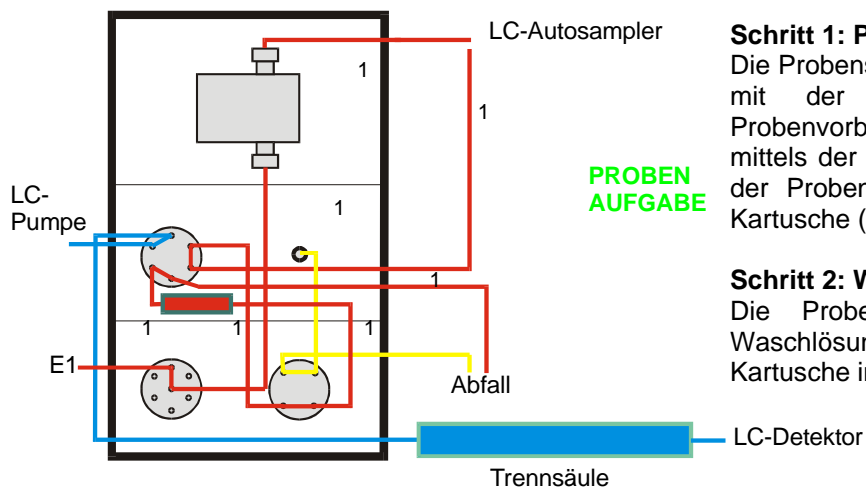


Abb. 2-4. Schema: Probenaufgabe

Schritt 1: Probenaufgabe

Die Probenschleife des Autosamplers wird mit der Probelösung gefüllt. Die Probenvorbereitungseinheit transferiert mittels der Waschlösung (E1) die Füllung der Probenschleife direkt auf die SPE-Kartusche (Linie 1).

Schritt 2: Waschschrift

Die Probenvorbereitungseinheit pumpt Waschlösung (E1) zur Reinigung über die Kartusche in den Abfall (Linie 1).

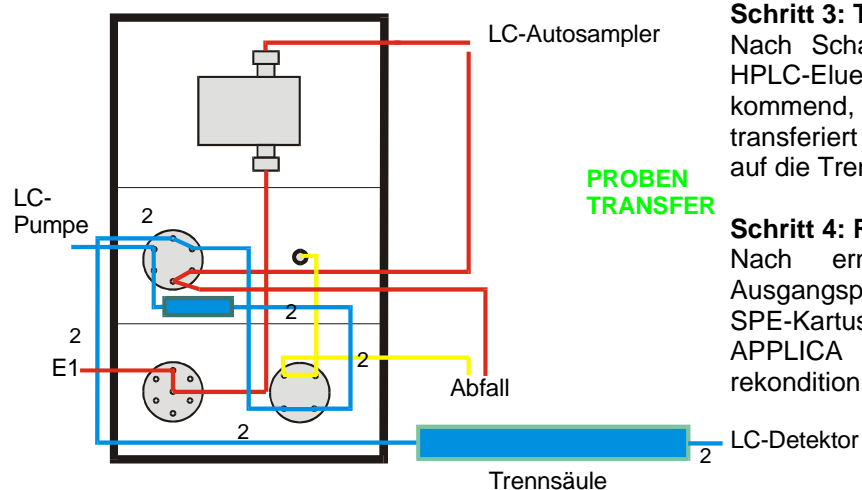


Abb. 2-5. Schema: Probentransfer

Schritt 3: Transferschritt

Nach Schaltung des Ventils fließt der HPLC-Eluent, von der HPLC-Pumpe kommend, über die SPE-Kartusche und transferiert auf diesem Weg den Analyten auf die Trennsäule (Linie 2).

Schritt 4: Rekonditionierung

Nach erneuter Schaltung in die Ausgangsposition (Abb. 2-4) wird die SPE-Kartusche über die Pumpe des APPLICA SP2000 gereinigt und rekonditioniert.

2.1.1.4. SPE-Bedingungen

Festphasenmaterial	Reversed Phase C18, 40 µm
Kartuschendimension	20 x 3 mm
Lösung 1	Reinstwasser/Methanol (v/v 95/5)
Lösung 2	Methanol

2.1.1.5. Aufbau der Schaltung der APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit

Anschlüsse (siehe Abb. 2-1)	V1 Position	V2 Position
Abfallschlauch	1	-
Autosampler (AS)	2	-
zur SPE-Kartusche	3	-
zur HPLC-Säule	4	-
von HPLC-Pumpe	5	-
von SPE-Kartusche	6	-
Methanol	-	1
Reinstwasser	-	2

Tab. 2-1. Aufbau der Schaltung der APPLICA SP2000
Probenvorbereitungseinheit

2.1.1.6. Steuerungsprogramm der APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit

STEP NR.	TIME MIN	V1 POS	V2 POS	V3 POS	C STA	P mL/min	Funktion
0	0.00	0	2	0	0	0.40	→ Konditionierung mit Reinstwasser
1	0.01	0	2	0	0	0.40	→ Transfer des Autosampler- Schleifenvolumens auf die Kartusche mit anschließendem Waschschritt
2	5.00	1	1	0	0	0.40	→ Analyten-Transfer auf HPLC-Säule
3	10.00	0	1	0	0	0.40	→ Waschen mit MeOH
4	25.00	0	2	0	0	0.40	→ Rekonditionierung mit Reinstwasser

Tab. 2-2. Steuerungsprogramm der APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit

Erläuterungen zu Tabelle 2-2:

STEP Schritt

V Ventil

C Kompressor

Die APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit kann auch mit einem Kompressor für die Trocknung der Kartusche betrieben werden. Diese Anwendung wurde jedoch für die in Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden nicht genutzt.

P Fluss

POS Position

STA Status

2.1.2. LC-Trennsystem

2.1.2.1. Autosampler

Injektionsvolumen:	400 μ L
Temperatur:	25°C
Spüllösung:	Reinstwasser

2.1.2.2. LC-System

Trennsäule:	Prontosil 120-5 C18 ace-EPS, 5 μ m, 250 x 3mm
Eluent A:	Reinstwasser
Eluent B:	Methanol
Säulen-Temperatur:	25°C

2.1.2.3. Gradient

Zeit	A	B	Fluss
[min]	[%]	[%]	[mL/min]
0,0	95	5	0,4
5,0	95	5	0,4
20,0	20	80	0,4
30,0	10	90	0,4
31,0	95	5	0,4
40,0	95	5	0,4

Tab. 2-3. Gradientenprogramm

2.1.3. Detektion mittels Single Quadrupole Massenspektrometer

2.1.3.1. Massenspektrometer-Einstellungen

Ionisierungsmethode: ESI

Polarität:

Zeit [min]	Polarität
0 - 10	positiv
10 - 25	negativ
25 - 40	positiv

Tab. 2-4. Polarität

Probe Temperatur:	400°C
Cone Voltage:	110 kV

Stickstoff: 6 bar

2.1.3.2. Massendetektion

Single-Ion-Monitoring (SIM)

Chloramphenicol	(m/z)
	321 [M-H] ⁻
	323 [M-H] ⁻
Chloramphenicol-d5	(m/z)
	326 [M-H] ⁻
	328 [M-H] ⁻

2.1.4. Analyse

2.1.4.1. Herstellung der Standardlösungen

Standard:	Chloramphenicol
Interner Standard:	Chloramphenicol-d ₅
Std.-Stammlsg. CAP-S ₀ : (ca. 1000 mg/L)	ca. 10 mg Chloramphenicol in einen 10 mL Messkolben einwiegen (Einwaage auf zwei Stellen hinter dem Komma genau) und mit MeOH bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 6 Monate bei + 4 bis + 8°C
Standard CAP-S ₁ : (ca. 1 mg/L)	10 µL CAP-S ₀ in einen 10 mL-Messkolben pipettieren und mit Methanol bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 6 Monate bei + 4 bis + 8°C
Std.-Stammlsg. CAPd ₅ -S ₀ : (ca. 100 mg/L)	Dies entspricht der Konzentration der CAPd ₅ -Lösung (Cambridge Isotope Labor) Haltbarkeit: Lieferantenvorgaben
Standard CAPd ₅ -S ₁ : (ca. 0,5 mg/L)	50 µL CAPd ₅ -S ₀ in einen 10 mL-Messkolben pipettieren und mit Methanol bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 6 Monate bei + 4 bis + 8°C
Kalibrierstandard CAP-Ref ₁ : (ca. 0,5 µg CAP/L entspricht ca. 3,3 µg CAP/kg Bienenprodukt)	25 µL CAP-S ₁ und 75 µL CAPd ₅ -S ₁ in einen 50 mL-Messkolben pipettieren und mit Reinstwasser bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 1 Tag bei RT

2.1.4.2. Messung

Kalibrierung:	1-Punkt-Kalibrierung
Injektionsreihenfolge:	2 x CAP-Ref ₁ , 5 Proben, 1 x CAP-Ref ₁ , 5 Proben, 1 x CAP-Ref ₁ usw. (nach jeweils 5 Proben neu kalibrieren)

2.1.4.3. Auswertung

Identifizierung:	Retentionszeit (Abgleich mit der Retentionszeit des internen Standards CAP-d ₅); 2 Massenspuren (m/z = 321 und 323)
Quantifizierung:	Externe Standardmethode
Berechnung der Chloramphenicol-Konzentration in der Probe (µg/kg):	

$$c(\text{CAP in der Probe}) [\mu\text{g/kg}] = \frac{c(\text{CAP-Ref}_1) [\mu\text{g/kg}] * F_{\text{Probe}}}{F_{\text{Standard}}}$$

F Peakfläche

2.1.5. Probenaufarbeitung**2.1.5.1. Honig**

0,5 (± 0,02) g des homogenisierten Honigs werden direkt in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 5 µL internem Standard (CAPd₅-S₁) versetzt und in 1 mL 4 %iger NaCl-Lösung gelöst. Es werden 5 mL Ethylacetat hinzugegeben, anschließend wird ca. 30 min auf dem Schüttler extrahiert. Die Lösung wird zur Phasentrennung bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) 5 Minuten zentrifugiert. 1,5 ml der Ethylacetatphase werden in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, und die Lösung wird im Vakuumkonzentrator bei 60 °C und 1400 min⁻¹ (240 x g) zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 1 mL Reinstwasser aufgenommen und in ein Autosamplergefäß überführt.

2.1.5.2. Frisches Geleé Royale

0,5 (± 0,02) g frisches Geleé Royale werden direkt in einem 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 10 µL internem Standard (CAPd₅-S₁) und 10 mL Chloroform versetzt. Die Lösung wird ca. 30 min auf dem Schüttler extrahiert und zur Phasentrennung bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) 5 Minuten zentrifugiert. Je 1,5 ml des Chloroformextraktes werden in zwei 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, und die Lösung wird im Vakuumkonzentrator bei 60 °C und 1400 min⁻¹ (240 x g) zur Trockene eingengt. Den Rückstand nimmt man in je 0,5 mL Reinstwasser auf, zentrifugiert bei 13 000 min⁻¹ (16060 x g) und vereinigt danach die Überstände in einem Autosamplergefäß.

2.1.5.3. Lyophilisiertes Gelée Royale

0,5 (\pm 0,02) g lyophilisiertes Gelée Royale werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 10 μ L internen Standard (CAPd₅-S₁) und 10 mL Chloroform versetzt. Die Lösung wird ca. 30 min auf dem Schüttler extrahiert, bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) 5 Minuten zentrifugiert und anschließend über ein Faltenfilter filtriert. 2 x 1,5 mL des Chloroformextraktes werden in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wird dieser Extrakt im Vakuumkonzentrator bei 60 °C und 1400 min⁻¹ (240 x g) bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in je 0,5 mL Reinstwasser aufgenommen und die Lösung bei 13 000 min⁻¹ (16060 x g) zentrifugiert. Danach werden die Überstände in einem Autosamplergefäß vereinigt.

2.1.5.4. Bienenwachs

0,5 (\pm 0,02) g Bienenwachs werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 10 μ L internen Standard (CAPd₅-S₁) versetzt und in 3 mL n-Hexan gelöst. Nach der Zugabe von 5 mL Reinstwasser wird die Lösung ca. 30 min auf dem Schüttler extrahiert und zur Phasentrennung bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) 5 Minuten zentrifugiert. 1,5 mL der wässrigen Lösung werden im Vakuumkonzentrator bei 60 °C und 1400 min⁻¹ (240 x g) bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in 1 mL Reinstwasser aufgenommen und die Lösung in ein Autosamplergefäß überführt.

2.1.5.5. Pollen

Die Aufarbeitung erfolgt analog der des lyophilisierten Gelée Royales (siehe 2.1.5.3).

2.1.5.6. Honigwein, mit Honig gesüßter Saft, Ginseng-Gelée-Royale-Nahrungsergänzungs-Ampullen

Die Aufarbeitung erfolgt analog der des Honigs (siehe 2.1.5.1).

2.2. LC-MS/MS (Flüssigchromatographie gekoppelt mit Triple Quadrupole Massenspektrometrie)

2.2.1. LC-Trennsystem

2.2.1.1. Autosampler

Injektionsvolumen:	20 µL
Temperatur:	25°C
Spüllösung:	Reinstwasser/Methanol (v/v 80/20)

2.2.1.2. LC-System

Trennsäule:	Thermo BDS Hypersil C18 125 x 2,1 mm ID; 5 µm
Eluent A:	Reinstwasser
Eluent B:	Methanol
Säulen-Temperatur:	25°C

2.2.1.3. Gradient

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluss [mL/min]
0,0	90	10	0,2
2,0	90	10	0,2
10,0	25	75	0,2
15,0	25	75	0,2
16,0	90	10	0,2
25,0	90	10	0,2

Tab. 2-5. Gradientenprogramm

2.2.2. Triple Quadrupole Massenspektrometer-Detektion

2.2.2.1. Massenspektrometer-Einstellungen

Ionisierungsmethode:	ESI
Polarität:	negativ
Capillary Temperature:	380°C
Tune-Methode:	Optimierung mittels Auto-Tune auf die Masse 321

Source CID Collision Energy	14 V
Collision Gas Pressure	1,0 mTorr
Collision Energy	17 V
Scan Width	m/z 0,5
Peak Width	Q1 0,5 FWHM
	Q3 0,5 FWHM
Scan Time	0,1 s

Sprühkopfstellung: 30° off axis

2.2.2.2. Massendetektion

Single-Reaktion-Mode (SRM)

Chloramphenicol	Parent-Mass (m/z)	MS/MS-Produkt-Ionen (m/z)
	321 [M-H] ⁻	152/176/194/257
	323 [M-H] ⁻	152/176/194/257/259
Chloramphenicol-d ₅	326 [M-H] ⁻	157/262/180/199
	328 [M-H] ⁻	157/262/264/180/199

2.2.3. Analyse

2.2.3.1. Herstellung der Standardlösungen

Standard:	Chloramphenicol
Interner Standard:	Chloramphenicol-d ₅
Std.-Stammlsg. CAP-S ₀ : (ca. 1000 mg/L)	ca. 10 mg Chloramphenicol in einen 10 mL Messkolben einwiegen (Einwaage auf zwei Stellen hinter dem Komma genau) und mit MeOH bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 6 Monate bei + 4 bis + 8°C
Standard CAP-S ₁ : (ca. 1 mg/L)	10 µL CAP-S ₀ in einen 10 mL-Messkolben pipettieren und mit Methanol bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 2 Monate bei + 4 bis + 8°C
Std.-Stammlsg. CAPd ₅ -S ₀ :	Dies entspricht der Konzentration der CAPd ₅ - (ca. 100 mg/L)Lösung (Cambridge Isotope Labor) Haltbarkeit: Lieferantenvorgaben
Standard CAPd ₅ -S ₁ :	10 µL CAPd ₅ -S ₀ in einen 10 mL-Messkolben

(ca. 0,1 mg/L)	pipettieren und mit Methanol bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 2 Monate bei + 4 bis + 8°C
Kalibrierstandard CAP-Ref ₁ (CAP ca. 2 µg/L entspricht ca. 1 µg CAP/kg Honig bzw. Gelée Royale-Ampullen) und CAP-Ref ₂ : (ca. 2 µg CAP/kg Gelée Royale frisch oder lyophilisiert, Pollen, Bienenwachs)	20 µL CAP-S ₁ und 1000 µL CAPd ₅ -S ₁ in einen 10 mL-Messkolben pipettieren und mit Reinstwasser/Methanol (v/v 9/1) bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 1 Tag bei RT
Kalibrierstandard CAP-Ref ₃ : (CAP ca. 2 µg/L entspricht ca. 2 µg CAP/kg Propolis)	5 µL CAP-S ₁ und 1000 µL CAP-d ₅ -S ₁ in einen 10 mL-Messkolben pipettieren und mit Reinstwasser/Methanol (v/v 90/10) bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 1 Tag bei RT

2.2.3.2. Messung

Kalibrierung:	1-Punkt-Kalibrierung
Injektionsreihenfolge:	2 x CAP-Ref ₁ bzw. 2 oder 3, 5 Proben, 1 x CAP-Ref ₁ bzw. 2 oder 3, 5 Proben, 1 x CAP-Ref ₁ usw. (nach jeweils 5 Proben neu kalibrieren)

2.2.3.3. Auswertung

Identifizierung:	Retentionszeit (Abgleich mit der Retentionszeit des internen Standards CAP-d ₅); 2 Massenspuren (m/z = 321 und 323); Massenspektrum MS/MS-Produkte
Integration:	Peakflächenbestimmung der Summe der Massenspuren m/z 321 und m/z 323 für CAP und m/z 326 und m/z 328 für CAP-d ₅
Quantifizierung:	Externe Standardmethode mit Wiederfindungskorrektur über den internen Standard

Berechnung der Chloramphenicol-Konzentration in der Probe (µg/kg):

$$c(\text{CAP}_{\text{Probe}}) [\mu\text{g/kg}] = \frac{c(\text{CAP-Ref}) [\mu\text{g/kg}] * A_{\text{Probe}}(\text{CAP})}{A_{\text{Standard}}(\text{CAP})} * \frac{A_{\text{Standard}}(\text{CAP-d}_5)}{A_{\text{Probe}}(\text{CAP-d}_5)}$$

Mit	
c (CAP-Ref)	Konzentration des Referenzstandards
A _{Probe} (CAP)	Summe der Peakflächen der Massenspuren 321 und 323 in der Probe
A _{Standard} (CAP)	Summe der Peakflächen der Massenspuren 321 und 323 im Standard
A _{Standard} (CAP-d ₅)	Summe der Peakflächen der Massenspuren 326 und 328 im Standard
A _{Probe} (CAP-d ₅)	Summe der Peakflächen der Massenspuren 326 und 328 in der Probe

2.2.4. Probenaufarbeitung

2.2.4.1. Honig

1 (\pm 0,05) g des homogenisierten Honigs wird direkt in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 50 μ L internem Standard (CAPd₅-S₁) versetzt und in 2 mL 4 %iger NaCl-Lösung gelöst. Es werden 5 mL Ethylacetat hinzugeben und anschließend wird ca. 15 min auf dem Schüttler extrahiert. Die Lösung wird bis zur Phasentrennung bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) 5 Minuten zentrifugiert. Danach wird die komplette Ethylacetatphase abgenommen und in ein weiteres 12 mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Im Stickstoffstrom bei 40 °C wird die Lösung zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 500 μ L Reinstwasser/Methanol (v/v 90/10) aufgenommen, mikrofiltriert (0,45 μ m) und diese Lösung in ein Autosamplergefäß überführt.

2.2.4.2. Frisches Gelée Royale

0,5 (\pm 0,02) g frisches Geleé Royale werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 50 μ L internem Standard (CAPd₅-S₁), 3 mL 4 %iger NaCl-Lösung und 500 μ L 0,5 %iger Ammoniak-Lösung versetzt. Die Probelösung sollte einen pH-Wert von 6,5 – 7,4 aufweisen. Ist dies nicht der Fall, wird weitere 0,5 %ige Ammoniak-Lösung hinzugegeben, bis der entsprechende pH-Wert Bereich erreicht ist. Bis zum vollständigen Lösen des Geleé Royales wird die Lösung auf dem Schüttler gerüttelt. Anschließend wird sie 5 min bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) zentrifugiert und die wässrige Phase in ein zweites 12 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Der zurückbleibende Rückstand wird erneut mit 2 mL 4 %iger NaCl-Lösung aufgeschlemmt und 2 min bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) zentrifugiert. Der wässrigen Überstand wird zu der Lösung im zweiten Zentrifugenröhrchen hinzugefügt und der Rückstand verworfen.

→ Die wässrige Lösung wird zweimal mit je 5 mL Ethylacetat 15 min auf dem Schüttler extrahiert und zur Phasentrennung jeweils 5 min bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) zentrifugiert. Jeweils 4 mL der Ethylacetatphase werden danach in ein weiteres 12 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und im Stickstoffstrom bei 40 °C zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 400 μ L Reinstwasser/Methanol (v/v 90/10) aufgenommen. Diese Lösung wird in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und 5 min bei 13 000 min⁻¹ (16060 x g) zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand mikrofiltriert (0,45 μ m) und in ein Autosamplergefäß überführt.

Bei starken Matrixstörungen im Chromatogramm empfiehlt sich eine Carrez-Klärung und Entfettung mit Hexan:

0,5 (\pm 0,02) g frisches Geleé Royale werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 50 μ L internem Standard (CAPd₅-S₁), 3 mL 4 %iger NaCl-Lösung und 500 μ L 0,5 %iger Ammoniak-Lösung versetzt. Die Probelösung sollte einen pH-Wert von 6,5 – 7,4 besitzen. Ist dies nicht der Fall, wird weitere 0,5 %ige Ammoniak-Lösung hinzugegeben, bis der entsprechende pH-Wert Bereich erreicht ist. Die Lösung verbleibt bis zum vollständigen Lösen des Geleé Royales auf dem Schüttler. Anschließend werden 200 μ L Carrez-Lösung I hinzugefügt, und die Lösung wird nach guter Durchmischung mit 200 μ L Carrez-Lösung II versetzt. Danach werden 3 mL Hexan hinzugegeben, und die Lösung wird erneut 15 Minuten auf dem Schüttler extrahiert. Diese Lösung wird anschließend 5 min bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) zentrifugiert. Danach wird die Hexanphase komplett abgenommen und verworfen. Die wässrige Phase wird in ein zweites 12 mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Der verbleibende Rückstand wird erneut mit 2 mL 4 %iger NaCl-Lösung aufgeschlemmt und 2 min bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird zu der Lösung im zweiten Zentrifugenröhrchen hinzugegeben und der Rückstand verworfen.

Weitere Extraktion siehe oben →

2.2.4.3. Lyophilisiertes Geleé Royale

0,5 (\pm 0,02) g lyophilisiertes Geleé Royale werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 50 μ L internem Standard (CAPd₅-S₁), 3 mL 4 %iger NaCl-Lösung und 1,5 mL 0,5 %iger Ammoniak-Lösung versetzt. Diese Lösung sollte einen pH-Wert von 6,5 – 7,4 aufweisen. Ist dies nicht der Fall, wird weitere 0,5 %ige Ammoniak-Lösung hinzugegeben, bis der entsprechende pH-Wert Bereich erreicht ist. Die Lösung wird bis zum vollständigen Lösen des Geleé Royales auf dem Schüttler gerüttelt und anschließend 5 min bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) zentrifugiert. Anschließend wird die wässrige Phase in ein zweites 12 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und der verbleibende Rückstand erneut mit 2 mL 4 %iger NaCl-Lösung aufgeschlemmt. Anschließend wird die Lösung 2 min bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) zentrifugiert, der wässrige Überstand zu der Lösung im zweiten Zentrifugenröhrchen hinzugegeben und der Rückstand verworfen.

→ Die wässrige Lösung wird zweimal mit je 5 mL Ethylacetat 15 min auf dem Schüttler extrahiert. Zur Phasentrennung zentrifugiert man jeweils 5 min bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g), und überführt danach jeweils 4 mL der Ethylacetatphase in ein weiteres 12 mL-Zentrifugenröhrchen. Die 8 mL der Ethylacetatphase werden im Stickstoffstrom bei 40 °C zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 400 μ L Reinstwasser/Methanol (v/v 90/10) aufgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert. Diese Lösung wird 5 min bei 13 000 min⁻¹ (16060 x g) zentrifugiert, mikrofiltriert (0,45 μ m) und der Überstand in ein Autosamplergefäß überführt.

Bei starken Matrixstörungen im Chromatogramm empfiehlt sich eine Carrez-Klärung und Entfettung mit Hexan:

0,5 (\pm 0,02) g lyophilisiertes Geleé Royale werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 50 μ L internem Standard (CAPd₅-S₁), 3 mL 4 %iger NaCl-Lösung und 1,5 mL 0,5 %iger Ammoniak-Lösung versetzt. Diese Lösung sollte einen pH-Wert von 6,5 – 7,4 aufweisen. Die Lösung wird bis zum vollständigen Lösen des

Gelée Royales auf dem Schüttler gerüttelt. Ist dies nicht der Fall, wird weitere 0,5 %ige Ammoniak-Lösung hinzugegeben, bis der entsprechende pH-Wert Bereich erreicht ist. Anschließend werden 200 μL Carrez I hinzugefügt. Nach guter Durchmischung wird die Lösung mit 200 μL Carrez II versetzt, geschüttelt und mit 3 mL Hexan 15 Minuten auf dem Schüttler extrahiert. Zur Phasentrennung wird die Lösung 5 min bei $8\,500\text{ min}^{-1}$ ($10015 \times g$) zentrifugiert und die Hexanphase komplett abgenommen und verworfen. Die wässrige Phase wird in ein zweites 12 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und der verbleibenden Rückstand erneut mit 2 mL 4 %iger NaCl-Lösung aufgeschlemmt. Anschließend wird die Lösung 2 min bei $8\,500\text{ min}^{-1}$ ($10000 \times g$) zentrifugiert, der wässrige Überstand zu der Lösung im zweiten Zentrifugenröhrchen hinzugegeben und der Rückstand verworfen.

Weitere Extraktion siehe oben →

2.2.4.4. Bienenwachs

0,5 ($\pm 0,02$) g Wachs werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 50 μL internem Standard (CAPd₅-S₁) versetzt und in 4 mL Hexan gelöst. Anschließend werden 2 mL Reinstwasser hinzugegeben. Die Lösung verbleibt 30 min auf dem Schüttler und wird zur Phasentrennung 5 min bei $8\,500\text{ min}^{-1}$ ($10015 \times g$) zentrifugiert. Danach wird die wässrige Phase vollständig abgenommen und je 1 mL in zwei 2 mL Reaktionsgefäße pipettiert. Die Lösungen werden im Vakuumkonzentrator bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ und 1400 min^{-1} ($240 \times g$) bis zur Trockene eingeengt und die Rückstände in jeweils 250 μL Reinstwasser/Methanol (v/v 90/10) aufgenommen. Die Lösungen werden vereinigt, mikrofiltriert ($0,45\text{ }\mu\text{m}$) und in ein Autosamplergefäß überführt.

2.2.4.5. Pollen

0,5 ($\pm 0,02$) g gemahlene Pollen werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 50 μL internem Standard (CAPd₅-S₁) und 10 mL Chloroform versetzt. Die Lösung wird 30 Minuten auf dem Schüttler extrahiert und anschließend 5 min bei $8\,500\text{ min}^{-1}$ ($10000 \times g$) zentrifugiert. Die Lösung wird über ein Faltenfilter filtriert, 8 ml der Chloroformphase werden abgenommen und im Stickstoffstrom bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in 400 μL Reinstwasser/Methanol (v/v 90/10) aufgenommen. Die erhaltene Lösung wird in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, anschließend 5 min bei $13\,000\text{ min}^{-1}$ ($16060 \times g$) zentrifugiert, mikrofiltriert ($0,45\text{ }\mu\text{m}$) und der Überstand in ein Autosamplergefäß überführt.

Alternativ:

Sollte die Aufarbeitung der Pollen mittels der oben beschriebenen Methode zu schlechten Wiederfindungen (Fläche des internen Standards CAP-d₅ in der Probe $< 25\%$ im Vergleich zu der Fläche des Referenzstandards) führen, kann die folgende Aufarbeitung durchgeführt werden:

0,5 ($\pm 0,02$) g gemahlene und homogenisierte Pollen werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 50 μL internem Standard (CAPd₅-S₁), 3 mL 4 %iger NaCl-Lösung und 540 μL 0,5 %iger Ammoniak-Lösung versetzt. Diese Lösung sollte einen pH-Wert von 6,5 – 7,4 besitzen. Die Lösung wird bis zum vollständigen Lösen der Pollen auf dem Schüttler gerüttelt. Anschließend werden

200 μL Carrez I-Lösung hinzugegeben, die Lösung wird gut durchmischt und mit 200 μL Carrez II-Lösung versetzt. 3 mL Hexan werden hinzugegeben und nach 10 minütiger Extraktion wird die Lösung bei $8\,500\text{ min}^{-1}$ ($10015 \times g$) 5 min zentrifugiert. Die Hexanphase wird komplett abgenommen und verworfen. Die wässrige Phase wird in ein zweites 12 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und der übrigbleibende Rückstand erneut mit 2 mL 4 %iger NaCl-Lösung aufgeschlemmt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei $8\,500\text{ min}^{-1}$ ($10015 \times g$), wird der Überstand zu der Lösung im zweiten Zentrifugenröhrchen hinzugegeben und der Rückstand verworfen. Die wässrige Lösung wird mit zweimal je 5 mL Ethylacetat 30 min auf dem Rüttler extrahiert und zur Phasentrennung jeweils 5 min bei $8\,500\text{ min}^{-1}$ ($10015 \times g$) zentrifugiert. Je 4 mL der Ethylacetatphase werden danach in ein weiteres 12 mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert und die 8 mL der Ethylacetatphase im Stickstoffstrom bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ zur Trockene eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wird in 400 μL Reinstwasser/Methanol (v/v 90/10) aufgenommen. Die so erhaltene Lösung wird in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei $13\,000\text{ min}^{-1}$ ($16060 \times g$) zentrifugiert, anschließend mikrofiltriert ($0,45\text{ }\mu\text{m}$) und in ein Autosamplergefäß überführt.

2.2.4.6. Propolis

0,25 ($\pm 0,01$) g Propolis werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 100 μL internem Standard ($\text{CAPd}_5\text{-S}_1$) und 8 mL Methanol versetzt. Die Lösung wird bis zum vollständigen Lösen des Propolis 20 min auf dem Schüttler gerüttelt und anschließend 5 min bei $8\,500\text{ min}^{-1}$ ($10015 \times g$) zentrifugiert. Die Methanolphase wird mittels einer Einwegspritze abgenommen und mit Hilfe eines Aufsatzes für die manuelle Festphasenextraktion vorsichtig durch eine Bakerbond® NH_2 -Festphasen-Kartusche gedrückt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Lösung nur eine ganz leichte Gelbfärbung annimmt. Durchschnittlich werden 3 - 4 Festphasenkartuschen verwendet. Es werden nur 4 mL benötigt, daher muss nicht die gesamte Lösung über die Säule gedrückt werden.

Alternativ:

Man nimmt die Methanolphase ab und drückt diese vorsichtig durch eine Mycosep® PATULIN Säule (siehe Abb. 2-6).

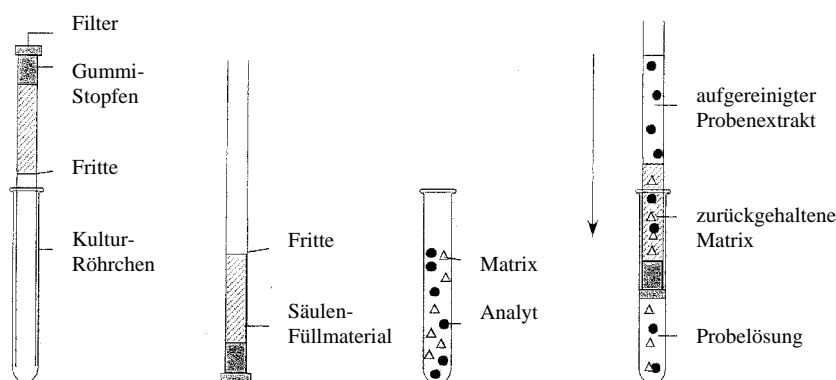


Abb. 2-6. Funktionsweise der Mycosep® PATULIN Säulen

Auch dabei ist darauf zu achten, dass sich die Lösung nur leicht gelblich verfärbt. Bei Bedarf muss die Säulenfüllung erhöht werden (meistens um ein Drittel). Es ist ausreichend, 4 mL Endvolumen zu erreichen, daher muss nicht die gesamte Lösung über die Säule gedrückt werden.

4 mL der methanolischen Phase werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und im Stickstoffstrom bei 40 °C zur Trockene einkonzentriert. Den Rückstand löst man in 50 µL Methanol. Nach dem vollständigen Lösen im Ultraschallbad werden 450 µL Reinstwasser hinzugefügt. Die Lösung wird nach guter Durchmischung 5 min bei 13 000 min⁻¹ (16060 x g) zentrifugiert, der Überstand wird mikrofiltriert (0,45 µm) und in ein Autosamplergefäß abgefüllt.

2.2.4.7. Gelée Royale Ampullen

Die Aufarbeitung erfolgt wie beim Honig (siehe 2.2.4.1).

2.3. Online-SPE-LC-MS/MS (Online-Festphasenextraktion gekoppelt mit Flüssigchromatographie und Triple Quadrupole Massenspektrometrie)

2.3.1. online-SPE (online-Festphasenextraktion)

2.3.1.1. SPE-Bedingungen

Festphasenmaterial	Reversed Phase C 18, 40 µm
Kartuschendimension	20 x 3 mm
Lösung 1	Reinstwasser/Methanol (v/v 95/5)
Lösung 2	Methanol/Acetonitril (v/v 50/50)

2.3.1.2. Aufbau der Schaltung der APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit

Siehe 2.1.1.5

2.3.1.3. Steuerungsprogramm der APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit

STEP NR.	TIME MIN	V1 POS	V2 POS	V3 POS	C STA	P mL/min	Funktion
0	0.00	0	2	0	0	0.40	→ Konditionierung mit Reinstwasser
1	0.01	0	2	0	0	0.40	→ Transfer des Autosampler-Schleifenvolumens auf die Kartusche mit anschließendem Waschschrift
2	4.00	1	1	0	0	0.40	→ Analyten-Transfer auf HPLC-Säule
3	8.00	0	1	0	0	0.40	→ Waschen mit MeOH
4	16.00	0	2	0	0	0.40	→ Rekonditionierung mit Reinstwasser

Tab. 2-6. Steuerungsprogramm der APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit

Erläuterungen zu Tabelle 2-6: siehe 2.1.1.6.

2.3.2. LC-Trennsystem

2.3.2.1. Autosampler

Injektionsvolumen:	500 µL
Temperatur:	25°C

Spüllösung: Reinstwasser/Methanol (v/v 80/20)

2.3.2.2. LC-System

Trennsäule: Thermo BDS Hypersil C18 125 x 2,1 mm ID; 5 µm

Eluent A: Reinstwasser

Eluent B: Methanol

Säulen-Temperatur: 25°C

2.3.2.3. Gradient

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluss [mL/min]
0,0	90	10	0,2
6,0	90	10	0,2
10,0	50	50	0,2
15,0	25	75	0,2
20,0	90	10	0,2
25,0	90	10	0,2

Tab. 2-7. Gradientenprogramm

2.3.3. Detektion mittels Triple Quadrupole Massenspektrometer

2.3.3.1. Massenspektrometer-Einstellungen

Siehe 2.2.2.1

2.3.3.2. Massendetektion

Siehe 2.2.2.2

2.3.4. Analyse

2.3.4.1. Herstellung der Standardlösungen

Standard: Chloramphenicol

Interner Standard: Chloramphenicol-d₅

Std.-Stammlsg. CAP-S₀: ca. 10 mg Chloramphenicol in einen 10 mL Messkolben einwiegen (Einwaage auf zwei Stellen hinter dem Komma genau) und mit MeOH bis zur Marke auffüllen.
Haltbarkeit: 6 Monate bei + 4 bis + 8°C

Standard CAP-S ₁ : (ca. 1 mg/L)	10 µL CAP-S ₀ in einen 10 mL-Messkolben pipettieren und mit Methanol bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 2 Monate bei + 4 bis + 8°C
Std.-Stammlsg. CAPd ₅ -S ₀ : (ca. 100 mg/L)	Dies entspricht der Konzentration der CAPd ₅ -Lösung (Cambridge Isotope Labor) Haltbarkeit: Lieferantenvorgaben
Standard CAPd ₅ -S ₁ : (ca. 0,1 mg/L)	10 µL CAPd ₅ -S ₀ in einen 10 mL-Messkolben pipettieren und mit Methanol bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 2 Monate bei + 4 bis + 8°C
Kalibrierstandard CAP-Ref ₁ .: (CAP ca. 0,2 µg/L entspricht ca. 1 µg CAP/kg Bienenprodukt)	20 µL CAP-S ₁ und 1000 µL CAPd ₅ -S ₁ in einen 100 mL-Messkolben pipettieren und mit 5 molarer Ammoniumacetat-Lösung bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 1 Tag bei RT
Kalibrierstandard CAP-Ref ₂ .: (CAP ca. 0,2 µg/L entspricht ca. 1 µg CAP/kg Bienenwachs)	20 µL CAP-S ₁ und 1000 µL CAPd ₅ -S ₁ in einen 100 mL-Messkolben pipettieren und mit Reinstwasser bis zur Marke auffüllen. Haltbarkeit: 1 Tag bei RT

2.3.4.2. Messung

siehe 2.2.3.2

2.3.4.3. Auswertung

siehe 2.2.3.3

2.3.5. Probenaufarbeitung

2.3.5.1. Honig, frisches und lyophilisiertes Gelée Royale, Pollen

0,5 g des homogenisierten Bienenproduktes werden direkt in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 50 µL internem Standard (CAPd₅-S₁) versetzt und in 5 mL 5 molarer Ammoniumacetat-Lösung gelöst. Anschließend wird die Lösung ca. 15 min auf dem Schüttler extrahiert und 5 min bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g) zentrifugiert. Danach wird ein Teil der Lösung mikrofiltriert (0,45 µm) und in ein Autosamplergefäß überführt.

2.3.5.2. Bienenwachs

0,5 (± 0,02) g Wachs werden in ein 12 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 50 µL internen Standard (CAPd₅-S₁) versetzt und in 4 mL Hexan gelöst. 5 mL Reinstwasser werden hinzugeben, und nach 30 minütiger Extraktion auf dem Schüttler wird die Lösung zur Phasentrennung 5 min bei 8 500 min⁻¹ (10015 x g)

zentrifugiert. Anschließend wird ein Teil der wässrigen Phase abgenommen, mikrofiltriert und in ein Autosamplergefäß überführt.

2.4. Pollenanalyse

Die Pollenanalyse erfolgt gemäß der ASU § 35 LMBG Methode L 40.00-11: Bestimmung der relativen Pollenhäufigkeit (Übernahme der gleichnamigen Deutschen Norm DIN 10760, Ausgabe Mai 2002) [94]

2.4.1. Probenvorbereitung

10 g Honig werden in ein Becherglas eingewogen und in 20 mL destilliertem Wasser gelöst. Das destillierte Wasser sollte nicht wärmer als 40 °C sein. Anschließend wird 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Sollte man eine nicht ausreichende Menge Sediment erhalten, wird erneut 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert, das Zentrifugenglas wird fortwährend schräg nach unten gerichtet gehalten, um möglichst viel der verbleibenden Flüssigkeit auf ein saugendes Papier abfließen zu lassen. Das Sediment wird mit einer Pasteur-Pipette gründlich aufgewirbelt und mit dieser Pipette auf einem Objektträger über eine Fläche von 22 mm x 22 mm ausgestrichen. Bis zur vollständigen Trocknung verbleibt der Objektträger auf einer auf 40 °C erhitzten Wärmeplatte. Die als Einbettmedium verwendete Glyceringelatine wird ebenfalls auf dieser Wärmeplatte verflüssigt. Anschließend wird ein Tropfen Glyceringelatine auf ein Deckgläschen überführt, und mit diesem wird diagonal ein Kreuz geformt. Dadurch werden die Pollen in ihrer Position gehalten, während das Deckgläschen über das getrocknete Sediment gesenkt wird. Das Senken des Deckgläschens muss sehr langsam erfolgen, um Luftblasen zu vermeiden. Das Präparat wird 5 min auf der Wärmeplatte belassen, um eine gute Verteilung der Glyceringelatine und ein perfektes Quellen der Pollen zu sichern. Bevor mit dem Mikroskopieren begonnen wird, muss die Glyceringelatine erstarrt sein.

2.4.2. Mikroskopie

Die Auszählung erfolgt bei einer 400-fachen Vergrößerung. Nach der ersten orientierenden Durchsicht, bei der die vorhandenen Pollenarten identifiziert werden, wird die Quantität wichtiger Pollen festgestellt. Es werden mindestens 500 Pollen in 100er Schritten kumulativ gezählt, und mehr, wenn keine Stabilität in den Zählergebnissen eingetreten ist. Blickfelder und Zählbahnen sind gleichmäßig über das Präparat zu verteilen.

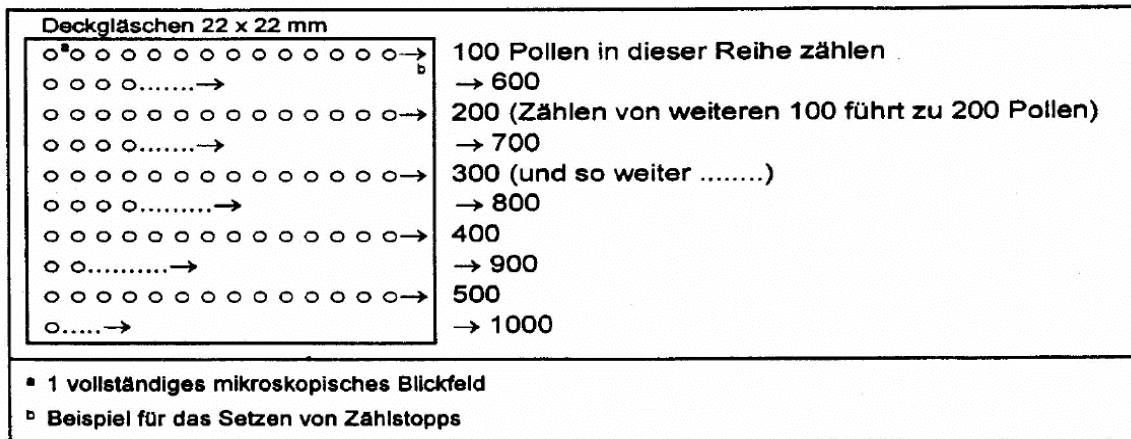


Abb 2-7. Schema zur Auszählung von Pollen [94]

Die Auszählung der Pollen erfolgt gemäß dem Schema in Abb. 2-7.

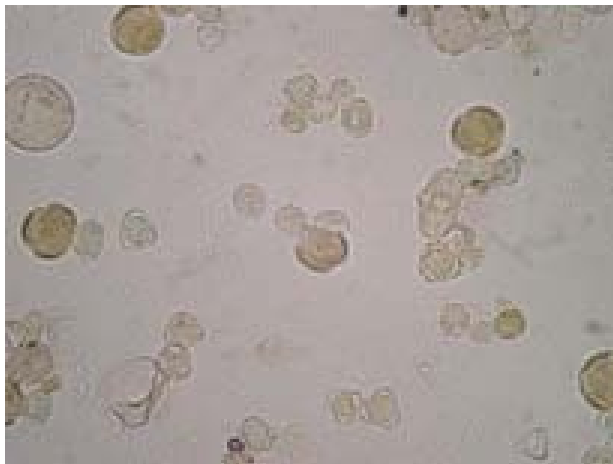


Abb 2-8. Beispiel eines vollständigen mikroskopischen Blickfeldes

Zählstopps sollten möglichst gleichmäßig über die Gesamtbreite, d.h. über eine Reihe des Sediments verteilt sein. Je Reihe werden 100 Pollenkörner gezählt. Die ersten fünf Reihen werden gleichmäßig über das Sediment verteilt (500 Pollen). Die nächsten fünf Reihen werden zwischen den ersten fünf Reihen eingeordnet (1000 Pollen). Zum Zählen wird ein Zählgerät verwendet. Pollenballungen, die auf Bienenbrot zurückzuführen sind, werden nicht mitgezählt.

2.5. ELISA

2.5.1. Prinzip der Methode

Zum Screening auf Chloramphenicol mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) wurde der RIDASCREEN® Chloramphenicol-Test verwendet. Dabei handelt es sich um einen kompetitiven Enzymimmunoassay.

Der Test beruht auf dem Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion.

Die im Testkit enthaltenen Mikrotiterstreifen aus Kunststoff sind in ihren Vertiefungen mit Fänger-Antikörpern gegen Chloramphenicol-Antikörper beschichtet. In diese Vertiefungen gibt man Standard- bzw. Probelösung, enzymmarkiertes

Chloramphenicol (Enzymkonjugat) und Chloramphenicol-Antikörper. Da die Antikörper im Unterschuss zugesetzt werden, konkurrieren freies und enzymmarkiertes Chloramphenicol um die Chloramphenicol-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Die Antikörper binden das CAP aus der Probe und das enzymmarkierte Chloramphenicol im Verhältnis ihrer Konzentrationen. Die Chloramphenicol-Antikörper werden ihrerseits an die immobilisierten Fänger-Antikörper gebunden, so dass damit gleichzeitig das an die CAP-Antikörper gebundene CAP und das enzymmarkierte Chloramphenicol in den Mikrotiterstreifen-Vertiefungen gehalten werden. Nicht gebundenes CAP und enzymmarkiertes CAP werden anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt.

Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat (Harnstoffperoxid) und Chromogen (Tetramethylbenzidin). Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das farblose Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur CAP-Konzentration in der Probe bzw. im Standard. [95] [96]

2.5.2. Probenvorbereitung

2 g Honig ($\pm 0,05$ g) werden in ein 12 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 4 mL Reinstwasser versetzt. Das Röhrchen wird verschlossen und geschüttelt bis sich der Honig gelöst hat. Danach gibt man 4 mL Ethylacetat hinzu und extrahiert für 10 min auf dem Schüttler. Zur Phasentrennung wird die Lösung 10 min bei $8\,500\text{ min}^{-1}$ ($10015 \times g$) und Raumtemperatur zentrifugiert. Von der oberen organischen Phase wird 1 mL (entspricht 0,5 g Honig) in ein Reaktionsgefäß überführt. Mit Hilfe des Konzentrators wird die Probe bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Trockene eingeengt (hierbei ist zu beachten, dass der Rückstand absolut trocken sein muss, da Lösungsmittelreste den ELISA Test stören können). Der Rückstand wird in 0,5 mL Probenverdünnungspuffer (Puffer 1 aus Ridascreen[®] ELISA-Chloramphenicol-Test-Kit) unter Anwendung von Ultraschall aufgenommen.

2.5.3. Test-Durchführung

Mit der gemäß 2.5.2 erhaltenen Lösung wird wie folgt weiter verfahren:

50 μL Standardlösung bzw. vorbereitete Probelösung werden in die entsprechenden Kavitäten pipettiert. Man gibt 50 μL Enzymkonjugat-Lösung und 50 μL Antikörperlösung hinzu, mischt vorsichtig manuell und inkubiert 2 h bei Raumtemperatur ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$).

Anschließend leert man die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit und entfernt die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen auf saugfähigen Labortüchern.

Die Kavitäten werden drei mal mit jeweils 250 μL destilliertem Wasser gewaschen.

Je 50 μL Substrat und 50 μL Chromogen werden in die entsprechenden Kavitäten pipettiert, vorsichtig manuell gemischt und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Danach gibt man in jede Kavität 100 μL Stopp-Reagenz hinzu und misst die Extinktion innerhalb von 60 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes.

Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen Luft.

2.5.4. Plattenbelegung

Es werden pro Test zwei mal sechs Standards (Standard-Konzentrationen: 0 ppt, 500 ppt, 1500 ppt, 4500 ppt, 13500 ppt, 40500 ppt), sowie neben den Proben ein Blindwert (ohne Honig-Einwaage), ein Honig ohne Chloramphenicol-Gehalt (Referenzprobe) und ein mit 0,3 µg/kg CAP dotierter Honig mit gemessen.

Die Standards werden grundsätzlich in die Reihen 1 und 2, Position A bis F pipettiert und der Blindwert sowie die Referenz- und die 0,3 ppb Probe am Plattenanfang sowie am –ende aufgetragen.

2.5.5. Messung

Die Messung erfolgt mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Photometers „expert96“ bei einer Wellenlänge von 450 nm.

2.5.6. Auswertung

Die Auswertung erfolgt über die von der Firma r-Biopharm mitgelieferte Software „Ridasoft Win® Version 1.34, © 1999“.

Prinzip:

Die Mittelwerte der erhaltenen Extinktionswerte der Standards bzw. der Proben teilt man durch den Extinktionswert des ersten Standards (Nullstandard) und multipliziert mit 100.

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = \% \text{ Extinktion}$$

Die errechneten Werte für die Standards werden in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Chloramphenicol-Konzentration in [ng/kg] aufgetragen. Die Eichkurve sollte im Bereich von 50 -1350 ng/kg annähernd linear sein.

Die der Extinktion der jeweiligen Proben entsprechende Chloramphenicol-Konzentration in ng/kg wird aus der Eichkurve abgelesen.

Für jede Charge sind die vom Hersteller angegebenen Schwankungsbreiten für die 50 %-Dosis zu beachten und einzuhalten.

Von den mittels Ridasoft Win® berechneten Werten wird ein Blindwert in der Höhe von 0,05 µg/kg (Berücksichtigung der Eigenextinktion der verwendeten Chemikalien) abgezogen.

Sollte der berechnete Gehalt an Chloramphenicol dann größer 0,09 µg/kg Honig sein, wird die Probe mittels LC-MS auf den CAP-Gehalt untersucht.

2.6. Migration von CAP

2.6.1. Prinzip

Um eine mögliche Migration von Chloramphenicol aus dem Wachs in den Honig nachzuweisen, wurde ein nachweislich keine Chloramphenicol-Rückstände enthaltender Honig mit einem mit CAP kontaminierten Wachs versetzt.

Diese Mischung wurde über mehrere Wochen bei 37°C inkubiert, um die im Bienenstock herrschenden Bedingungen nachzuempfinden (Stocktemperatur 36 -37° C).

2.6.2. Durchführung

3,5 g des mit 1,5 µg/kg CAP belasteten Wachses (zuvor mittels LC-MS/MS-Messung ermittelt) werden in einem schmalen Gefäß mit 30 g eines nachweislich nicht kontaminiertem Honig versetzt. Es ist darauf zu achten, dass das Wachs vollständig vom Honig umschlossen ist. Das Gefäß wird verschlossen und bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Parallel dazu setzt man einen zweiten Versuch mit gleicher Einwaage an, nur dass dieser Ansatz bei Raumtemperatur gelagert wird. In regelmäßigen wöchentlichen Abständen werden Proben des Honigs nach Abtrennung des Wachses und gründlicher Homogenisierung des Honigs untersucht.

2.7. Geräte und Software

Autosampler	ThermoFinnigan Surveyor
LC-Pumpe (LC-MS)	ThermoFinnigan Surveyor
LC-Pumpe (LC-MS/MS)	ThermoFinnigan Surveyor
Single Quadropol Massenspektrometer	ThermoFinnigan Surveyor MSQ
Triple Quadrupole Massenspektrometer (1)	Finnigan TSQ Quantum Discovery
Triple Quadrupole Massenspektrometer (2)	Finnigan TSQ Quantum Discovery MAX
Software	ThermoFinnigan Xcalibur
Probenvorbereitungseinheit zur online-Festphasenextraktion	APPLICA SP2000
Trennsäule (LC-MS)	Prontosil 120-5 C18 ace-EPS, 250 x 3 mm
Trennsäule (LC-MS/MS)	Thermo BDS Hypersil C18 125 x 2,1 mm ID; 5 µm 125 x 2.1 mm
Präzisionswaage	Mettler Toledo AG 245
Laborzentrifugen	Heraeus biofuge pico Heraeus biofuge primo
Schüttler	IKA VIBRAX-VXR
Konzentrator	Barkey TCS-Trockentemperiersystem
Vakuum-Konzentrator	Eppendorf Concentrator 5301

ELISA-Platten Reader	Asys Hitech expert 96
Software	Ridasoft Win [®] Version 1.34, © 1999“
Mikroskop	Olympus CX41

2.8. Chemikalien und Hilfsmittel

Chloramphenicol-d ₅	Cambridge Isotope Labor., Inc., FSD-079-100
Chloramphenicol	Dr. Ehrenstorfer GmbH, C11120000
Methanol, HPLC Gradient Grade	J. T. Baker, 8402
Reinstwasser	Barnstead Reinstwassersystem, NANOpure Diamond
Ethylacetat	J. T. Baker, 9282
Natriumchlorid	Riedel-deHäen, 1356
n-Hexan	J. T. Baker, 9262
Chloroform	J. T. Baker, 175
Ammoniaklösung 25 %, p.a.	Merck, 1.05432.1000
Kaliumhexacyanoferrat (II) Trihydrat	Fluka 71638
Zinkacetat Dihydrat	Fluka 60290
Ammoniumacetat	Riedel-deHäen, 32301
Patulin Säule	MycoSep Patulin, Romer Labs, Code: 1004015
1,2-Amino Festphasenkartuschen	Bakerbond spe [™] Amino(NH ₂) Disposable Extraction Columns 7088-03
RP18- Material	J.T.Baker Bakerbond [®] Octadecyl C(18) 40 µm Prep LC Packing 7025-00
ELISA-CAP-Test-Kit	RIDASCREEN [®] Chloramphenicol-Test
Mikrofilter	Teknokroma Reg. Cellulose 0,45µm 13 mm Ø PK/100, TR-200435
Faltenfilter (Qual.) 3 hw	Sartorius
Zentrifugenröhrchen (12 mL)	
Autosampler-Gefäße (750 µL)	
Autosampler-Gefäße (1,8 mL)	

Übliche Laborglasgeräte: Eluentengefäße, Messkolben, Bechergläser, etc.

2.9. Reagenzien

4 %ige NaCl-Lösung	4 g NaCl in 100 mL Reinstwasser lösen
0,5 %ige Ammoniaklösung	1 mL 25 %ige Ammoniak-Lösung mit 49 mL Reinstwasser/Methanol (v/v 90/10) versetzen
Carrez I-Lösung	In einen 100 mL Messkolben 15 g Kaliumhexacyanoferrat(II) $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ einwiegen und mit Reinstwasser bis zur Marke auffüllen
Carrez II-Lösung	In einem 100 mL Messkolben 30 g Zinkacetat $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ einwiegen und mit Reinstwasser bis zur Marke auffüllen
5 M Ammoniumacetat-Lösung	78,7 g Ammoniumacetat (98 %ig) mit Reinstwasser auf 200 mL auffüllen

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Bestimmung von CAP mittels online SPE-LC-MS (Single Quadrupole)

(vergl. Methode 2.1)

3.1.1. Aufarbeitung

Ziel für die Entwicklung der Methode war eine einfach durchführbare, schnelle und kostengünstige, d.h. eine mit wenig Personalaufwand und geringem Lösungsmittelverbrauch auskommende Aufarbeitung. Gleichzeitig sollten aber eventuelle Probenverluste auf das mögliche Minimum reduziert werden und ein Höchstmaß an Reproduzierbarkeit erreicht werden.

Aufgrund der Verwendung eines Single Quadrupole-Massenspektrometers muss die störende Matrix möglichst vollständig entfernt werden. Ein in die Ionenquelle gelangender LC-Peak wird mit allen enthaltenen Komponenten (Analyten, Eluenten, Matrix, Säulenbluten, etc.) ionisiert. Aus dem entstehenden Ionen-Gemisch wird das Ion eines bestimmten m/z -Wertes selektiert. Die Herkunft dieses Ions kann aus unterschiedlichen Molekülen herrühren und auch bei unterschiedlicher Summenformel zum gleichen nominalen m/z -Wert führen. Daher sind bei der SIM-Analytik möglichst reine Extrakte zu analysieren, da sonst falsch-positive Signale auftreten. Bei der Tandem-Massenspektrometrie hingegen wird im ersten Schritt das Ion des zu analysierenden Rückstandes von einem Großteil der Probenmatrix abgetrennt. Dieser Schritt, der auch als massenspezifischer „Clean-up“ gewertet werden kann, ist bei der Detektion mittels eines Single Quadrupole-Massenspektrometers nicht möglich [40]. Daher ist eine intensivere Aufarbeitung nötig. Um möglichst geringen manuellen Aufwand zu haben, war eine Festphasenextraktion unter Verwendung der online-Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP 2000 angestrebt.

Die Aufarbeitung erfolgt miniaturisiert mit kleiner Einwaage und Harmonisierung der Probenvorbereitung, d.h. dass die Aufarbeitungsschritte für die verschiedenen Bienenprodukte zu einem großem Teil identisch ablaufen. Für die einzelnen Bienenprodukte unterscheidet sich die Aufarbeitung im ersten Schritt nur in der Einwaage und der Verwendung des Extraktionsmittels. Die Extraktion erfolgt auf einem Schüttler, der aufgrund der geringen Einwaage und des kleinen Extraktionsvolumens 36 Proben gleichzeitig fassen kann. Nach dem Zentrifugieren wird ein Aliquot des Extraktes in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und im Concentrator bei 60 °C zur Trockene eingengt (Dauer ca. 20 min). Dabei können 48 Proben gleichzeitig konzentriert werden. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und in Autosampler-Vials überführt. Die weitere Aufreinigung erfolgt mittels online-SPE über RP18-Material.

Aufgrund der Miniaturisierung der Aufarbeitung können 48 Proben gleichzeitig aufgearbeitet werden. Der limitierende Faktor ist hierbei der Concentrator, der 48 Reaktionsgefäße fasst. Eine Person ist in der Lage zweimal die Aufarbeitung von gleichzeitig 48 Proben an einem Tag durchzuführen. Daher können täglich insgesamt 96 Proben für die Analyse auf Chloramphenicol von einer Person vorbereitet werden. Mittels LC-MS können aufgrund der Analysendauer von 40 min in 24 h 36 Proben

pro LC-MS-Anlage gemessen werden. Somit kann auch die Bestückung der Anlage für die Analyse über das Wochenende durch eine Person erfolgen.

Die einzelnen Parameter, die für die Aufarbeitung von Bedeutung sind, werden in den folgenden Ausführungen für Honig und Gelée Royale erläutert. Die Aufarbeitung der anderen Bienenprodukte wird in diese Erläuterungen nicht mit einbezogen, da sich deren Aufreinigung größtenteils an die des Honigs und des Gelée Royales anlehnt.

3.1.1.1. Einwaage

Um eine vollständige Extraktion des Analyten mit gleichzeitiger geringer Extraktion von Matrixbestandteilen zu erreichen, ist es sinnvoll, eine kleinere Einwaage zu wählen. Dabei darf die einzuwiegende Menge nicht zu klein sein, da der prozentuale Fehler beim Einwiegen mit kleinerer Einwaage ansteigt. Außerdem ist zu beachten, dass die Einwaage nicht so klein gewählt wird, dass die durch die gesetzlichen Regelungen geforderte Bestimmungsgrenze nicht mehr erreicht wird.

Honig

Bei Honig führt eine Reduktion der Einwaage von 1 g auf 0,5 g zu keiner Verbesserung der Extraktion.

Gelée Royale

Eine Reduktion der Einwaage hat auf die Extraktion von CAP aus Gelée Royale starke Auswirkung. Eine Halbierung der Einwaage von 1 g auf 0,5 g bei gleichzeitiger Beibehaltung der anderen Aufarbeitungsbedingungen führt zu fast einer Verdoppelung der Wiederfindungsrate. Eine erneute Reduktion der Einwaage auf 0,2 g kann die Wiederfindung hingegen nicht weiter verbessern. Dies veranschaulichen die Abbildungen 3-1 bis 3-3: Dasselbe Gelée Royale wurde dreimal mit verschiedenen Einwaagen 1,0, 0,5 und 0,2 g aufgearbeitet. Für die Massenspur 321 ergab sich für den CAP-Peak eine Fläche von 172842 für eine Einwaage von 1,0 g. Für eine Einwaage von 0,5 g erhält man eine Fläche von 134279. Dies entspricht einer Verbesserung der Extraktion um 78 %. Die Extraktion kann bei einer Einwaage von 0,2 g mit 42534 Flächeneinheiten FE nicht weiter verbessert werden.

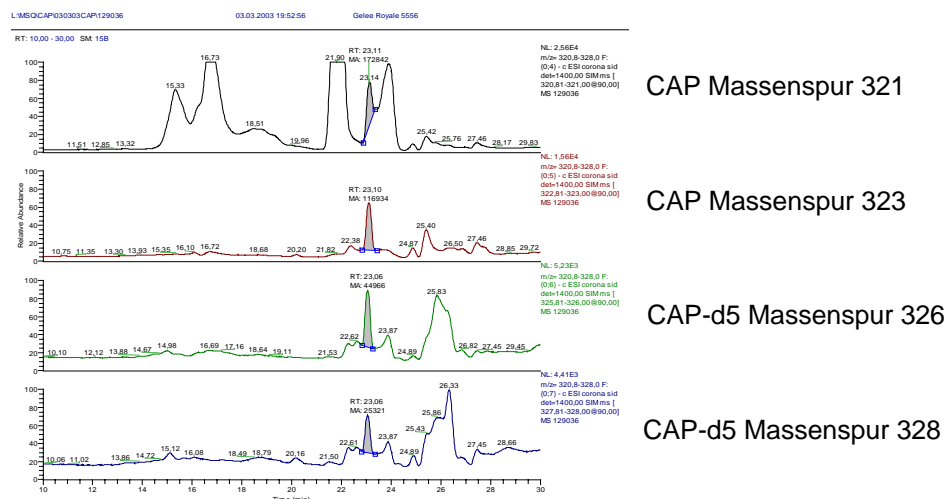


Abb. 3-1. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten Gelée Royales, Einwaage 1,0 g

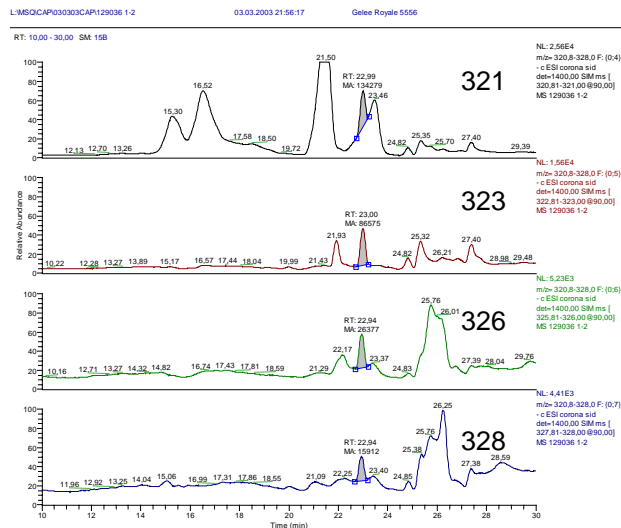


Abb. 3-2. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten Gelée Royales, Einwaage 0,5 g

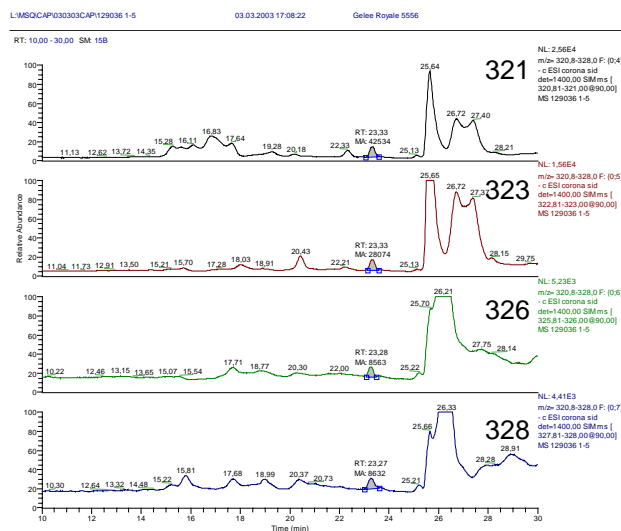


Abb. 3-3. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten Gelée Royales, Einwaage 0,2 g

3.1.1.2. Extraktionsmittel

A. Prinzip der Flüssig-Flüssig Extraktion

Die Überführung einer Substanz aus einer Phase, in der sie gelöst oder suspendiert ist, in eine andere flüssige Phase wird Extraktion genannt. Eine Überführung ist möglich, weil sich der Stoff in einem bestimmten Verhältnis auf die beiden Phasen verteilt. Das Verhältnis wird durch die Löslichkeit des Stoffes in der jeweiligen Phase gebildet. Diese Verteilung eines gelösten Stoffes wird durch den NERNST'schen Verteilungssatz bestimmt:

$$\frac{C_A}{C_B} = K$$

Dabei bedeutet C die Konzentration in den Phasen A und B. Die Gleichgewichtskonstante K, der Verteilungskoeffizient, ist abhängig von der Temperatur. Die Extraktion eines Stoffes ist demzufolge dann leicht möglich, wenn er

im Extraktionsmittel viel leichter löslich ist als in der anderen Phase, der Verteilungskoeffizient also einen von 1 stark abweichenden Wert hat [98][101].

B. Wahl des Extraktionsmittels

Die Wahl des Extraktionsmittels bei der Flüssig-flüssig-Extraktion hat starken Einfluss auf die Wiederfindung. Im Idealfall geht nur der Analyt in die organische Phase über, während die restliche Matrix in der zu verwerfenden wässrigen Phase verbleibt. Aufgrund der polaren Eigenschaften des Chloramphenicols wurden für die Extraktion die folgenden Lösungsmittel getestet: Methanol, Aceton (siehe Abb. 3-5, 3-6, 3-8 und 3-9), Ethanol, Dichlormethan und Acetonitril. Die vollständigste Extraktion und den reinsten Extrakt erhält man für Honig mit Ethylacetat und für Gelée Royale mit Chloroform (siehe Abb. 3-4 und 3-7). Acetonitril kann für alle Bienenprodukte verwendet werden. Allerdings ist die Extraktion nicht so gut wie mit den für die Routine gewählten Lösungsmitteln, was sich in schlechteren Wiederfindungen widerspiegelt.

Honig

Für Honig hat sich Ethylacetat als Extraktionsmittel als geeignet erwiesen (siehe Abb. 3-4). Im Gegensatz zu Gelée Royale verbessert ein vorheriges Lösen der Probe in 4 %iger NaCl-Lösung die Extraktion.

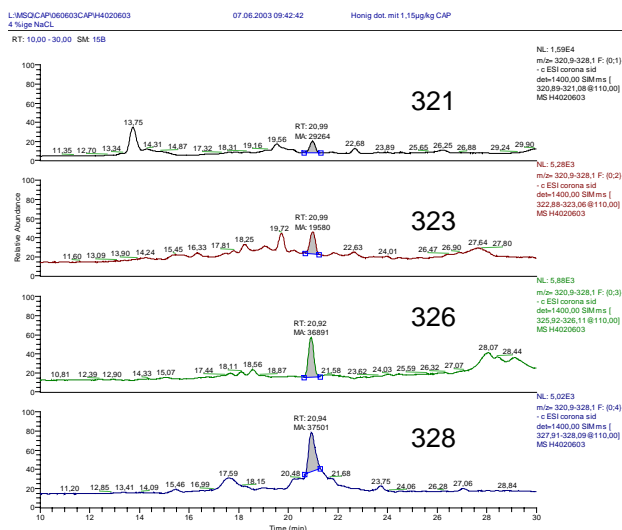


Abb. 3-4. Chromatogramm eines mit 1,15 µg/kg CAP dotierten Honigs, der mit Ethylacetat gemäß der unter 2.1.5.1. beschriebenen Aufarbeitung extrahiert wurde

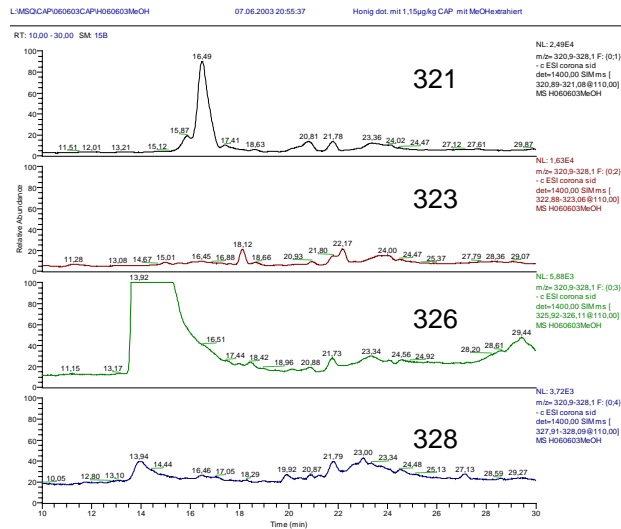


Abb. 3-5. Chromatogramm eines mit 1,15 µg/kg CAP dotierten Honigs, der ohne vorheriges Lösen in NaCl-Lösung mit Methanol extrahiert wurde

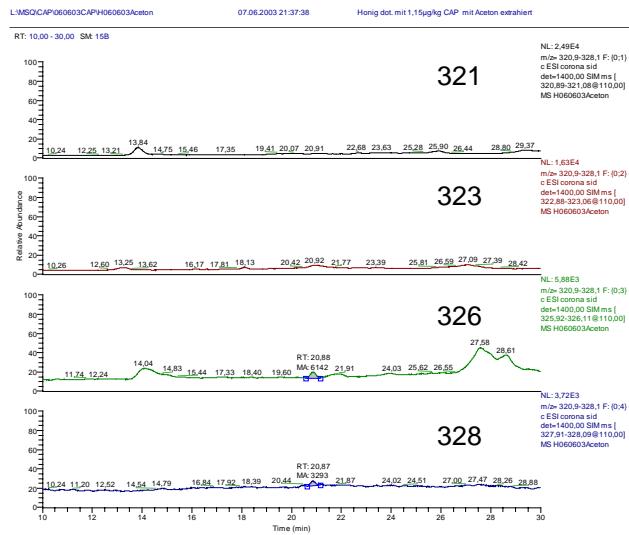


Abb. 3-6. Chromatogramm eines mit 1,15 µg/kg CAP dotierten Honigs, der unter Austausch des Ethylacetats gegen Aceton gemäß der unter 2.1.5.1. beschriebenen Aufarbeitung vorbereitet wurde

Gelée Royale

Für Gelée Royale liefert die Extraktion mit Chloroform ohne vorheriges Lösen das beste Ergebnis (siehe Abb. 3-7). Ein vorheriges Lösen der Probe in NaCl-Lösung verschlechtert die Wiederfindung.

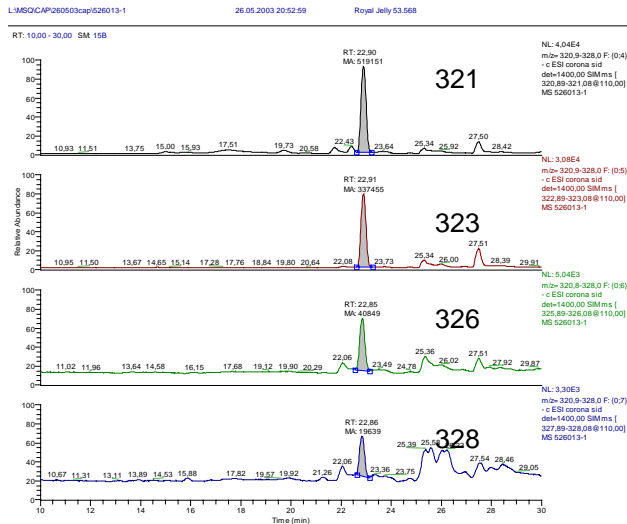


Abb. 3-7. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.1.5.2. beschriebenen Aufarbeitung mit Chloroform extrahiert wurde

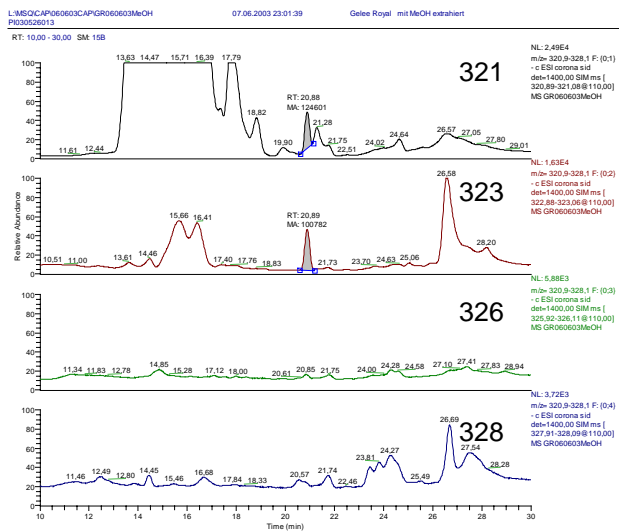


Abb. 3-8. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.1.5.2. beschriebenen Aufarbeitung unter Austausch des Chloroforms gegen Methanol extrahiert wurde.

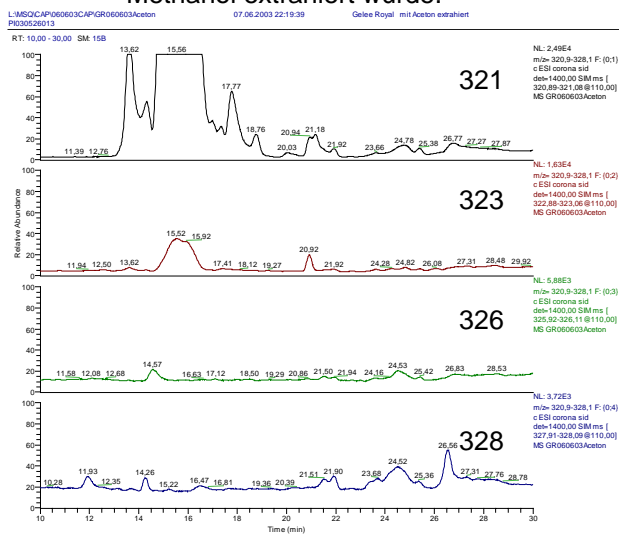


Abb. 3-9. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.1.5.2. beschriebenen Aufarbeitung unter Austausch des Chloroforms gegen Aceton extrahiert wurde

C. Mehrmaliges Extrahieren

Beim einfachen einmaligen Ausschütteln kann im günstigsten Fall einer vollständigen Gleichgewichtseinstellung jeweils nur die durch den Nernstschen Verteilungssatz und die angewandte Menge Extraktionsmittel festgelegte Anteil des zu extrahierenden Stoffes in das Extraktionsmittel übergehen. Aus diesem Grunde muss man im allgemeinen wiederholt ausschütteln [101]. Chloramphenicol ist in Wasser schlecht löslich, dagegen in Ethylacetat und Chloroform sehr gut löslich [99].

Honig und Gelée Royale

Das mehrmalige Ausschütteln mit kleineren Mengen Ethylacetat bzw. Chloroform führt zu keiner signifikanten Verbesserung der Wiederfindung. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das CAP schon beim ersten Ausschütteln weitestgehend in die organische Phase übergeht. Daher wurde mit einer einmaligen Extraktion mittels einer größeren Menge Lösungsmittel gearbeitet.

D. pH-Wert

Der pH-Wert spielt bei der Flüssig-flüssig-Extraktion eine entscheidende Rolle. So sind undissoziierte Moleküle eines Analyten in unpolaren organischen Lösungsmitteln löslich. Daher kann die Alkalisierung einer wässrigen Lösung eines basischen Analyten aufgrund der Unterdrückung der Ionisation den Übergang in die organische unpolare Phase erleichtern.

Honig

Die Erhöhung oder Erniedrigung des pH-Werts der wässrigen Honiglösung hat eine Verschlechterung der Extraktion des Chloramphenicols zur Folge (Vergleich Abb. 3-4 mit Abb. 3-10 und 3-11).

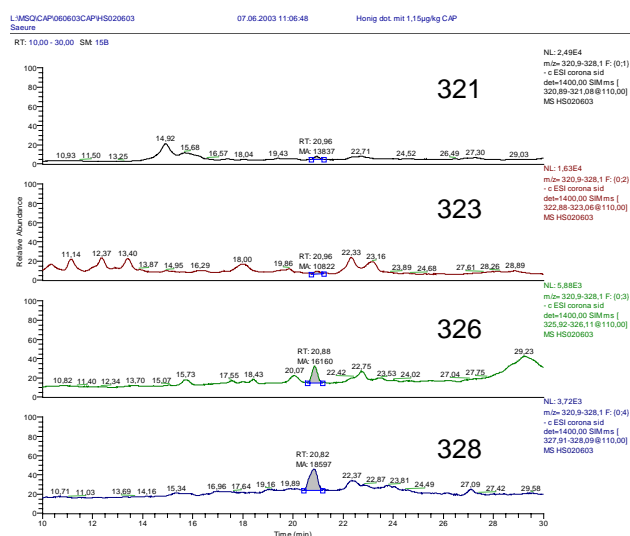


Abb. 3-10. Chromatogramm eines mit 1,15 µg/kg CAP dotierten Honigs, der mit Ethylacetat gemäß der unter 2.1.5.1. beschriebenen Aufarbeitung extrahiert wurde, nachdem die wässrige Lösung mit 100 µL 85 %iger Phosphorsäure angesäuert worden war

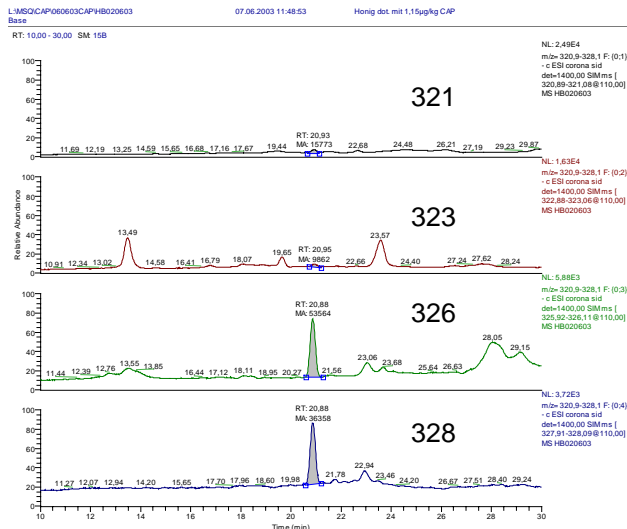


Abb. 3-11. Chromatogramm eines mit 1,15 µg/kg CAP dotierten Honigs, der mit Ethylacetat gemäß der unter 2.1.5.1. beschriebenen Aufarbeitung extrahiert wurde, nachdem der pH-Wert der wässrigen Lösung mit 100 µL 40 %iger Natriumhydroxid-Lösung erhöht worden war

Gelée Royale

Da das vorherige Lösen in 4 %iger NaCl-Lösung zu einer Verschlechterung der Extraktion und somit zu einer verschlechterten Wiederfindung führt, ist eine pH-Wert-Einstellung wenig sinnvoll.

Zur direkten Einstellung des pH-Wertes des gelartigen Gelée Royales stand kein geeignetes pH-Meter zur Verfügung.

3.1.1.3. Carrez-Fällung

Durch die Zugabe von Carrez I und II-Lösung wird vorhandenes Protein gefällt. Diese zwei Reagenzien bilden einen weißen voluminösen Niederschlag, der vorhandene Proteinmoleküle mitreisst. Sowohl Honig (siehe 1.1.7) als auch Gelée Royale (siehe 1.2.3) enthalten Proteine, die die Extraktion stören können.

Honig

Die Carrez-Klärung der wässrigen Lösung führt zu keiner Veränderung der Wiederfindung, vermindert jedoch auch nicht das Grundrauschen und die Matrixstörungen. Daher wird in der endgültigen Aufarbeitung auf diesen Schritt verzichtet.

Gelée Royale

Der Versuch, das Gelée Royale zu lösen und anschließend eine Carrez-Klärung durchzuführen, führt zu einer schlechteren Wiederfindung als mit der direkten Extraktion mit Chloroform ohne vorheriges Lösen; insbesondere für den internen Standard CAP-d5 (Vergleich Abb. 3-7 mit 3-12).

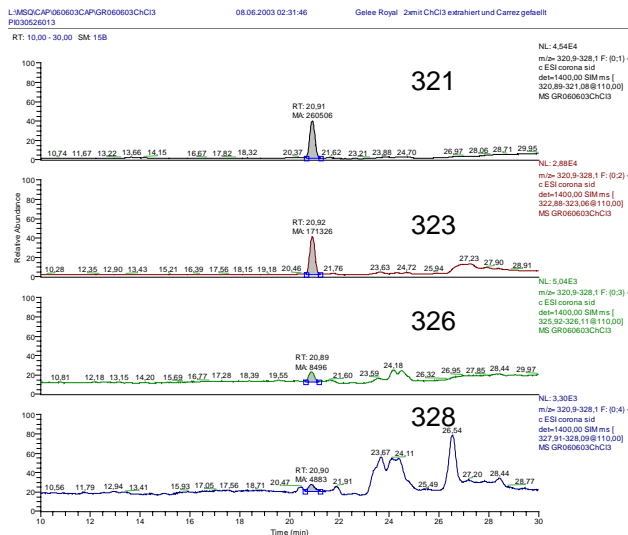


Abb. 3-12. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.1.5.2. beschriebenen Aufarbeitung nach vorherigem Lösen in 4 %iger NaCl-Lösung und anschließender Carrez-Klärung vorbereitet wurde

Daher wurde sowohl für Honig als auch für Gelée Royale bei der endgültigen Aufarbeitung auf eine Carrez-Fällung verzichtet

3.1.1.4. Entfettung mit Hexan

Gelée Royale

Wie unter 1.2.3. beschrieben, enthält Gelée Royale 4 - 8 % Fett.

Zur Entfettung der nach der Aufarbeitung des Gelée Royales erhaltenen wässrigen Lösung wird diese mit 0,5 mL Hexan versetzt, gut durchmischt und anschließend zentrifugiert. Die untere wässrige Phase wird zur Analyse eingesetzt und die Hexan-Phase verworfen. Hexan kann zur Entfettung genutzt werden, da sich Chloramphenicol in unpolaren Lösungsmitteln nicht löst und daher keine Analytverluste zu erwarten sind. In der Literatur wird Hexan in der CAP-Analytik häufig zur Entfettung fetthaltiger Lebensmittel (z. B. Fleisch) genutzt [85]. Da die Entfettung nach der erfolgten Aufarbeitung zwar keinen Einfluss auf die Wiederfindung hat, aber auch keine Chromatogramme mit weniger Matrixstörungen ergibt, wurde auf eine Entfettung mit Hexan verzichtet.

3.1.2. online-SPE-LC-MS

Die SPE (Solid Phase Extraction) ist eine geeignete Methode zur Reduktion oder Eliminierung von Interferenzen und Matrixeinflüssen.

3.1.2.1. Prinzip der Festphasenextraktion (SPE)

Der Analyt wird aufkonzentriert, indem eine größere gelöste Probenmenge über eine Festphase gegeben wird. Dabei wird der Analyt retardiert, während Matrixbestandteile nicht zurückgehalten und durch einen zusätzlichen Waschschritt heruntergewaschen werden. Der so fixierte und gereinigte Analyt wird mit einem möglichst kleinen Volumen Lösungsmittel wieder von der Festphase gelöst. Durch diese Aufkonzentrierung und Reinigung wird eine Steigerung der Empfindlichkeit erzielt.

Es gibt mehrere Möglichkeiten zur Durchführung der Festphasenextraktion. Zum einen kann die Festphasenextraktion manuell erfolgen, andererseits gibt es auch verschiedene Techniken, die diesen Teil automatisiert durchführen.

Bei der manuellen Festphasenextraktion wird im ersten Schritt die den Analyten enthaltende Lösung über käuflich zu erwerbende Festphasen-Kartuschen mit Hilfe von Anlegen eines Unterdruckes gesaugt (siehe Abb. 3-13). Die Kartuschen sind je nach Analyt mit unterschiedlichen Festphasenmaterialien gefüllt. Beim Durchsaugen der Probelösung ist zu beachten, dass eine bestimmte konstante Geschwindigkeit, die sog. Tropfgeschwindigkeit, eingehalten wird. Das Aufbringen des Analyten darf nicht zu schnell geschehen, damit der Analyt komplett zurückgehalten wird.

Als nächster Schritt erfolgt das Waschen. Für das Waschen ist eine Lösung zu wählen, die Matrixbestandteile weitestgehend entfernt, ohne den Analyten von der Phase zu lösen.

Zum Eluieren des Analyten ist ebenfalls eine bestimmte Tropfgeschwindigkeit einzuhalten. Die Elution darf nicht zu schnell erfolgen, damit der Analyt komplett von der Phase gelöst werden kann. Im Idealfall wählt man für die Elution des Analyten eine Lösung, mit der sich nur der Analyt von der Phase abtrennen lässt und der Rest der Matrix zurückgehalten wird.

Bei der manuellen Festphasenextraktion werden die gesamten Schritte von Hand durchgeführt. Bei der Automatisierung dieser Probenvorbereitung werden die oben beschriebenen Schritte mit Hilfe von Greifarmen oder ähnlichem automatisch abgearbeitet.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine automatische online-Festphasenextraktion gewählt. Die online-Festphasenextraktion mit Hilfe der Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP2000 funktioniert zwar nach demselben Prinzip, die Durchführung weicht aber in einigen Punkten von der oben beschriebenen Vorgehensweise ab (zur Funktionsweise der online-SPE siehe 2.1.1):

- Bei der online-SPE verwendet man nur ein Kartusche, die vor jeder weiteren Aufarbeitung rekonditioniert und nicht ausgetauscht wird. Somit werden alle Proben und Standards über dieselbe Kartusche aufgereinigt. Bei der manuellen Variante der SPE werden zwei verschiedene Kartuschen verwendet, die sich untereinander unterscheiden und sich somit auf Probenverluste bei Standard und Probe unterschiedlich auswirken können.
- Des Weiteren enthält die Kartusche ungefähr ein Zehntel der Füllung der Kartuschen für die manuelle Festphasenextraktion. Deshalb wird eine viel kleinere Menge Probelösung (< 1 mL) auf die Kartusche aufgebracht.
- Das Aufbringen der Probe, das Waschen und das Eluieren erfolgen nicht durch Anlegen eines Vakuums, sondern durch Druck. Statt Einstellen einer konstanten Tropfgeschwindigkeit werden die Lösungen mit einem konstanten Fluss über die Kartusche gepumpt.
- Das Eluieren des Analyten geschieht nicht, wie bei der manuellen SPE, in derselben Richtung wie das Aufbringen, sondern entgegengesetzt (Backflush-Verfahren). Dadurch erreicht man, dass der Analyt schneller und kompakter auf die HPLC-Säule gelangt, was sich positiv auf die Chromatographie auswirkt, da man schärfere Signale erhält.

3.1.2.2. Vorteile der verwendeten online-Technik im Vergleich mit der manuellen Festphasenextraktion



Abb. 3-13. manuelle Festphasenextraktion



Abb. 3-14. online-Festphasenextraktion

manuelle Festphasenextraktion	online-Festphasenextraktion
Bei der manuellen SPE sind sowohl der Lösungsmittelverbrauch als auch der Zeit- und Personalaufwand hoch.	Die SPE mittels der online-Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP 2000 erfolgt hingegen während der Konditionierung der HPLC-Säule. Es ist also kein zeitintensiver Extra-Arbeitsschritt nötig.
Aufgrund des Arbeitens mit größeren Mengen Festphasenmaterial und der manuellen Durchführung, die der Miniaturisierung Grenzen setzt, hat man bei der manuellen SPE einen größeren Verbrauch an Lösungsmittel.	Bei der online Variante wird der Analyt mit einem Fluss von 0,4 mL/min innerhalb von einigen Minuten auf die Kartusche gebracht, retardiert und mit Hilfe der Eluenten auf die Trennsäule überführt. Daher ist der Lösungsmittelverbrauch sehr gering.
Die manuelle Festphasenextraktion ist sehr personalintensiv, wenn sie mit einer Apparatur wie in Abb. 3-13 dargestellt durchgeführt wird. Die Apparatur bietet die Möglichkeit einer SPE für zwölf Proben gleichzeitig, jedoch muss der gesamte Prozess des Konditionierens, Aufbringens der Probe, Waschens und Eluierens von einer Person überwacht werden, damit die Tropfgeschwindigkeiten eingehalten werden und die Säule nicht trocken läuft.	Hingegen läuft die SPE mittels der Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP2000 komplett automatisch ab. Personal wird nur zum Neubefüllen der Kartusche, zum Nachfüllen der Lösungsmittel, zum Programmieren oder bei anfallenden Servicearbeiten benötigt. Mit einer Kartuschenfüllung können mehrere hundert Analysen durchgeführt werden, Eluenten werden je nach Größe der Vorratsbehälter alle 2 bis 3 Tage nachgefüllt, und die anderen Arbeiten müssen nicht regelmäßig durchgeführt werden. Daher ist die online-SPE nicht sehr personalintensiv.
Die manuelle Festphasenextraktion kann nur während der Arbeitszeit durchgeführt werden, da der gesamte Prozess von einer Person überwacht und durchgeführt werden muss.	Die online-SPE kann im 24h-Betrieb verwendet werden, da alle Prozesse automatisch ablaufen und gesteuert werden.
Die Reproduzierbarkeit der manuellen SPE hängt von mehreren Faktoren ab, z. B. von der durchführenden Person, der eingestellten Tropfgeschwindigkeit bei der Aufgabe und der Elution des Analyten und der Dichte und Art des Festphasenmaterials der Kartusche.	Diese Faktoren entfallen bei der Automatisierung durch die online-SPE. Alle Proben und Standards werden gleich behandelt, indem sie mit einem konstanten von der Pumpe der Probenvorbereitungseinheit geregelten Fluss auf die Kartusche aufgebracht werden und der Analyt anschließend mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit mittels der LC-Pumpe eluiert wird. Alle Proben und Standards werden über dieselbe Kartusche aufgereinigt, so dass sich die Packung der Festphase auf Probe und Standard gleichermaßen auswirkt. Die Automatisierung mittels der online-SPE hat eine Erhöhung der Reproduzierbarkeit gegenüber der manuellen Festphasenextraktion zur Folge.

Tab. 3-1a. Vergleich der manuellen Festphasenextraktion mit der online-SPE

Diese Vorteile lassen sich anhand eines Rechenbeispiels veranschaulichen:

Der Lösungsmittel- und Materialverbrauch sowie der Personalaufwand werden auf die Vorbereitung von 100 Proben mittels manueller Festphasenextraktion und online-SPE bezogen.

	manuelle Festphasenextraktion	online- Festphasenextraktion
Lösungsmittelverbrauch (Methanol)	Konditionierung: 5 mL Eluieren: 1 mL pro Probe: 6 mL 100 Proben: 600mL	Transfer: 4 min Waschen: 8 min Fluss: 0,4 mL/min pro Probe: 4,8 mL 100 Proben: 480 mL
Materialverbrauch	eine SPE-Kartusche (entsprechend 500 mg SPE-Material) pro Probe 100 Proben: 100 SPE-Kartuschen (entsprechend 50 g SPE-Material)	pro SPE-Kartusche: ca. 6 Füllungen der online-SPE- Kartusche (entsprechend ca. 85 mg SPE-Material pro Füllung) pro online-SPE-Kartusche: ca. 50 Proben 100 Proben: 1/3 SPE-Kartusche (entsprechend ca. 170 mg SPE-Material)
Personalbedarf	12 Proben pro Bestückung der Apparatur zur manuellen Festphasenextraktion. Zeitaufwand: ca. 2 h 100 Proben: ca. 16 h Eine Person benötigt für die Vorbereitung von 100 Proben ca. 16 h	Die online-SPE läuft komplett automatisch ab. Sie kann im 24h-Betrieb ohne Personalaufwand verwendet werden. Personalbedarf für Vorbereitung des APPLICA SP2000: 100 Proben: zur Vorbereitung der Kartuschen, Programmierung der Probenvorbereitungseinheit und Nachfüllen der Eluenten ca. 0,5 h

Tab. 3-1b. Vergleich der manuellen Festphasenextraktion mit der online-SPE - Rechenbeispiel

3.1.2.3. Auswahl des Festphasenmaterials

Die Auswahl des Festphasenmaterials hängt von den Eigenschaften des Analyten und der Matrix ab. Mit der Festphasenextraktion soll der zu analysierende Analyt von der restlichen Matrix abgetrennt werden. Im Idealfall wird entweder nur der zu analysierende Analyt zurückgehalten, während alle anderen Matrix-Bestandteile heruntergewaschen werden oder der Analyt wird zusammen mit der Matrix retardiert und anschließend wird nur die zu analysierende Substanz eluiert.

Des Weiteren muss eine ausreichende Menge an Festphasenmaterial vorgelegt werden. Bei zu wenig Material sind sämtliche Bindungsstellen schnell besetzt, so dass der Analyt durchbricht, was zu Verlusten führt. Die Menge an Analyten, die eine Kartusche aufnehmen kann, bezeichnet man als Kapazität.

Zusätzlich muss die Konzentration der Probenlösung berücksichtigt werden. Eine zu konzentrierte Matrix kann durch Besetzung aller Bindungsstellen zu einer Verstopfung der Kartusche führen.

Für die Festphasenextraktion von Chloramphenicol wurde C18-Material verwendet, da es relativ unpolare Substanzen sehr gut zurückhält. Allerdings ist es daher auch eines der unselektivsten Materialien, es retardiert die meisten organischen Analyten mit schwacher bis mittelschwacher Polarität aus wässrigen Lösungen. Für Honig bietet sich dieses Material jedoch an, da Honig zu einem überwiegenden Teil (mindestens 60 %) aus Zuckern besteht, die sich aufgrund ihrer starken Polarität mittels C18-Material gut vom CAP abtrennen lassen.

Des Weiteren wirkt bei der online-SPE die Kartusche wie eine kleine HPLC-Säule. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur und Polarität werden die organischen unpolaren Moleküle unterschiedlich gut vom C18-Material zurückgehalten und somit bei der Elution aufgetrennt. Daher erreichen sie die eigentliche HPLC Trennsäule schon zeitlich versetzt, was einer leichten Vortrennung entspricht. Dabei ist jedoch darauf zu achten, dass der Analyt möglichst schnell und als scharfe Bande auf die Trennsäule gelangt, damit die Signale scharf und ohne Tailing im Chromatogramm erscheinen. Ein langgestrecktes Aufbringen auf die Säule führt zu einer schlechten Trennung, daher wird als Elutionsmittel Methanol verwendet, das das CAP sehr gut vom C18-Material eluiert. Da das Material der Trennsäule prinzipiell dem Material der SPE entspricht, wird sich der Trenneffekt der Kartusche auf der Trennsäule fortsetzen, d.h. Substanzen, die verzögert von der Kartusche eluieren, werden auch von der Trennsäule später eluiert. Dieser Effekt ist mit der Verlängerung der Trennsäule gleichzusetzen.

Die Kapazität der Kartusche für CAP wurde durch die Injektion einer 3,8 µg/kg CAP und 3,3 µg/kg CAP-d5 enthaltenden Standardlösung einmal mit und einmal ohne vorgeschaltete online-SPE bestimmt. Die Konzentration des untersuchten Standards betrug mehr als das zehnfache des gesetzlich festgelegten MRPL-Wertes von CAP (0,3 µg/kg). Zusätzlich wurde der Lösung das deuterierte CAP-d5 hinzugefügt, da dieses als interner Standard ebenfalls zurückgehalten werden muss und somit Bindungsstellen des Festphasenmaterials blockiert. Bei gleichem Injektionsvolumen stimmten die Flächen der beiden Standards mit und ohne online-SPE sowohl für CAP als auch für CAP-d5 überein. Durch den Vergleich der Flächen der Standards konnte nachgewiesen werden, dass das im Standard enthaltene Chloramphenicol vollständig von der SPE-Kartusche zurückgehalten wird und die Kapazität der Kartusche für das 10-fache des interessierenden Konzentrationsbereichs bei gleichzeitiger Verwendung des internen Standards ausreichend ist.

Die Eignung des Festphasenmaterials für die Lösung der aufgearbeiteten Proben wurde über Dotierungsversuche überprüft. Dazu wurde ein nicht mit CAP

kontaminierter Honig mit dem ca. 2 bis 3-fachen und 10-fachen des interessierenden Konzentrationsbereiches für CAP (0,77 µg/kg und 3,8 µg/kg) dotiert und die Wiederfindung bestimmt. Bei einer Wiederfindung von 87,6 % und 90,2 % kann unter Berücksichtigung der Ergebnisunsicherheit der Methode von einer Eignung des C18-Materials für die Bestimmung von Chloramphenicol ausgegangen werden. Mit diesem Versuch wird nicht nur die Eignung des Festphasenmaterials für diesen Analyten überprüft, sondern auch ob sich die Matrix auf das vollständige Zurückhalten des Chloramphenicols auswirkt. Ein Besetzen zu vieler Bindungsstellen durch Matrixbestandteile würde zu einer geringeren Wiederfindung führen. Jedoch spiegelt die Wiederfindung nicht nur den Einfluss der Matrix auf die Festphasenextraktion wider. Die Wiederfindungsrate setzt sich aus allen Verlusten des Analyten während der Aufarbeitung und der Analyse zusammen.

3.1.2.4. Auswahl der Wasch- und Elutionslösung

Aufgrund der apolaren Beschaffenheit des RP18-Materials wird als Waschlösung standardmäßig Reinstwasser und als Elutionslösung Methanol verwendet. Um eine bessere Reinigungswirkung zu erzielen, wurde der Waschlösung ein geringer Anteil an Methanol (5 %) zugesetzt.

3.1.3. Chromatographie

3.1.3.1. Säule

Für die LC-Trennung wurden mehrere Säulenmaterialien und Säulenlängen getestet. Um eine optimale Trennung des Chloramphenicols von störenden Matrixbestandteilen erreichen zu können, muss eine geeignete Säule für die HPLC eingesetzt werden.

Da Chloramphenicol ein organisches, insgesamt eher unpolares jedoch mehrere polare Gruppen enthaltendes Molekül ist, wurde zuerst ein auf Kieselgel basierendes unpolares Reversed Phase C18-Material getestet.

Multospher 100 RP 18 - 5µ ist ein einfaches RP18-Material von 100 Å Porendurchmesser ohne End-capping. End-capping bedeutet, dass die Anzahl der aus sterischen Gründen nicht umgesetzten Silanolgruppen durch die Nachbehandlung mit Trimethylchlorsilan verringert wird [102]. Diese Säule ist sehr unselektiv, da sie fast alle unpolaren organischen Substanzen zurückhält. Um eine bessere Abtrennung von störenden Begleitstoffen zu erhalten, musste daher die Trennstrecke verlängert und statt einer Trennsäule mit der Dimension 125 x 3 mm eine mit 250 x 3 mm verwendet werden.

Die besten Signale für den Analyten und die effektivste Trennung des CAP-Peaks von den Matrixbestandteilen wurden nach der Chromatographie mit der Prontosil 120-5 C18 ace-EPS, 5 µm, 250 x 3 mm erhalten. Diese Säule besteht aus einer RP-Phase mit einer eingebundenen polaren Gruppe in der hydrophoben C18-Kette und hat eine Porendurchmesser von 120 Å. Als Unterschied zur normalen Umkehrphase wie sie für die Multospher 100 RP 18 - 5µ verwendet wird, bietet die Prontosil 120-5 C18 ace-EPS erweiterte polare Selektivität, d.h. im Vergleich zu einer klassischen C18-Phase werden hier basische Substanzen früher und saure Substanzen später von der Trennsäule eluiert. Es findet somit eine Trennung nicht nur aufgrund unterschiedlicher Hydrophobität, sondern auch aufgrund polarer Eigenschaften statt. Da Chloramphenicol mehrere Heteroatome enthält, besitzt es somit auch polare

Eigenschaften, die sich positiv auf die Trennung mittels der ProntoSil 120-5 C18 ace-EPS auswirken.

3.1.3.2. Eluenten

Für die HPLC spielt ebenso wie die Säule der richtige Eluent bzw. die richtige Eluenten-Kombination eine große Rolle für eine optimale Trennung.

In der Reversed-Phase-Chromatographie verwendet man als mobile Phase meistens Gemische von Wasser oder wässrigen Pufferlösungen mit verschiedenen, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln. Die Auswahl der Lösungsmittel ist durch die Bedingung, dass sie mit Wasser mischbar sein müssen, stark eingeschränkt. Methanol und Acetonitril sind die gängigsten Lösungsmittel in der Reversed-Phase-Chromatographie. Acetonitril hat eine geringere Polarität als Methanol und zeichnet sich somit durch eine stärkere Elutionskraft aus [102].

Für die Analyse von Chloramphenicol wurden daher beide Lösungsmittel in Kombination mit Wasser getestet. Mit Methanol wurde eine gute Trennung mit guter Peakform und Empfindlichkeit erzielt. Durch den Austausch des Methanols gegen Acetonitril wurde die chemische Ionisierung bei der Massenspektrometrie unterdrückt, so dass keine Signale mehr erhalten wurden. Gasförmiges Acetonitril ist eine relativ starke Base und deshalb ein „Mitbewerber“ um die Protonierung [103]. Folglich ist Acetonitril als Eluent für die CAP Analyse mittels LC-MS ungeeignet.

3.1.3.3. Ansäuerung/Alkalisierung des Fließmittels

Wichtigste Grundregel bei der LC-MS ist die Verwendung flüchtiger Pufferzusätze und flüchtiger Säuren oder Laugen. Nichtflüchtige Puffer schlagen sich in der Ionenquelle als Schicht nieder und können nach kurzer Zeit zur Verstopfung der Ioneneintrittsöffnung führen oder Kriechströme und Kurzschlüsse verursachen. Erlaubte Additive sind Ammoniumacetat oder -formiat zum Puffern, im Positiv-Modus Essigsäure, Ameisensäure oder Trifluoressigsäure zum Ansäuern sowie Ammoniak, Triethylamin oder N-Methylmorpholin zum Einstellen eines basischen pH-Wertes im Negativ-Modus.

Zusätzlich sollten möglichst niedrige Additivkonzentrationen gewählt werden. Bei der Ionisierung bildet sich eine Ladungswolke aus Kationen bzw. Anionen der Analyte, koeluerender Probenmatrix und der Pufferadditive. Die Ladungsdichte in dieser Wolke ist begrenzt durch die gegenseitige Abstoßung von Ladungsträgern derselben Polarität, was letztendlich zu einer Aufweitung und einer Verdünnung der Analytionen bei hohen Pufferkonzentrationen führt [103].

Zusätze von Säuren oder Basen zum Eluenten fördern die Ionisierung und Bildung von Moleküllonen. Saure Moleküle bilden negative Ionen in Lösungen mit hohem pH-Wert, basische Moleküle bilden positive Ionen in Lösungen mit niedrigem pH-Wert [37].

Der Austausch des Eluenten Wasser gegen 0,1 %igen Ammoniak führte jedoch bei Chloramphenicol zu einer Verschlechterung der Empfindlichkeit. Auch die Zugabe von 0,1 % Ameisensäure ergab, wie zu erwarten, einen Empfindlichkeitsverlust.

3.1.4. Massenspektrometrie

3.1.4.1. Electrospray Ionisation (ESI) oder Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)

Als Interface für die LC-MS-Kopplung standen zwei Techniken zur Verfügung: die Electrospray Ionisation (ESI) und die Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI). Im allgemeinen ist ESI besser geeignet für polare Substanzen wie biologische Polymere (Peptide, Proteine, Nukleotide), Pharmazeutika und ihre Metabolite und industrielle Polymere. Unpolare Substanzen wie Steroide lassen sich besser mit APCI analysieren [37].

Dies lässt sich auch für Chloramphenicol bestätigen. CAP ist ein Arzneimittel mit polaren Eigenschaften. Im Scan erhält man nicht die zu erwartenden Quasimolekülonen, daher eignet sich APCI nicht für die Ionisierung. CAP muss mittels ESI analysiert werden.

3.1.4.2. Polarität

Die Electrospray Ionisation (ESI) kann mit positiver oder negativer Polarität erfolgen. Die Polarität wird von den in der Lösung gebildeten Ionen bestimmt: saure Moleküle bilden negative Ionen in Lösungen, basische Moleküle bilden positive Ionen. Die Bildung von Molekül-Ionen aus den entstehenden Tropfen ist leichter, wenn die Ionenladung und die Ladung der Oberfläche des Tropfens dieselbe Polarität haben. Daher wird ESI positiv für die Analyse von positiv geladenen Ionen verwendet und ESI negativ für negativ geladene Ionen [37].

CAP ist aufgrund der im Molekül enthaltenen polaren Gruppen sauer und lässt sich daher nur mittels ESI negativ ionisieren. Im Positiv-Modus erhält man keine Quasimolekülonen.

Am Anfang der Methodenentwicklung war bei der Messung mehrerer Standards hintereinander eine Abnahme der Empfindlichkeit zu beobachten. Diesem Effekt konnte durch eine Umpolung von ESI positiv auf ESI negativ während einer Analyse entgegengewirkt werden. Die ersten 10 Minuten werden ESI positiv gemessen, danach wird auf ESI negativ gewechselt. Nach der Elution des CAP-Peaks wird nach 25 Minuten erneut in den ESI positiv Modus zurückgewechselt.

Grund für die Abnahme der Empfindlichkeit scheint daher eine elektrostatische Aufladung im Massenspektrometer zu sein. Durch den Wechsel der Polaritäten wird der Aufladung entgegengewirkt. Mit dieser Methode erreicht man eine gute Stabilität und Reproduzierbarkeit des Standards.

3.1.4.3. Ionisierung

Bei der Ionisierung mittels ESI erhält man für das CAP-Molekül bei negativer Polarität die Quasimolekülonen m/z 321 (Cl 35/35, M-H)⁻, m/z 323 (Cl 35/37, M-H)⁻ und m/z 325 (Cl 37/37, M-H)⁻ im Verhältnis 10:6:1. In der Literatur [99] ist für Chloramphenicol eine molare Masse von 323,14 g/mol angegeben. Diese molare Masse setzt sich aus den relativen Atommassen der im Molekül vorkommenden Elemente zusammen. Die meisten Elemente sind Mischelemente, d.h. sie bestehen aus mehreren Isotopen. Der prozentuale Anteil der Atome eines Isotops an der Gesamtzahl der Atome des betreffenden Mischelementes wird als relative Isotopenhäufigkeit bezeichnet. Diese relative Isotopenhäufigkeit ist in der natürlichen Mischung fast immer konstant, unabhängig von der jeweiligen Probe des Elements.

Die im Chloramphenicol $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ vorkommenden Elemente Chlor, Sauerstoff, Stickstoff, Kohlenstoff und Wasserstoff sind Mischelemente. Sauerstoff, Stickstoff, Kohlenstoff und Wasserstoff besitzen jeweils ein Isotop mit einer sehr hohen relativen Häufigkeit, so dass die anderen Isotope sich kaum auf die relative Atommasse auswirken. Chlor dagegen besitzt zwei Isotope, die mit einer relativen Häufigkeit von 75,53 % für ^{35}Cl und 24,47% für ^{37}Cl beide die relative Atommasse beeinflussen. Daher ist der in der Literatur angegebene Wert für die molare Masse von Chloramphenicol nur ein Mittelwert der sich aus der relativen Häufigkeit der Molekülmassen 322 (Cl 35/35), 324 (Cl 35/37) und 326 (Cl 37/37) berechnet. Hinzu kommen die relativen Häufigkeiten der anderen aufgrund der Isotopie der restlichen Elemente entstehenden Molekülmassen, die allerdings mit 0,0145 – 1,108 % vernachlässigbar gering sind [97] (siehe hierzu auch 3.2.4 und Tab. 3-6).

In Anhang I - III sind die möglichen Quasimolekülionen, die für m/z 323 aufgrund der Isotopenhäufigkeit entstehen können, aufgeführt. Wie man erkennen kann, ist die relative Häufigkeit der Ionen, die durch die Isotope der im CAP-Molekül neben Chlor enthaltenden Atome entstehen, sehr gering. Sie können erst durch Vergrößerung dargestellt werden und erfordern zusätzlich eine hohe Auflösung. Daher sind sie bei der Analyse von CAP zu vernachlässigen.

Bei der negativen Ionisierung wird ein Wasserstoffion des Chloramphenicols abgespalten, daher erhält man Quasimolekülionen, deren Masse um 1 erniedrigt ist. Da das Signal für m/z 325 aufgrund des seltenen Vorkommens von zwei ^{37}Cl -Atomen in einem CAP-Molekül zu gering ist, beschränkt sich die Analyse auf die Quasimolekülmassen 321 und 323.

3.1.4.4. Auswertung

A. Stabilisotopenverdünnungsanalyse – Interner Standard

Die Stabilisotopenverdünnungsanalyse ist eine Methode der quantitativen Analyse mittels Massenspektrometrie. Im Prinzip ähnelt die Stabilisotopenverdünnungsanalyse der Verwendung eines internen Standards. Durch den Zusatz einer bekannten Menge einer isotopenmarkierten Verbindung (Tracer) zu einem Substrat kann auf die unbekannte Menge eines in seiner natürlichen Isotopenverteilung darin vorliegenden Stoffes zurückgerechnet werden [24].

Ein interner Standard ist eine Substanz, die dem Analyten möglichst ähnlich ist. Bei der Chromatographie sollte sie eine ähnliche Retentionszeit haben, vom Detektor muss sie ähnlich gut angezeigt werden, und sie darf nicht in der Analysenprobe vorkommen. [104]

In der Massenspektrometrie können zu diesem Zweck isotopenmarkierte Verbindungen der zu analysierenden Substanz verwendet werden. Am häufigsten werden ^{13}C markierte oder deuterierte Substanzen verwendet. Diese isotopenmarkierten Verbindungen haben den Vorteil, dass sie dem Analyten chemisch sehr ähnlich sind und damit ein ähnliches Verhalten bei der Extraktion, der Chromatographie und Detektion aufweisen. Aufgrund ihrer vom Analyten abweichenden Masse können sie mittels MS trotz ähnlichem chromatographischen Verhaltens getrennt detektiert werden.

Der interne Standard kann zur Identitäts-Absicherung (siehe 3.1.4.4.B) und zur Wiederfindungskorrektur (siehe. 3.2.3.1) genutzt werden.

B. Identität

Zur Absicherung der Identität des Chloramphenicols wird zum einen die Retentionszeit des 5-fach deuterierten Chloramphenicols (interner Standard) genutzt, da es fast gleichzeitig (etwa 0,05 min früher) mit Chloramphenicol eluiert. Andererseits kann das Chlorisotopenverhältnis genutzt werden.

Da Chloramphenicol zwei Chlormoleküle enthält, erhält man im Scan drei Quasimolekülmassen:

m/z 321 (Cl 35/35, M-H)⁻

m/z 323 (Cl 35/37, M-H)⁻

m/z 325 (Cl 37/37, M-H)⁻

im Verhältnis 10:6:1

Wie unter 3.1.4.3 beschrieben ist, beschränkt sich die Analyse auf die Quasimolekülmassen 321 und 323, da das Signal für m/z 325 zu gering ist.

Gemessen werden im Single Ion Modus vier Massenspuren:

321 und 323 für das zu analysierende Chloramphenicol und entsprechend 326 und 328 für das 5-fach deuterierte Chloramphenicol, den internen Standard.

Da für die jeweiligen beiden Quasimolekülonen 321 und 323 das Verhältnis 0,6 beträgt, müssen, wenn es sich tatsächlich um Chloramphenicol handelt, auch die im Chromatogramm für den CAP-Peak erhaltenen Flächen ein Verhältnis von ca. 0,6 aufweisen. Das heißt, dass die erhaltenen Konzentrationen sowohl für die Massenspur CAP 321 als auch CAP 323 identisch sein müssen, da die Berechnung mit einem Standard erfolgt, der das Verhältnis von 0,6 schon berücksichtigt.

C. Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgt mittels eines externen Standards. Das deuterierte Chloramphenicol, das als interner Standard hinzugefügt wird, dient nur der Qualifizierung, da die Wiederfindung des deuterierten Chloramphenicols schlechter ist als die des Chloramphenicols und von Probe zu Probe variiert. Bei der Berechnung von Dotierungsversuchen war das nur über den externen Standard ermittelte Ergebnis immer näher am tatsächlichen Wert als das mit Wiederfindungskorrektur über den internen Standard errechnete. Außerdem zeigten die wiederfindungskorrigierten Werte eine stärkere Schwankung und damit eine schlechtere Reproduzierbarkeit. Dies gilt nur für die Analyse mittels LC-MS (Single Quadrupole-Massenspektrometer), für die LC-MS/MS-Analyse konnte der interne Standard CAP-d5 für die Wiederfindungskorrektur genutzt werden (siehe 3.2.3.1).

3.2. Bestimmung von CAP mittels LC-MS/MS (Triple Quadrupole)

(vergl. Methode 2.2)

3.2.1. Aufarbeitung

Wie unter 3.1.2 beschrieben, ist für die LC-MS zur Aufreinigung nach der Flüssigflüssig-Extraktion eine Festphasenextraktion notwendig. Bei der LC-MS/MS kann auf

diesen zusätzlichen Probenvorbereitungsschritt aufgrund der erhöhten Selektivität und verbesserten Empfindlichkeit verzichtet werden. Der erhaltene Extrakt wird ohne weitere Aufreinigung und Aufkonzentrierung direkt injiziert.

Für die Analyse von Honig mittels LC-MS/MS konnte die Aufarbeitung nach 2.1.5.1. weitestgehend beibehalten (Vergleich 2.2.4.1), für Gelée Royale musste sie jedoch komplett abgewandelt werden. CAP konnte bei der Messung dotierter Gelée Royale-Proben mittels LC-MS/MS, die gemäß der unter 2.1.5.2 beschriebenen Aufarbeitung vorbereitet wurden, nicht nachgewiesen werden.

3.2.1.1. Extraktionsmittel für die Gelée Royale Aufarbeitung

Da sich für die Analyse von CAP in Gelée Royale mittels LC-MS/MS Chloroform nicht als Extraktionsmittel eignete, wurde eine Aufarbeitung mittels Ethylacetat angestrebt. Die Extraktion des Chloramphenicols mittels Ethylacetat ohne und mit vorherigem Lösen in NaCl-Lösung führte zu schlechten Wiederfindungen (< 20 %) und zu sehr unsauberen Chromatogrammen mit starken Matrixstörungen. Ethylacetat extrahiert zu viele Matrixbestandteile des Gelée Royales, die sich negativ auf die Chromatographie auswirken. Dieses Problem konnte durch eine vorherige Extraktion mit wässriger NaCl-Lösung gelöst werden. Das Gelée Royale wird hierzu in der wässrigen NaCl-Lösung suspendiert, so dass das enthaltene Chloramphenicol in Lösung gehen kann. Die nicht löslichen Bestandteile der Probe werden abzentrifugiert. Anschließend wird die wässrige Phase in ein zweites Röhrchen überführt und somit von den in Wasser nicht löslichen Bestandteilen abgetrennt. Da CAP in Wasser schlechter löslich ist als beispielsweise in Ethylacetat, wiederholt man diesen Extraktionsschritt zweimal, um das komplette, in der Probe enthaltene CAP in Lösung zu bekommen. Die so erhaltene Lösung wird mit Ethylacetat extrahiert. Auf diese Weise kann verhindert werden, dass durch das Ethylacetat auch weitere Stoffe des unlöslichen Anteils extrahiert werden und damit in den zu analysierenden Extrakt gelangen. Mit Ethylacetat werden jedoch immer noch viele Matrixbestandteile extrahiert, die die Phasentrennung zwischen der wässrigen und der Ethylacetat-Phase behindern. Es bildet sich eine gelatinöse Masse, die jedoch durch doppelte Zentrifugation getrennt werden kann. Dieser Effekt ist beim lyophilisierten Gelée Royale stärker als beim frischen. Durch eine Carrez-Klärung und Entfettung mit Hexan kann er eliminiert werden.

Auf die Wiederfindung des Chloramphenicols wirkt sich die Entfettung mit Hexan weder positiv noch negativ aus, die Carrez-Klärung verschlechtert jedoch die Wiederfindungsrate (Vergleich Abb. 3-15 mit 3-17 und 3-18). Daher wird bei der Standardaufarbeitung auf diese beiden Aufarbeitungsschritte verzichtet. Im Ausnahmefall, wenn durch mitextrahierte Matrix zu starke Störungen im Chromatogramm auftreten, werden die Carrez-Klärung und die Entfettung durchgeführt, um die Störpeaks durch Entfernen der Matrix zu minimieren (vergl. 2.2.4.2 und 2.2.4.3).

Weiterhin wurde überprüft, ob sich Chloroform nach den Veränderungen in der Aufarbeitung ebenso oder besser zur Extraktion des Chloramphenicols aus Gelée Royale eignet als Ethylacetat. Beim Austausch von Ethylacetat gegen Chloroform bei Durchführung der Aufarbeitung nach 2.2.4.2. konnte Chloramphenicol nicht nachgewiesen werden (Abb. 3-16).

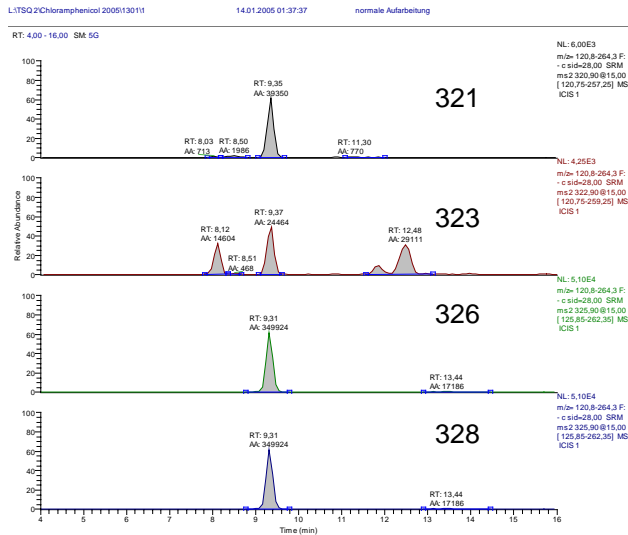


Abb. 3-15. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten Gelée Royales, das nach der unter 2.2.4.2. beschriebenen Aufarbeitung mit zusätzlicher Carrez-Klärung und Entfettung mit Hexan vorbereitet wurde

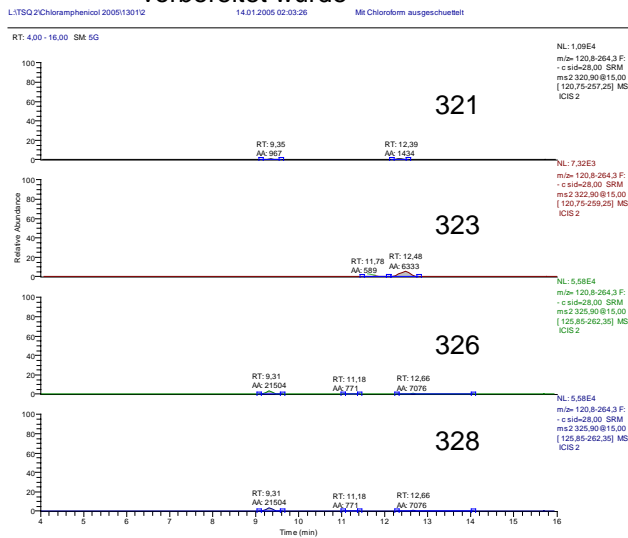


Abb. 3-16. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten Gelée Royales, das nach der unter 2.2.4.2. beschriebenen Aufarbeitung, jedoch unter Austausch des Ethylacetats gegen Chloroform vorbereitet wurde

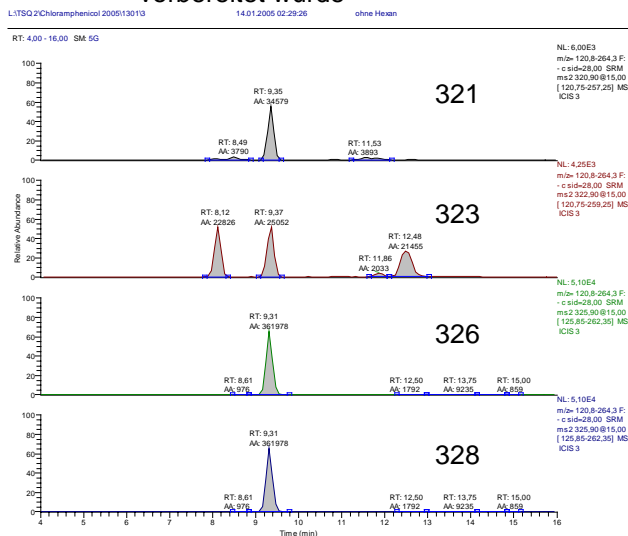


Abb. 3-17. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten Gelée Royales, das nach der unter 2.2.4.2. beschriebenen Aufarbeitung, jedoch mit Carrez-Klärung und ohne Entfettung mittels Hexan vorbereitet wurde

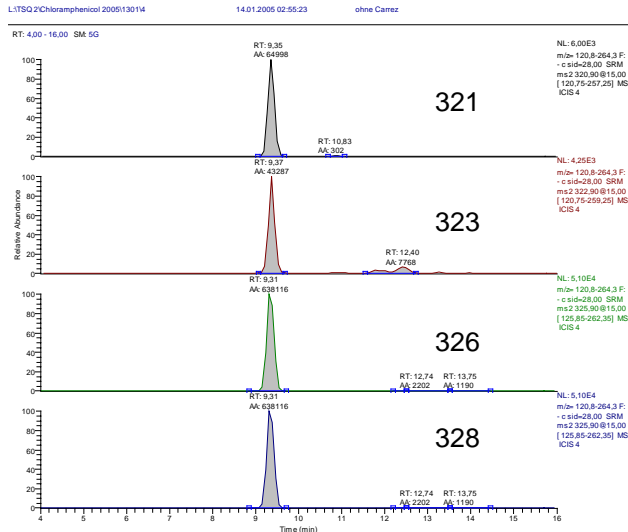


Abb. 3-18. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten Gelée Royales, das nach der unter 2.2.4.2. beschriebenen Aufarbeitung jedoch ohne Carrez-Klärung und ohne Entfettung mit Hexan vorbereitet wurde

3.2.1.2. pH-Wert Einstellung für die Gelée Royale Aufarbeitung

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der pH-Wert. In Versuchen hatte sich gezeigt, dass die Wiederfindung gesteigert werden kann, wenn der wässrige Extrakt des Gelée Royales vor der Extraktion mit Ammoniumacetat neutralisiert wird. Der pH-Wert sollte im Bereich von 6,5 – 7,5 liegen, da sich sowohl ein niedrigerer als auch ein höherer pH-Wert negativ auf die Extraktion auswirken (siehe Abb. 3-19 bis 3-21).

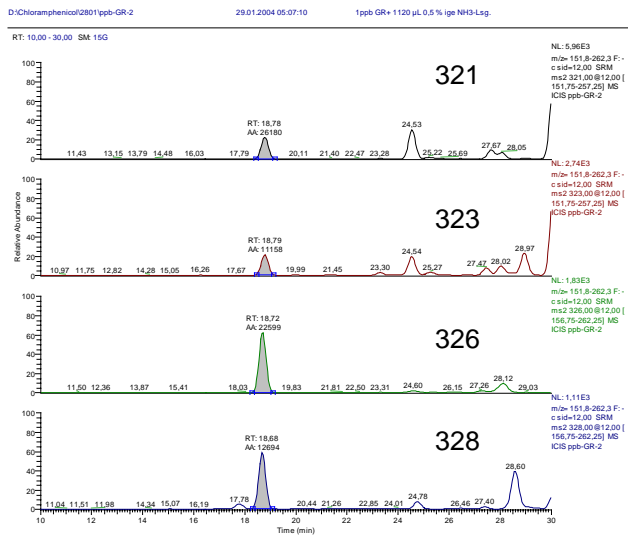


Abb. 3-19. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Gelée Royales, das nach der unter 2.2.4.2. beschriebenen Aufarbeitung mit Neutralisation der wässrigen Lösung vorbereitet wurde

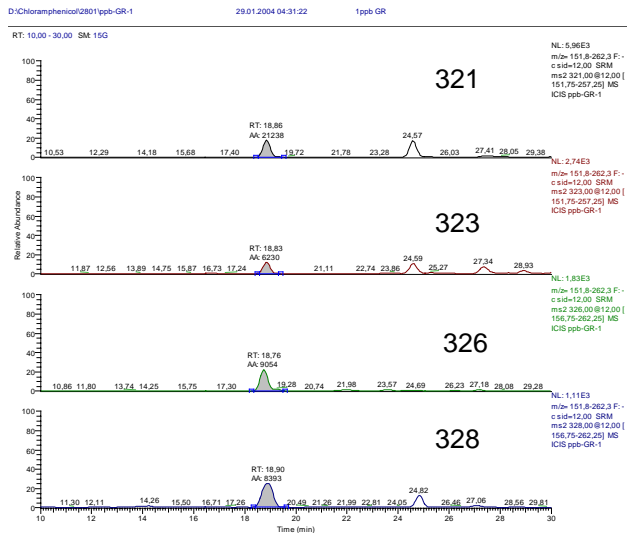


Abb. 3-20. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Gelée Royales, das nach der unter 2.2.4.2. beschriebenen Aufarbeitung ohne Neutralisation der wässrigen Lösung (→ sauer) vorbereitet wurde

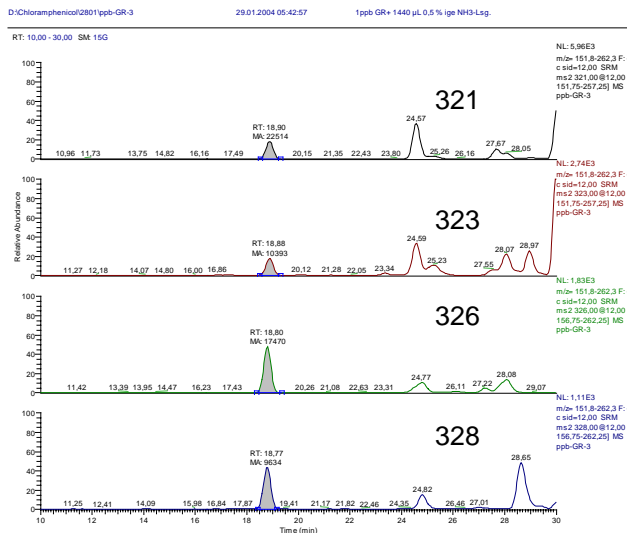


Abb. 3-21. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Gelée Royales, das nach der unter 2.2.4.2. beschriebenen Aufarbeitung unter alkalischen Bedingungen für die wässrige Lösung (→ basisch) vorbereitet wurde

Honig zeigt im Vergleich zum Gelée Royale ein anderes Verhalten. Bei Honig führt eine Neutralisation vor der Extraktion zu einer leicht verschlechterten Wiederfindung im Gegensatz zur Aufarbeitung nach 2.2.4.1. Unter alkalischen Bedingungen ist die Extraktion des Chloramphenicols etwas schlechter und die des internen Standards leicht verbessert. Daher wird mit der durch den pH-Wert des Honigs leicht sauren wässrigen Lösung gearbeitet (siehe Abb. 3-22 bis 3-24).

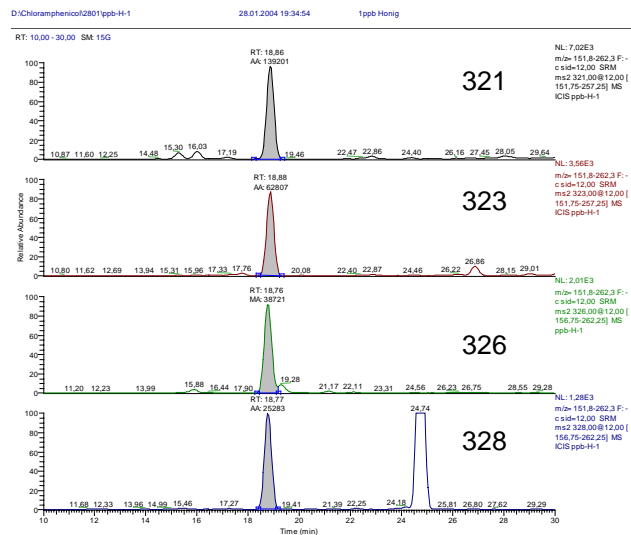


Abb. 3-22. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Honigs der nach der unter 2.2.4.1. beschriebenen Aufarbeitung ohne Neutralisation der wässrigen Lösung (→ sauer) vorbereitet wurde

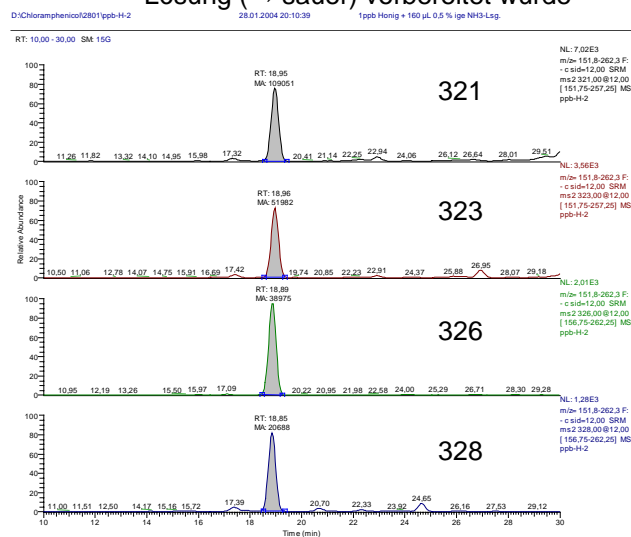


Abb. 3-23. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Honigs der nach der unter 2.2.4.1. beschriebenen Aufarbeitung mit Neutralisation der wässrigen Lösung vorbereitet wurde

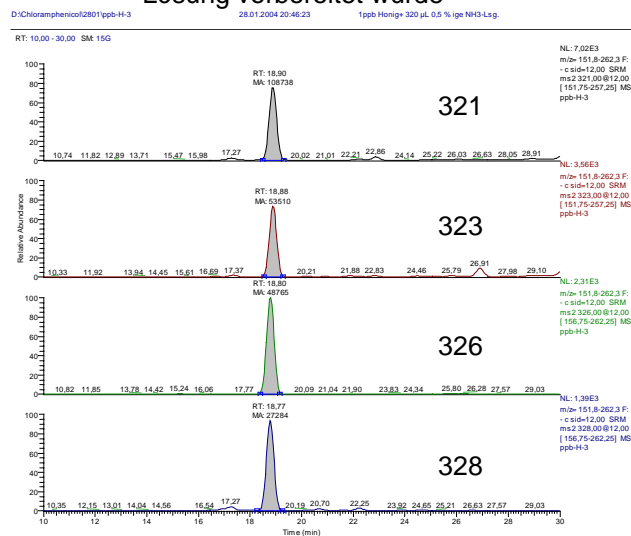


Abb. 3-24. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Honigs der nach der unter 2.2.4.1. beschriebenen Aufarbeitung unter alkalischen Bedingungen für die wässrige Lösung (→ basisch) vorbereitet wurde

Der pH-Wert der wässrigen Lösung des Gelée Royales ist nicht niedriger als der des Honigs, aber die Pufferwirkung des Gelée Royales ist stärker. Dies konnte mittels eines Versuchs verdeutlicht werden:

Dazu wurden jeweils 5 g Honig/Gelée Royale in 10 mL 4 %iger NaCl-Lösung gelöst und schrittweise mit 0,5 %iger Ammoniak-Lösung versetzt. Nach jeder Zugabe und gründlicher Durchmischung wurde der pH-Wert gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-2 zusammengefasst. Die gemessenen pH-Werte veranschaulichen, dass dem Gelée Royale die zehnfache Menge an 0,5 %iger Ammoniak-Lösung hinzugefügt werden muss, um eine Neutralisation zu erreichen, obwohl der pH-Wert der Ausgangslösung höher ist als der des Honigs.

Zugegebene Menge an 0,5 %iger Ammoniak-Lösung [μL]	pH-Wert			
	heller Honig	mitteldunkler Honig	dunkler Honig	frisches Gelée Royale
0	3,14	3,37	3,33	3,64
25	3,29	3,56	3,41	3,68
50	3,49	3,73	3,56	3,75
100	3,84	4,14	3,81	3,77
150	4,38	4,92	4,09	3,82
200	5,08	5,40	4,41	3,84
300	6,44	6,60	5,55	3,91
400	7,94	7,82	6,80	3,97
500	8,41	8,35	7,52	4,05
700	-	-	-	4,12
900	-	-	-	4,22
1100	-	-	-	4,31
1500	-	-	-	4,50
2000	-	-	-	4,74
3000	-	-	-	5,33
4000	-	-	-	6,21
5000	-	-	-	7,31

Tab. 3-2. Änderung des pH-Wertes von Gelée Royale und Honig bei Zugabe von 0,5 %iger Ammoniak-Lösung

Eine mögliche Erklärung wäre der Gehalt von 10-Hydroxy-2-decensäure (HDA) im Gelée Royale. HDA ist eine Fettsäure, die mit durchschnittlich 3 bis 4 % einen relativ großen Anteil im Gelée Royale ausmacht. Diese schwache Säure könnte für die Pufferwirkung verantwortlich sein. Es ist anzunehmen, dass in der wässrigen Lösung das Gleichgewicht stark auf der Seite der undissoziierten Form liegt. Durch die Zugabe des Ammoniaks werden die Protonen durch Bildung von NH_4^+ aus dem Gleichgewicht entfernt, so dass es sich stärker zur dissoziierten Form verlagert. Weitere HDA-Moleküle dissoziieren und geben Protonen ab (siehe Abb. 3-25). Daher sinkt der pH-Wert nicht so stark wie zu erwarten.

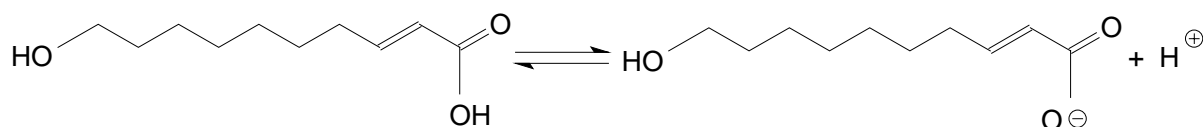
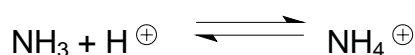


Abb. 3-25. Gleichgewichtsreaktionen von HDA und Ammoniak

Die Art der zur Neutralisation gewählten Base wirkt sich nicht auf die Extraktion des Chloramphenicols aus. Für die vorliegende Methode wurde Ammoniak gewählt, da es keine Metallkationen wie z. B. Natrium- oder Kaliumhydroxid-Lösung enthält. Wenn diese Kationen durch die Extraktion in den zur Analyse injizierten Extrakt gelangen, können sie sich an den Metalloberflächen des Massenspektrometers ablagern und so zu Änderungen der elektrischen Felder führen, die einen Empfindlichkeitsverlust bewirken.

Bei der Neutralisation der wässrigen, zur Analyse mittels LC-MS/MS eingesetzten Lösung, ist nicht wie bei der Neutralisation vor der Extraktion eine Erhöhung der Wiederfindung für CAP zu beobachten. Daher scheint sich die Neutralisation entweder positiv auf die Extraktion des Chloramphenicols auszuwirken, oder sie verhindert, dass Matrixbestandteile, die während der Messung zu einer Unterdrückung des Signals führen (Suppressionseffekt) mit extrahiert werden. Um dies zu klären, wurde ein Referenzstandard neutral, sauer und basisch mit Ethylacetat extrahiert (siehe Abb. 3-26 bis 3-28).

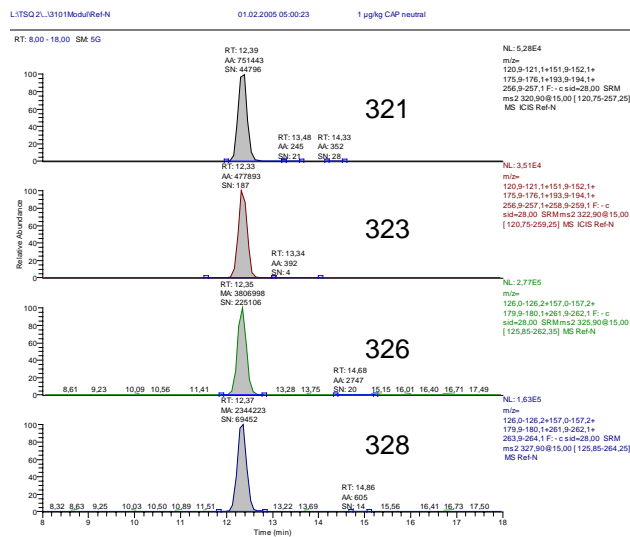


Abb. 3-26. Chromatogramm eines neutralen Referenzstandards, der nach der unter 2.2.4.1. beschriebenen Aufarbeitung vorbereitet wurde

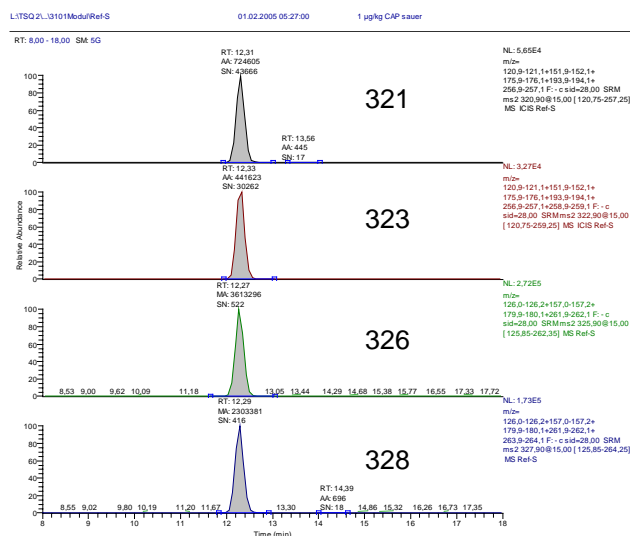


Abb. 3-27. Chromatogramm eines sauren Referenzstandards, der nach der unter 2.2.4.1. beschriebenen Aufarbeitung vorbereitet wurde

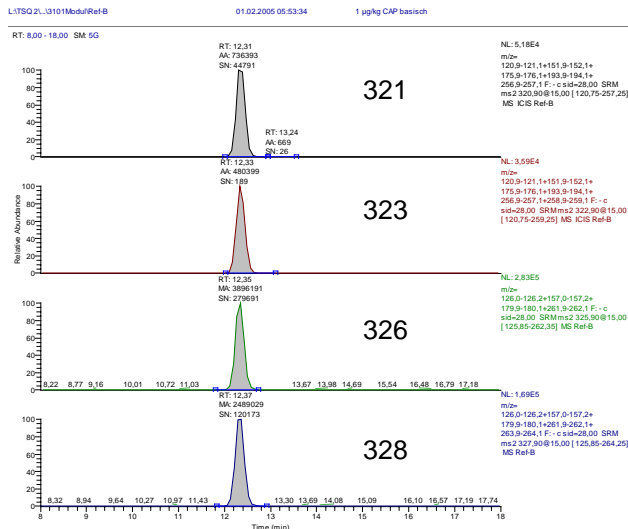


Abb. 3-28. Chromatogramm eines basischen Referenzstandards, der nach der unter 2.2.4.1. beschriebenen Aufarbeitung vorbereitet wurde

Wie den Chromatogrammen zu entnehmen ist, ist die Wiederfindung für den neutralen, den sauren und den basischen Referenzstandard gleich. Somit wirkt sich eine Ansäuerung oder eine Alkalisierung nicht auf das CAP und somit auch nicht auf die Extraktion des Chloramphenicols aus. Es muss sich somit um Matrix-Effekte handeln, die einen Einfluss auf die Extraktion oder die Analyse mittels LC-MS/MS haben.

Bei der Zugabe von Ammoniak zum wässrigen Extrakt, den man nach erfolgter Aufarbeitung erhält, ist eine Auswirkung auf das CAP-d5 zu beobachten. Die Empfindlichkeit für CAP-d5 in der Probe steigt deutlich an, während sie für CAP nahezu gleich bleibt oder sich sogar verschlechtert. Daher scheint sich Ammoniak auf die Ionisierung des 5-fach deuterierten Chloramphenicols stärker auszuwirken als auf die des Chloramphenicols. Eine mögliche Erklärung wäre das Bestreben des Ammoniaks, Protonen aufzunehmen. Daher wird ein Proton vom CAP abgespalten, das damit negativ geladen und ionisiert ist. Ein Deuterium lässt sich leichter abstrahieren als ein Proton, woraus der Empfindlichkeitsgewinn beim CAP-d5 resultiert. Die Abb. 3-29 bis 3-32 veranschaulichen dies. Sie zeigen das Chromatogramm desselben Honigs bzw. desselben Gelée Royales mit und ohne Zugabe von Ammoniak-Lösung zur Neutralisation. Es ist gut zu erkennen, dass die Empfindlichkeit des internen Standards CAP-d5 um das vier- (für Gelée Royale) bis zehnfache (für Honig) ansteigt, wenn nach erfolgter Aufarbeitung mit Ammoniak-Lösung neutralisiert wurde. Gleichzeitig ändert sich die Empfindlichkeit für CAP kaum. Die Fläche für die Massenspur 321 nimmt nach der Neutralisierung um ca. 17 % zu.

Die Neutralisation nach der Extraktion steigert die Empfindlichkeit des internen Standards überproportional stark, so dass seine Fläche im Chromatogramm der Probe nicht mehr mit der Fläche des CAP-d5 im Referenzstandard gleichgesetzt werden kann. Da der interne Standard somit nicht zur Wiederfindungskorrektur genutzt werden kann, ist diese Aufarbeitung für die quantitative Analyse von CAP nicht geeignet. Es wurde daher die Neutralisation vor der Extraktion für die Aufarbeitung von Gelée Royale verwendet.

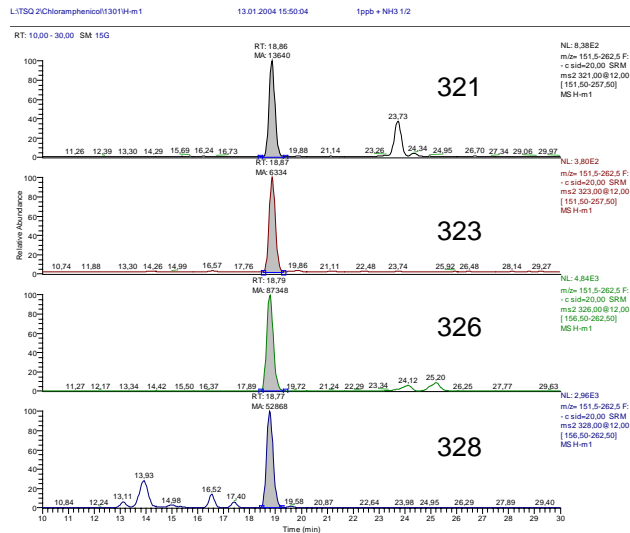


Abb. 3-29. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Honigs, der nach der unter 2.2.4.1. beschriebenen Aufarbeitung mit 0,5 %iger Ammoniak-Lösung neutralisiert wurde

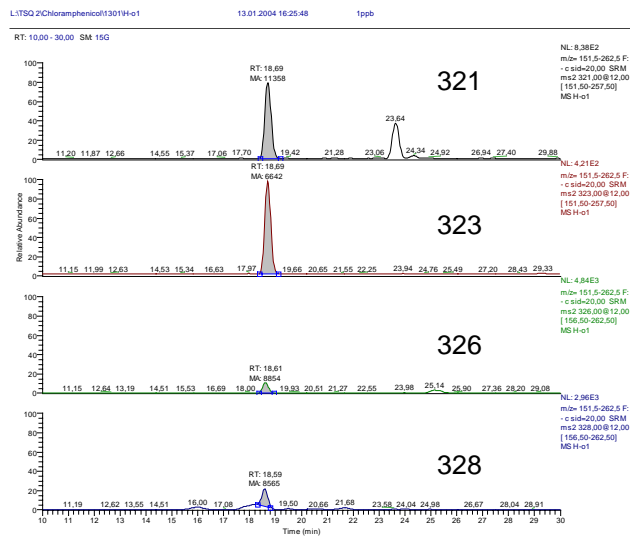


Abb. 3-30. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Honigs, der nach der unter 2.2.4.1. beschriebenen Aufarbeitung vorbereitet wurde

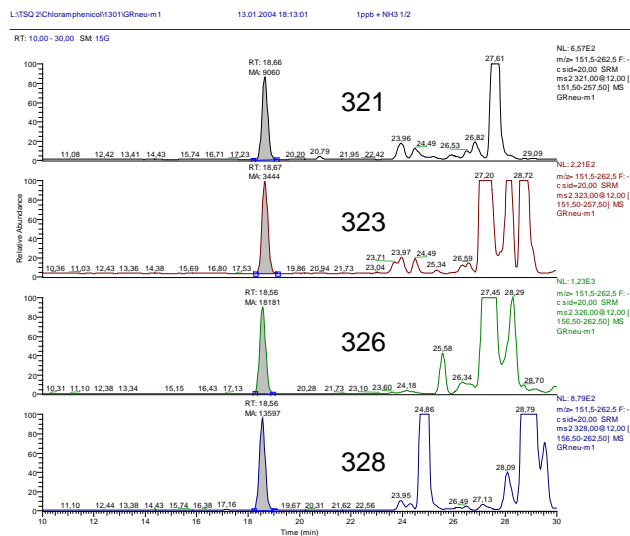


Abb. 3-31. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Gelée Royales, das nach der unter 2.2.4.2. beschriebenen Aufarbeitung (jedoch ohne Neutralisation vor der Extraktion) mit 0,5 %iger Ammoniak-Lösung neutralisiert wurde

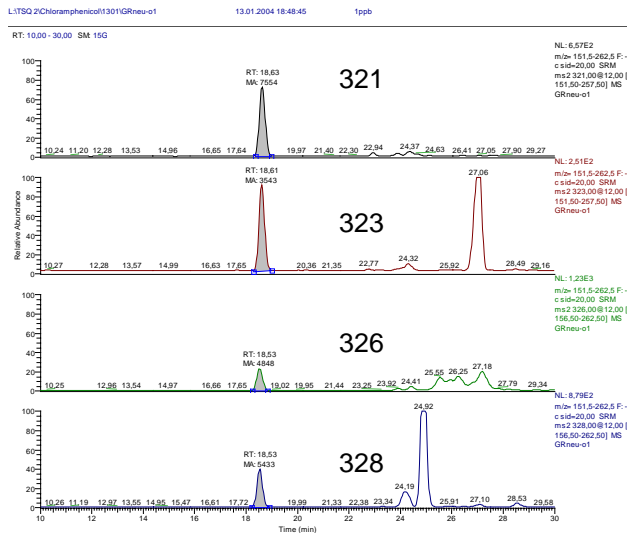


Abb. 3-32. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Gelée Royales, das nach der unter 2.2.4.2. beschriebenen Aufarbeitung (jedoch ohne Neutralisation vor der Extraktion) vorbereitet wurde

In Abb. 3-33. und 3-34. sind zwei Chromatogramme desselben Gelée Royales dargestellt. Das Chromatogramm in Abb. 3-33. wurde von einem Probenextrakt aufgenommen, der ohne Neutralisation vor der Extraktion erhalten wurde. Wie man gut erkennen kann, ist die Wiederfindung sowohl für CAP als auch für CAP-d5 schlechter als für die Aufarbeitung mit Neutralisierung vor der Extraktion nach 2.2.4.2. (siehe Abb. 3-34)

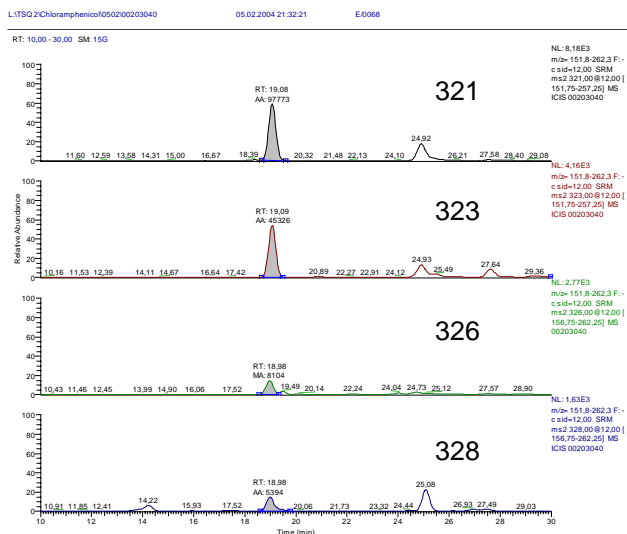


Abb. 3-33. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.2.4.2 beschriebenen Aufarbeitung ohne vorherige Neutralisierung mit 0,5 %iger Ammoniak-Lösung vorbereitet wurde

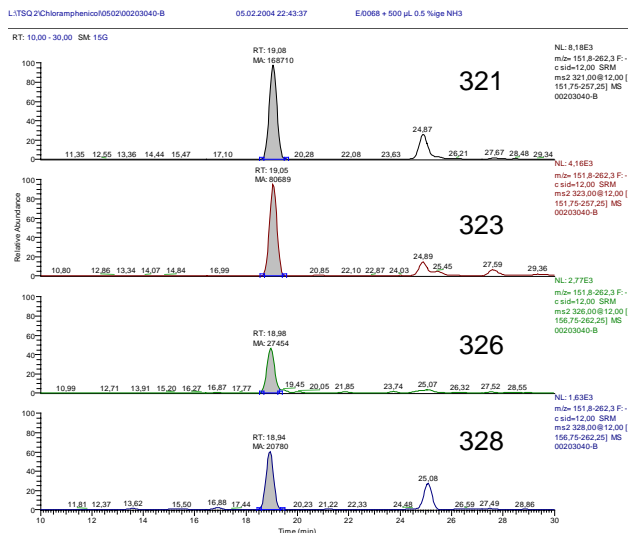


Abb. 3-34. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.2.4.2 beschriebenen Aufarbeitung mit vorheriger Neutralisierung mit 0,5 %iger Ammoniak-Lösung vorbereitet wurde

3.2.1.3. Entwicklung einer Aufarbeitung zur Analyse von Propolis

Alle Bienenprodukte wie z.B. Pollen, lyophilisiertes Gelée Royale oder Wachs lassen sich mit leichten Abänderungen entweder mit der Aufarbeitung für Gelée Royale oder mit der für Honig analysieren. Eine Ausnahme hiervon bildet Propolis. Propolis stellt eine sehr schwer zu bearbeitende Matrix dar. Es besteht zum großen Teil aus Kohlenwasserstoffen, Wachsen, hochmolekularen Estern, Ethern und Ketonen, höheren Fettsäuren und Steroiden, weiterhin aus Polyphenolen, aromatischen Säuren, Terpenoiden, Aminosäuren, Zuckern, etc. (siehe 1.5.3). Aufgrund seiner Zusammensetzung ist Propolis nicht in Wasser löslich, daher kann die Aufarbeitung nicht durch eine Flüssig-flüssig-Extraktion unter Verwendung einer wässrigen und einer organischen Phase wie bei den anderen Bienenprodukten erfolgen. Extrakte, die mittels direktem Lösen in Lösungsmitteln wie Acetonitril, Ethylacetat oder Chloroform gewonnen werden (siehe Aufarbeitung nach 2.1.5.2), haben eine tiefbraune Farbe. Beim Einkonzentrieren setzt sich unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel ein brauner wachsartiger Rückstand im Gefäß ab, der im Wasser/Methanol-Gemisch nicht in Lösung geht. Durch eine mehrfache Entfettung mit Hexan kann die Bildung des wachsartigen Rückstandes nicht verhindert werden. Daher musste für Propolis eine komplett andere Aufarbeitung entwickelt werden, die aber immer noch sehr einfach und schnell sein sollte. Daher wurden Methoden getestet, die ähnliche Aufarbeitungsprobleme bewältigen.

Aus dem Gebiet der Mykotoxin-Analytik ist die Aufreinigung komplexer Matrices, wie z.B. Heidelbeer-Saft, der viele Polyphenole und Farbstoffe enthält, mittels MycoSep® Patulin Festphasensäulen bekannt. Nach Extraktion des Saftes in Acetonitril und Überführen des filtrierten Saftes in ein Kultur-Röhrchen wird der Extrakt mittels Durchdrücken der Lösung durch die MycoSep® Säule von der Matrix weitestgehend befreit, während der Analyt nicht zurückgehalten wird. Der so gereinigte Extrakt befindet sich nach diesem Schritt im oberen Teil der MycoSep® Säule und wird für die weitere Bestimmung eingesetzt. Dieser Aufreinigungsschritt ist sehr schnell und effektiv.

Für die Aufarbeitung des Propolis reicht die Füllung einer MycoSep® Säule nicht aus, daher muss die Säule entsprechend verlängert werden. Dazu werden die Fritten einer MycoSep® Säule entfernt und die Füllung entleert. Mit einem Drittel der

Säulenfüllung wird nach dem Entfernen der Fritten eine zweite Säule verlängert und schließlich mit den Fritten wieder abgedichtet. So erhält man eine um ein Drittel verlängerte MycoSep® Patulin Säule. Eine weitere Verlängerung ist nicht möglich, da sonst nach der Festphasenextraktion keine 4 mL mehr erhalten werden können (siehe Aufarbeitung 2.2.4.6).

Das Propolis wird in Methanol gelöst. Methanol musste verwendet werden, da dies das einzige zur Verfügung stehende Lösungsmittel war, in dem sich Propolis vollständig löste. In den anderen getesteten Lösungsmitteln wie Chloroform, Ethylacetat, Dichlormethan, Hexan, Heptan, Ethanol und Acetonitril war kein vollständiges Lösen möglich. Diese Lösung wird durch die MycoSep® Säule gedrückt. Der so erhaltene, weitestgehend farblose Extrakt wird zur Trockene eingengt und in Wasser/Methanol (v/v 90/10) aufgenommen. Da aufgrund der sehr komplexen Matrix für Propolis nur eine sehr kleine Einwaage (0,25 g) erfolgen kann, kann für die meisten Propolis-Proben der MRPL-Wert von 0,3 µg/kg nicht als Bestimmungsgrenze erreicht werden. Da sich Propolis-Proben untereinander stark unterscheiden, kann für diese Matrix keine allgemeine Validierung erfolgen. Daher ist jede Probe auch dotiert zu analysieren.

Alternativ wurden andere Säulenmaterialien für diese einfache Aufreinigung getestet. Hierzu wurde eine Festphasenkartusche mit einem Adapter an eine Spritze, in der sich das in Methanol gelöste Propolis befand, angeschlossen. In Tabelle 3-3 sind die Festphasenmaterialien aufgeführt, die für die Propolis-Aufarbeitung getestet wurden. Mit einem Pluszeichen (+) sind die Phasen gekennzeichnet, die sich für die Aufarbeitung eignen. Die Phasen mit einem Minuszeichen (–) können nicht verwendet werden.

Getestetes Säulenmaterial	Eignung zur Propolis-aufarbeitung
MycoSep® Patulin Festphasensäulen <i>Romer Labs</i>	+
Florisil <i>J. T. Baker</i>	-
Silica Gel <i>J. T. Baker</i>	-
Aromatic Sulfonic Acid <i>J. T. Baker</i>	-
Carboxylic Acid <i>J. T. Baker</i>	-
Phenyl <i>J. T. Baker</i>	-
Cyano <i>J. T. Baker</i>	-
Diol <i>J. T. Baker</i>	-
Quaternäre Amine <i>J. T. Baker</i>	-
Bond Elut DEA (Diethylaminopropyl) <i>Varian</i>	-
Bond Elut PSA (Ethylenediamine-N-propyl) <i>Varian</i>	-
Amino <i>J. T. Baker</i>	+
1,2-Amino <i>J. T. Baker</i>	+

Tab. 3-3. Getestete Festphasen-Materialien für die Propolis Aufarbeitung

Bei der Bond PSA Festphase ist dasselbe zu beobachten, wie bei der Zugabe von Ammoniak, die Empfindlichkeit des CAP-d5 nimmt stark zu (siehe Abb. 3-36 und 3-37). Dies kann wahrscheinlich auf den tertiären Stickstoff zurückgeführt werden (siehe Abb. 3-35), der wie Ammoniak das Bestreben hat, Protonen aufzunehmen (vergl. 3.2.1.2).



Abb. 3-35. Struktur des Bond PSA Festphasenmaterials

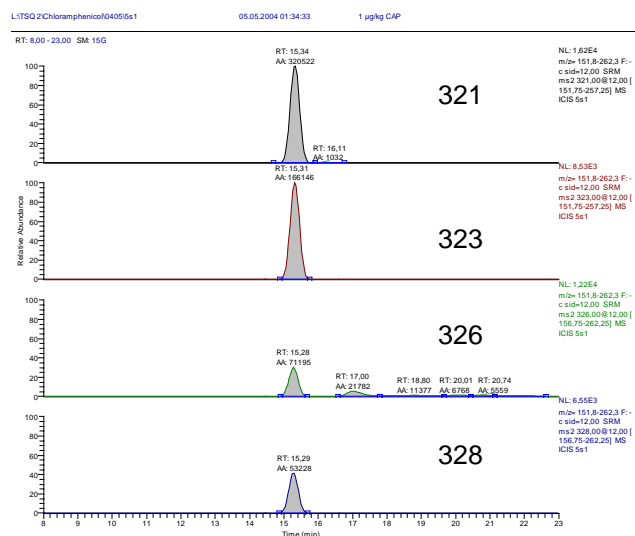


Abb. 3-36. Chromatogramm einer direkt injizierten Standardlösung

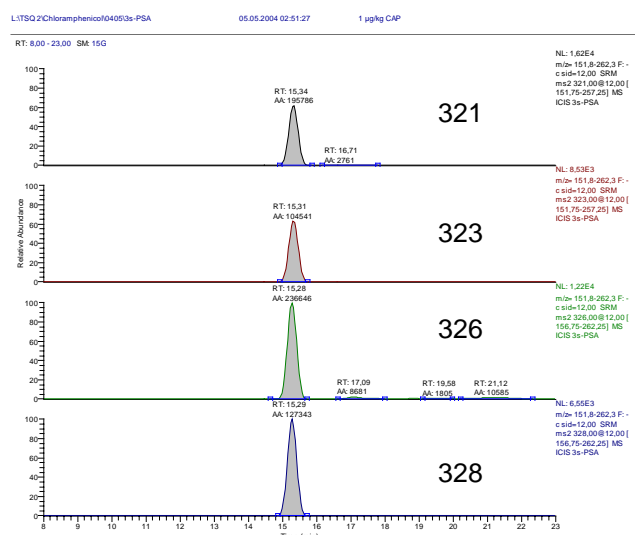


Abb. 3-37. Chromatogramm einer Referenzstandardlösung, die zuvor über eine PSA-Festphase gegeben wurde

Mit der Amino- und 1,2-Aminophase kann eine Aufreinigung wie mit der MycoSep® Säule erreicht werden (vergl. Abb. 3-38 und 3-39). Dieselbe Propolis-Probe wurde einmal mit der MycoSep® Säule nach 2.2.4.6 (Abb. 3-38) und einmal mit der Bakerbond® NH₂-Festphasen-Kartuschen (Abb. 3-39) vorbereitet. Der Extrakt muss hierfür so lange durch die Kartuschen gedrückt werden, bis eine klare Lösung vorliegt. Dazu sind, je nach Art des Propolis, zwei bis vier Kartuschen notwendig.

Eine automatische Aufarbeitung mittels der Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP2000 war in diesem Fall nicht möglich. Die Aufreinigung über die MycoSep® Säule oder die Bakerbond® NH₂-Festphasen-Kartusche ist keine SPE im klassischen Sinne. Der Analyt wird nicht festgehalten, sondern gelangt durch die Phase hindurch, während ein Großteil der Matrixbestandteile zurückgehalten wird. Eine weitere Festphasenextraktion des Extraktes mittels RP18-Material ist daher unerlässlich. Dies würde im Fall der online-SPE eine Kopplung zweier Kartuschen bedeuten. Der in Methanol gelöste Propolis-Extrakt müsste zuerst über die MycoSep®- oder die NH₂-Phase gelangen und anschließend sollte das CAP auf der RP18-Phase

retardiert werden. Da Propolis aber nur in Methanol vollständig löslich ist, würde das Chloramphenicol der vorgereinigten Lösung nicht vom RP18-Material zurückgehalten werden können, da Methanol das Elutionsmittel für CAP ist. Somit könnte keine SPE erfolgen. Aus diesem Grund ist eine Kopplung der beiden Phasen nicht möglich, und dieser Teil der Aufarbeitung muss manuell durchgeführt werden.

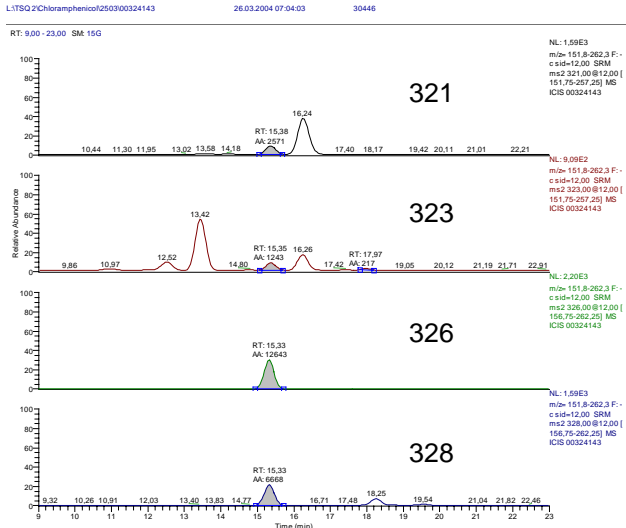


Abb. 3-38. Chromatogramm einer Propolis-Probe, die nach 2.2.4.6. unter Verwendung einer MycoSep® Säule aufgearbeitet wurde

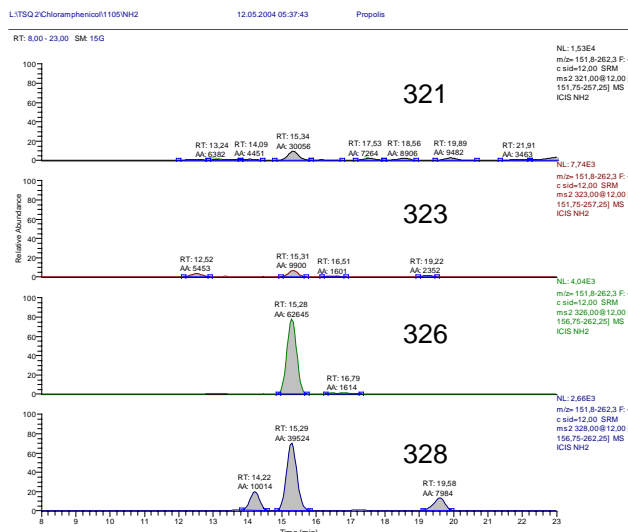


Abb. 3-39. Chromatogramm einer Propolis-Probe, die nach 2.2.4.6. unter Verwendung der Bakerbond® NH₂-Festphasen-Kartuschen aufgearbeitet wurde

Zur Zeit erfolgt die Propolis-Aufarbeitung mit den Bakerbond® NH₂-Festphasen-Kartuschen. Nach einem Chargenwechsel kann die MycoSep® Patulin Säule nicht mehr genutzt werden, da CAP bei Verwendung dieser Säule keine Wiederfindung zeigt. Laut Hersteller gab es bei der neuen Charge eine Änderung des Lots für eine Komponente des Festphasenmaterials. Chloramphenicol scheint nach dieser Änderung von der Säule festgehalten zu werden.

Die jetzt verwendete Aminophase liefert aber genauso gute, teilweise sogar bessere Ergebnisse. Die Aminophase ist preiswerter, aber aufwändiger in der Anwendung.

Die hier erarbeitete Methode eignet sich nicht nur für Propolis, sondern auch zur Aufarbeitung von Gelée Royale. Im Rahmen der Untersuchungen einer Vielzahl

verschiedenster Gelée Royales konnte festgestellt werden, dass es innerhalb dieser Produktgruppe starke Matrix-Unterschiede gibt. Die meisten Proben lassen sich sehr gut mit der Standard-Aufarbeitung für Gelée Royale analysieren, aber für einige ist die damit erzielte Extraktion des Analyten nicht ausreichend. Zu beobachten ist dies besonders bei lyophilisiertem Gelée Royale. In diesen Fällen liefert die Aufarbeitung in Anlehnung an die Propolis-Methode mittels Aminophase bzw. MycoSep® Säulen gute Ergebnisse.

3.2.2. Chromatographie

3.2.2.1. Säule

Zur Verkürzung der Analysenzeiten wurde die Verwendung einer kürzeren Säule angestrebt. Als geeignet erwies sich die Thermo BDS Hypersil C18 125 x 2,1 mm ID, 5 µm. Hypersil BDS C18 ist eine Umkehrphase mit End-capping und wird für die Bestimmung pharmazeutisch wirksamer Substanzen empfohlen.

Noch kürzere Säulen von 50 mm Länge erbrachten nicht die gewünschte Trennleistung. Matrixstörungen konnten nicht mehr vom CAP abgetrennt werden.

3.2.2.2. Eluenten

Wie unter 3.1.3.3 beschrieben, ist bei der Detektion mittels Massenspektrometrie darauf zu achten, dass flüchtige Zusätze zum Eluenten verwendet werden, da nichtflüchtige zu Ablagerungen führen, die die Ionenquelle verstopfen können und somit die Empfindlichkeit negativ beeinflussen. Da Chloramphenicol mittels einer negativen Ionisierung detektiert wird, ist nur der Zusatz einer Base oder auch eines Puffers sinnvoll.

Um zu testen, ob ein Zusatz zu den Eluenten eine Empfindlichkeitssteigerung für die Chloramphenicol-Analyse bewirkt, wurde derselbe Standard dreimal analysiert. Im ersten Versuch wurden den Eluenten Wasser und Methanol keine Additive zugesetzt (Abb. 3-40). Bei der zweiten Messung wurden die Eluenten mit 0,1 % Ammoniumacetat versetzt (Abb. 3-41), und die dritte Messung erfolgte mit Wasser und Methanol, das jeweils mit 0,1 % Ammoniak versetzt wurde (Abb. 3-42). Diese Versuche zeigten, dass bei der Messung mittels LC-MS/MS die Empfindlichkeit ohne Zusatz deutlich am größten ist. Dies konnte auch schon bei der Analyse mittels online-SPE-LC-MS festgestellt werden. Daher wurden die dort verwendeten Eluenten Wasser und Methanol ohne weitere Additive beibehalten.

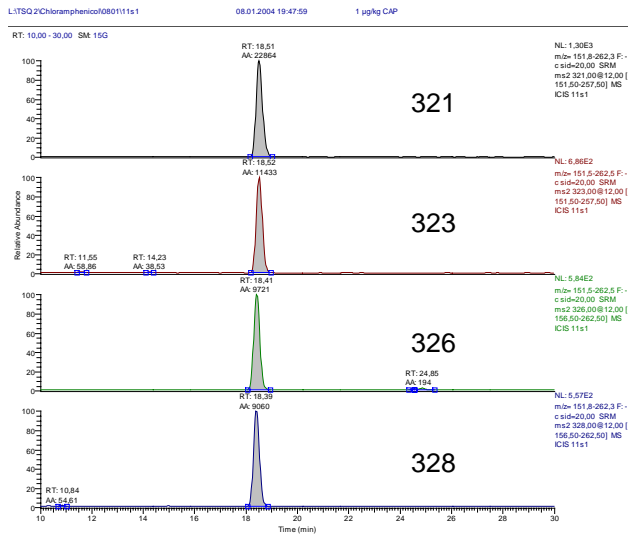


Abb. 3-40. Standard gemessen mit Methanol und Wasser als Eluenten ohne Zusatz

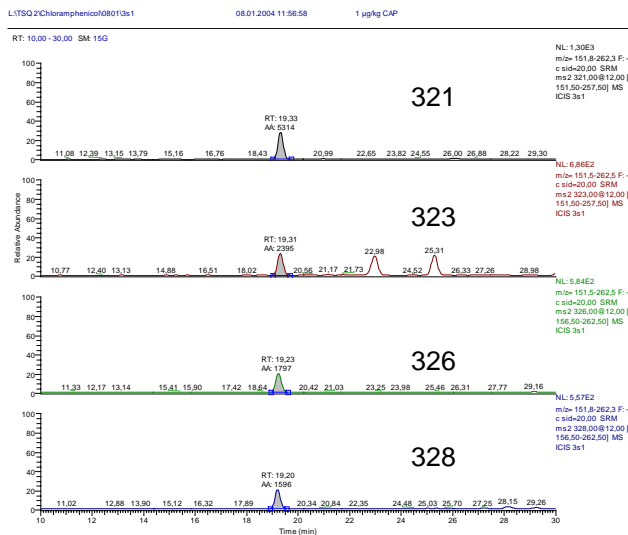


Abb. 3-41. Standard gemessen mit Methanol und Wasser als Eluenten mit Zusatz von 0,1 % Ammoniumacetat

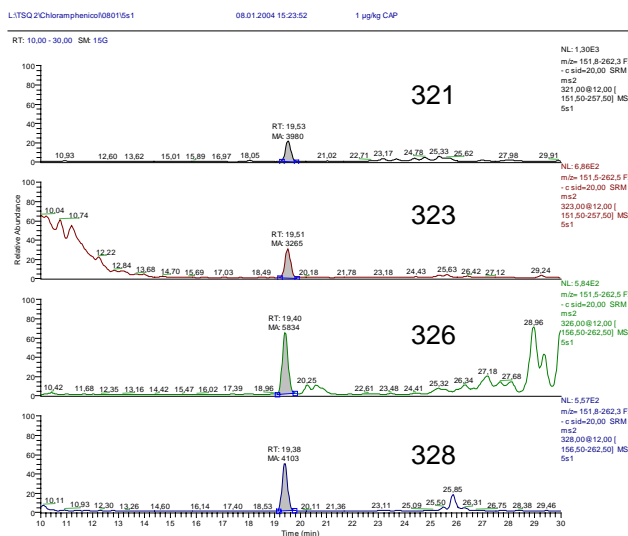


Abb. 3-42. Standard gemessen mit Methanol und Wasser als Eluenten mit Zusatz von 0,1 % Ammoniak

3.2.3. Auswertung

3.2.3.1. Interner Standard

Bei der Bestimmung mittels LC-MS/MS wird der interne Standard CAP-d5 zur Wiederfindungskorrektur verwendet (siehe 2.2.3.3).

Da er dem CAP chemisch sehr ähnlich ist und ebenfalls die gesamte Aufarbeitung und Messung durchläuft, kann er eventuelle Verluste, die dabei auftreten, ausgleichen.

Im Gegensatz zur Analyse mittels LC-MS (Single Quadrupole-Massenspektrometer) liefert die Quantifizierung dotierter Proben über LC-MS/MS unter Einbeziehung der Wiederfindungskorrektur durch den internen Standard sehr konstante Ergebnisse.

3.2.3.2. Massenspektrum

Die Messung wird im SRM (Selected Reaction Monitoring) mode durchgeführt.

Für die Identifizierung und Quantifizierung werden die Produkt-Ionen der korrespondierenden Quasimolekülonen m/z 321 $[M-H]^-$ und m/z 323 $[M-H]^-$ herangezogen. Als Produkt-Ionen erhält man m/z 257, 194, 176 und 152, für m/z 323 $[M-H]^-$ bildet sich zusätzlich m/z 259 (siehe Erläuterungen 3.2.4.).

Abhängig von der Kollisionsenergie und den Tuning-Parametern erhält man ein bestimmtes durchschnittliches Verhältnis der einzelnen Produkt-Ionen zueinander. Zur Absicherung der Identität kann man den Vergleich der Spektren der Produkt-Ionen im Standard und in der Probe heranziehen.

In der Abb. 3-43 ist ein Spektrum für die aus der Masse 321 entstehenden Produkt-Ionen in einem Standard abgebildet. Ein solches Spektrum kann man sich für jeden Peak des Chromatogramms anzeigen lassen. Unter den gegebenen Tuning-Eigenschaften und der verwendeten Kollisionsenergie erhält man in diesem Fall die Produkt-Ionen in dem in Tab. 3-4 angegebenen Verhältnis.

Produktion	Relative Intensität
m/z 152	100 %
m/z 257	91 %
m/z 194	42 %
m/z 176	29 %

Tab. 3-4. Relative Intensitäten für die Produkt-Ionen des Quasimolekülonen m/z 321

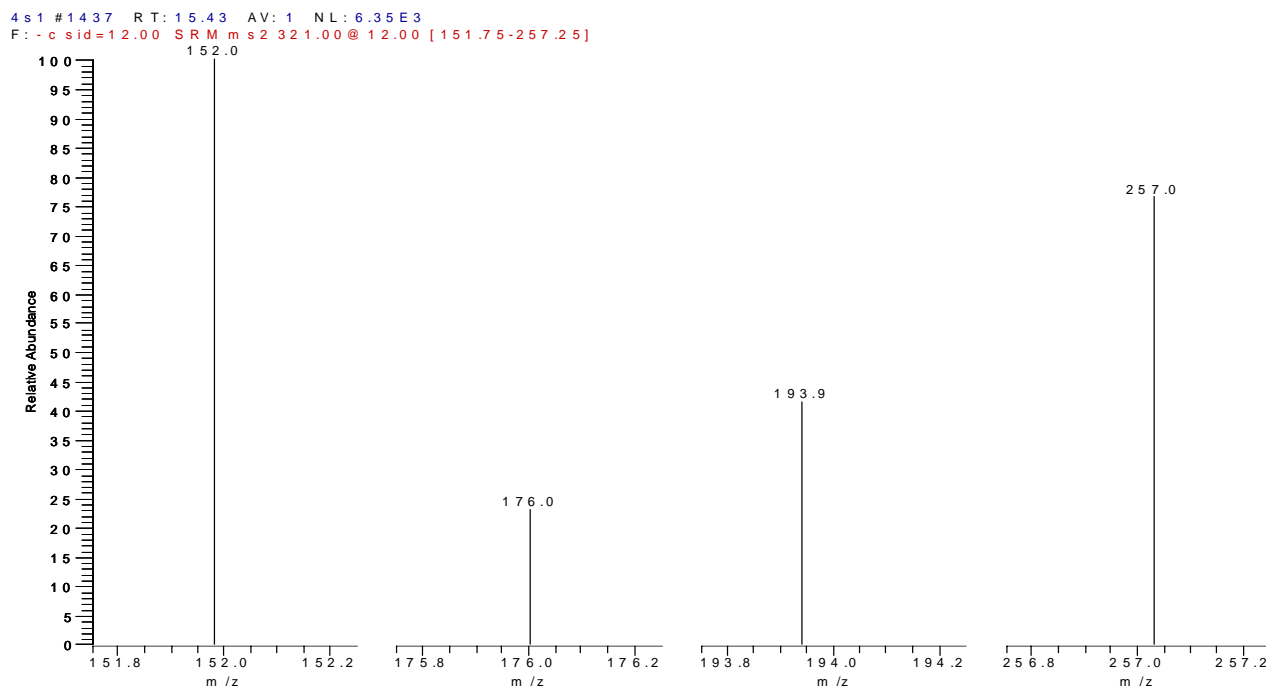


Abb. 3-43. Spektrum des Signals für CAP in einem Standard auf der Massenspur 321

Durch Matrixeinflüsse können sich die relativen Intensitäten der Produkt-Ionen im Spektrum der Probe vom Standard unterscheiden, das Verhältnis der Produkt-Ionen zueinander muss aber das gleiche bleiben. Somit kann das Spektrum helfen, CAP zu identifizieren und Matrixstörungen zu erkennen.

In Abb. 3-44 bis 3-46 ist das zugehörige Spektrum für das Signal im Chromatogramm auf der Massenspur 321 eines Standards, einer mit CAP belasteten Probe und einer zur Retentionszeit des Chloramphenicols erscheinenden Matrixstörung dargestellt. Man kann erkennen, dass das Spektrum des Standards und das der CAP enthaltenden Probe sehr ähnlich sind, während das Spektrum der Matrixstörung komplett davon abweicht. So kann das Spektrum genutzt werden, um Störungen zu identifizieren.

Somit ist die Möglichkeit, gezielt Tochterionen aus einer ausgewählten Masse zu erzeugen ein enormer Vorteil der LC-MS/MS gegenüber der LC-MS-Methode. Die Identität des Chloramphenicols kann schnell über das Spektrum des Peaks abgesichert werden, wobei Matrixstörungen leicht identifiziert werden können.

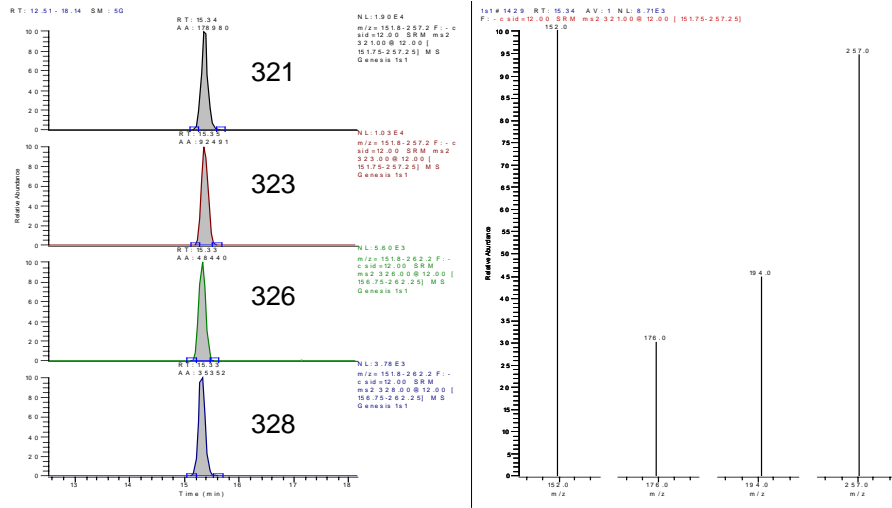


Abb. 3-44. Chromatogramm eines Standards und das dazugehörige Spektrum für das Signal von CAP auf der Massenspur 321

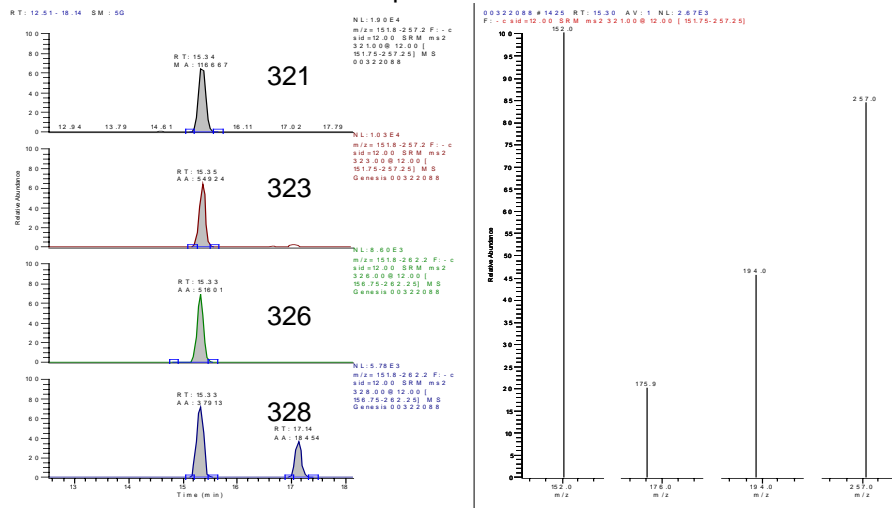


Abb. 3-45. Chromatogramm einer mit CAP kontaminierten Probe und das dazugehörige Spektrum für das Signal von CAP auf der Massenspur 321

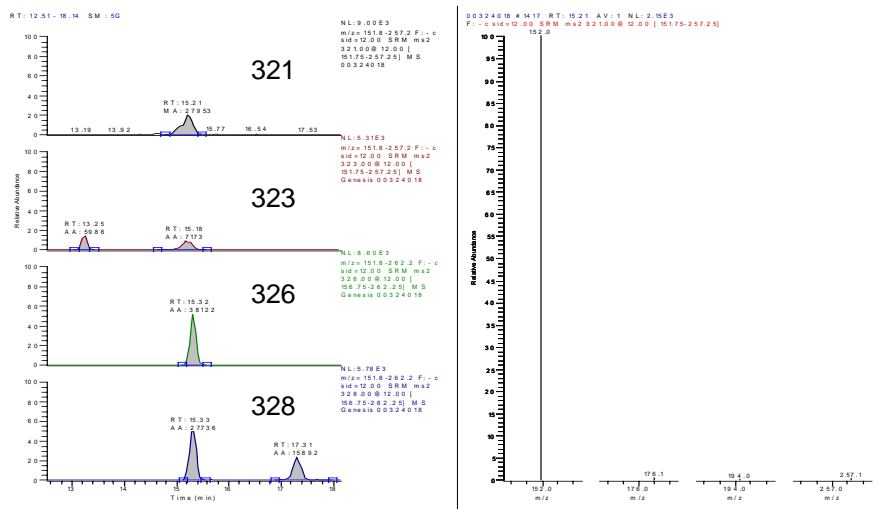


Abb. 3-46. Chromatogramm einer Probe mit Matrixstörung an der Stelle, an der normalerweise CAP eluiert und das dazugehörige Spektrum für das Signal von CAP auf der Massenspur 321

Zur weiteren Absicherung kann auf dieselbe Weise das Spektrum für das Signal auf der Massenspur 323 genutzt werden. Man erhält für m/z 323 dieselben Produkt-Ionen wie für 321 sowie zusätzlich die 259, allerdings in unterschiedlichen Verhältnissen.

Darüberhinaus werden die Produkt-Ionen m/z 157, 262, 180 und 199 der Quasimolekülonen m/z 326 $[M-H]^-$ und m/z 328 $[M-H]^-$ des internen Standards gemessen. Für m/z 328 $[M-H]^-$ erhält man zusätzlich das Produkt 264. Durch die Verwendung des 5-fach deuterierten Chloramphenicols als internen Standard können zum einen Unterschiede bei der Extraktion und in der Empfindlichkeit des Detektors ausgeglichen werden, zum anderen kann die Identität des CAP unter den gewählten Bedingungen weiter abgesichert werden, da CAP ungefähr 0,05 Minuten später eluiert als CAP-d5.

Da bei der Analyse mittels Tandem-MS anstelle der Quasimolekülonen 321 und 323 deren Produkt-Ionen für die Messung verwendet werden, erhält man eine höhere Selektivität, die sich in Chromatogrammen mit geringem Grundrauschen und wenig Matrix-Störungen widerspiegelt (siehe Vergleich Abb. 3-47 und 3-48).

Aufgrund der Spaltung des Ausgangs-Ions in die Produkt-Ionen nimmt sowohl das Signal- als auch das Untergrundrauschen ab, allerdings ist die Abnahme des Untergrundrauschens stärker, was in einer Steigerung des Signal/Rausch-Verhältnisses resultiert. Daher nimmt die Sensitivität aufgrund der resultierenden Steigerung des Signal/Rausch-Verhältnisses zu.

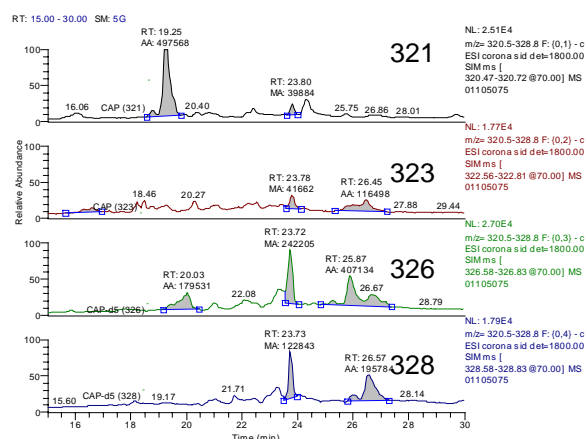


Abb. 3-47. Chromatogramm einer mit CAP kontaminierten Honigprobe, gemessen mittels LC-MS

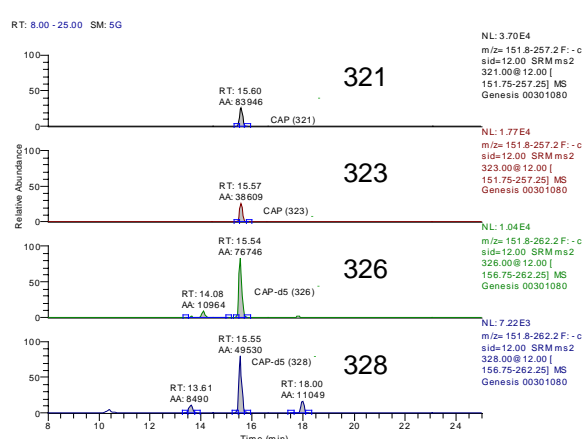


Abb. 3-48. Chromatogramm einer mit CAP kontaminierten Honigprobe, gemessen mittels LC-MS/MS

Aufgrund dieser höheren Selektivität kann auf eine Festhasenextraktion verzichtet und die Analysenzeit weiter verkürzt werden.

3.2.4. Fragmentierung des Chloramphenicols

Bei der Ionisierung von Chloramphenicol mittels ESI negativ erhält man aufgrund der Chlorisotopie (vergl. 3.1.4.3) zwei negativ geladene Haupt-Quasimolekülonen m/z 321 (Cl 35/35, $M-H$) $^-$ und m/z 323 (Cl 35/37, $M-H$) $^-$. Diese Quasimolekülonen werden durch Stoßaktivierung angeregt und die entstehenden Fragmente mittels MS detektiert.

Die folgende Tabelle 3-5 zeigt die aus dem Chloramphenicol-Anion m/z 321 ($\text{Cl } 35/35, \text{M-H}^-$) entstehenden Fragmente und deren mögliche Strukturen.

(m/z)	Summenformel	mögliche Struktur	Abspaltungsprodukte
321	$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_5\text{Cl}_2$		
257	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cl}_1$		von m/z 321: $\text{C}=\text{O}$ $\text{H}-\text{Cl}$
194	$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_1\text{O}_4$		von m/z 257: $\text{H}-\text{C}\equiv\text{N}$ $\text{H}-\text{Cl}$
176	$\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_1\text{O}_3$		von m/z 194:
152	$\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_1\text{O}_3$		

Tab. 3-5. Fragmente des Chloramphenicols

Aus dem Isotop m/z 323 ($\text{Cl } 35/37, \text{M-H}^-$) bildet sich zusätzlich das Fragment m/z 259, da sowohl das ^{35}Cl ($\rightarrow m/z$ 259) als auch das ^{37}Cl ($\rightarrow m/z$ 257) als Abspaltungsprodukte an der Fragmentierung beteiligt sind. Zu erwarten wäre daher ein Verhältnis von 1:1 für die beiden Fragmente m/z 257 und m/z 259. Wie aber der Abbildung 3-49 zu entnehmen ist, kommt das Fragment m/z 259 häufiger vor als das Fragment m/z 257.

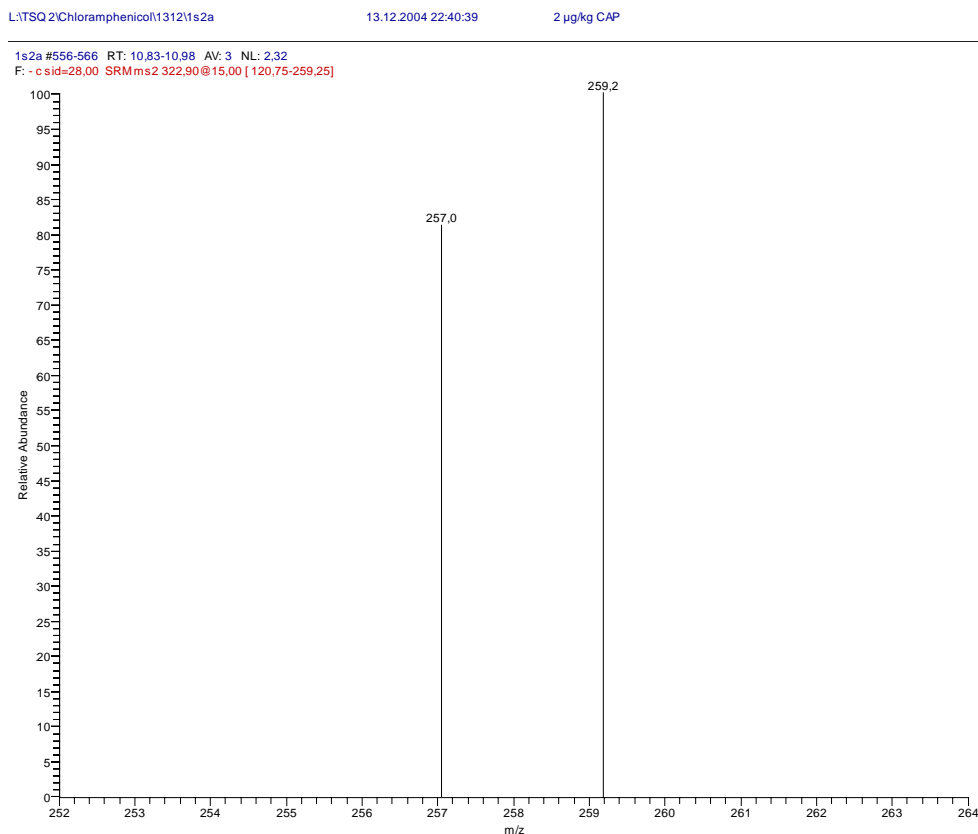
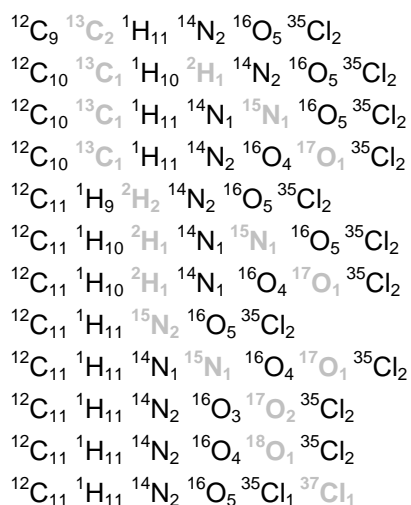


Abb. 3-49. Verhältnis der Fragmente m/z 257 und m/z 259

Die Masse 323 wird von 12 Isobaren des CAP gebildet (siehe Tab. 3-7), die sich mit konventionellen Massenspektrometern nicht auflösen lassen (siehe Anhang 1 bis 3). Ein 1:1 Verhältnis bei der Bildung der Fragmente m/z 257 und m/z 259 kann nur von dem Isobaren mit $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$ gebildet werden. Der erhöhte Anteil des Fragmentes m/z 259 kann auf die Isotope der anderen im Chloramphenicol-Molekül $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5\text{Cl}_2$ enthaltenen Atome zurückgeführt werden. Diese Atome wie Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff kommen als Isotope mit einer um eins bzw. zwei (für Sauerstoff) erhöhten Masse vor. Die relative Häufigkeit dieser Isotope ist zwar sehr gering (siehe Tab. 3-6), jedoch sind mehrere Kombinationen möglich (in der Tab. 3-7 hellgrau dargestellt), die eine Masse von 323 ergeben. Nur eine Kombination davon ist auf ^{37}Cl zurückzuführen, die anderen ergeben auch unter Abspaltung von ^{35}Cl ein Fragment von m/z 259, was die erhöhte Häufigkeit dieses Fragmentes erklärt. Eine bevorzugte Fragmentierung auf m/z 259 kann weiterhin mit dem kinetischen Isotopeneffekt erklärt werden. Moleküle mit einem schwereren Isotop reagieren langsamer als solche mit einem leichteren Isotop [3]. Die Abspaltung von HCl mit ^{35}Cl erfolgt schneller als mit ^{37}Cl und erhöht somit zusätzlich die Intensität des Fragmentes m/z 259, wie es in Abb. 3-49 beobachtet wird.

Nuklid	Nuklid-masse [u]	Relative Häufigkeit [%]
¹ H	1,007825	99,9855
² H	2,014102	0,0145
¹² C	12,000000	98,892
¹³ C	13,003354	1,108
¹⁴ N	14,003074	99,6337
¹⁵ N	15,000108	0,3663
¹⁶ O	15,994915	99,759
¹⁷ O	16,999133	0,037
¹⁸ O	17,999160	0,204
³⁵ Cl	34,968851	75,53
³⁷ Cl	36,965898	24,47

Tab. 3-7. Relative Isotopen-Häufigigkeit [97]



Tab. 3-6. Isotopen-Kombinationen für CAP, die eine Masse von 323 ergeben

Für das 5-fach deuterierte Chloramphenicol (Abb. 3-50) erhält man die analogen Fragmente in derselben Häufigkeitsverteilung, nur dass alle Fragmente um fünf Massen erhöht sind.

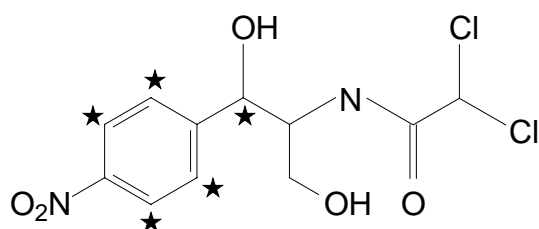


Abb. 3-50. 5-fach deuteriertes Chloramphenicol - die Sterne markieren die deuterierten Stellen

Eine Ausnahme ist das Fragment m/z 176. Für CAP-d5 bildet sich das um vier Massen erhöhte Fragment m/z 180 (Abb. 3-51), da im Gegensatz zu den anderen Fragmenten in diesem Fall ein Deuterium abgespalten wird.

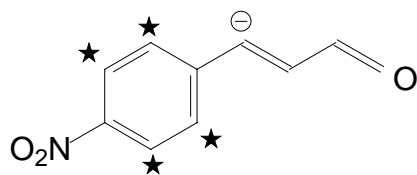


Abb. 3-51. Fragment m/z 180 ($C_9H_2D_4N_1O_3$), das sich aus CAP-d5 bildet

3.2.5. Kopplung mit der online-SPE

Um bei schwierigen Matrices eine bessere Aufreinigung zu erzielen, kann diese Methode ebenfalls mit der online-SPE gekoppelt werden. In diesem Fall sind das Gradientenprogramm und das Steuerungsprogramm der APPLICA SP2000 Probenvorbereitungseinheit gemäß der Methode 2.3 zu verwenden. Das Injektionsvolumen beträgt 200 μ L, wodurch eine Aufkonzentrierung des Analyten erzielt und die Empfindlichkeit der Methode gesteigert wird. Ein weiterer positiver Effekt besteht darin, dass das Massenspektrometer weniger verschmutzt wird und dadurch seltener gereinigt werden muss.

3.3. Bestimmung von CAP mittels online-SPE-LC-MS/MS

(vergl. Methode 2.3)

Die unter 3.2.5. beschriebene Kopplung der Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP2000 mit der LC-MS/MS ermöglicht eine sehr einfache und praktisch komplett automatisierte Analyse des Chloramphenicols.

3.3.1. Aufarbeitung

Die hohe Selektivität und Empfindlichkeit der LC-MS/MS gepaart mit der automatisierten Festphasenextraktion ermöglichen eine höchst einfach durchzuführende Aufarbeitung.

Die Aufarbeitung nach 2.3.5.1 beinhaltet für alle Bienenprodukte außer Bienenwachs nur das Lösen der Probe, die Zentrifugation und die Mikrofiltration des Überstandes. Dies bedeutet eine starke Harmonisierung der Aufarbeitung.

3.3.1.1. Einwaage

Die Einwaage ist für alle Bienenprodukte identisch, was einen großen Vorteil für den Routinebetrieb darstellt, da Fehlermöglichkeiten reduziert werden und sowohl der Einwaage- als auch der Aufarbeitungsschritt beschleunigt werden.

3.3.1.2. Wahl des Extraktionsmittels

Für das Lösen der Probe wurden verschiedene Möglichkeiten getestet. Die Basis bildete jeweils Reinstwasser, das mit verschiedenen Zusätzen versetzt wurde. Für eine bessere Extraktion des Chloramphenicols wurden verschiedene Konzentrationen an Methanol zugesetzt. Ein Zusatz von 5 bis 20 % Methanol führt zu keiner Verbesserung der Wiederfindung. Bei höheren Konzentrationen nahm die Wiederfindung ab, da das Chloramphenicol an der RP18-Phase der online-Festphasenkartusche schlechter retardiert wird. Bereits beim Aufspülen ist der Anteil des organischen Lösungsmittels und damit die Elutionskraft so hoch, dass das Chloramphenicol teilweise nicht zurückgehalten und in den Abfall gespült wird.

Gelée Royale

Ein wichtiger Aspekt für die Analyse des Gelée Royales ist der pH-Wert der resultierenden Lösung. Zur Neutralisierung wurden verschiedene Basen verwendet. Der Vergleich der Empfindlichkeit wurde jeweils auf das Lösen in Wasser bezogen (Abb. 3-52).

Eine Neutralisierung mit Natriumhydroxid führte zu einer Verbesserung der Empfindlichkeit (Abb. 3-54), die mit dem Lösen in 1 molarer Ammoniumacetat-Lösung (Abb. 3-55) vergleichbar ist. Da die schwerflüchtigen Natrium-Ionen des Natriumhydroxids sich eventuell bei der Festphasenextraktion nicht komplett entfernen lassen und somit auf die Trennsäule und ins MS gelangen, wo sie zu Ablagerungen an der Ionenquelle des Massenspektrometers führen können, wurde der Ansatz einer Neutralisation mit NaOH nicht weiter verfolgt.

Die Neutralisierung mit Ammoniak führte, wie bereits in anderen Versuchen gezeigt werden konnte (siehe 3.2.1.2), für CAP-d5 zu einer stärkeren Zunahme der Empfindlichkeit als für CAP. Zusätzlich wirkte sich die Empfindlichkeitssteigerung für die Massenspur 326 stärker aus als für die Massenspur 328 (Vergleich Abb. 3-53).

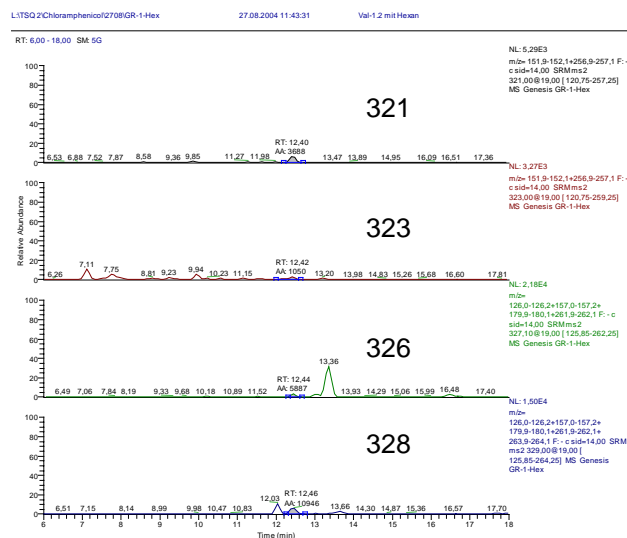


Abb. 3-52. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.3.5.1. beschriebenen Aufarbeitung mit Austausch der 5 molaren Ammoniumacetat-Lösung gegen Wasser vorbereitet wurde.

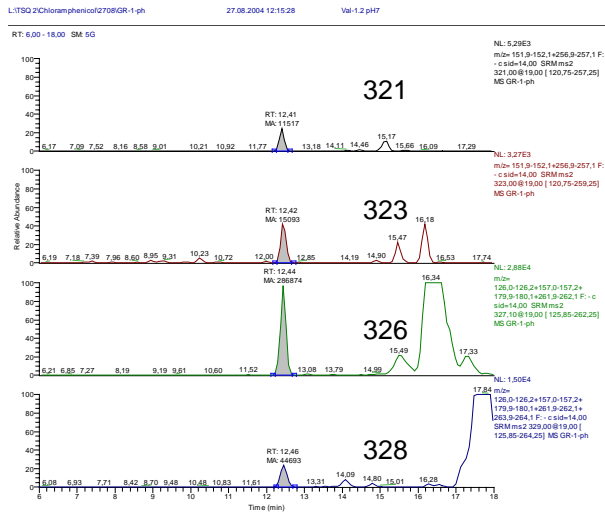


Abb. 3-53. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.3.5.1. beschriebenen Aufarbeitung mit Austausch der 5 molaren Ammoniumacetat-Lösung gegen Wasser vorbereitet und anschließend mit Ammoniak-Lösung neutralisiert wurde

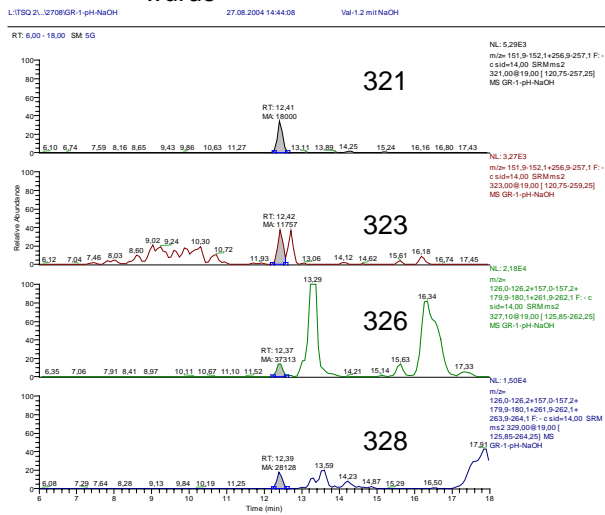


Abb. 3-54. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.3.5.1. beschriebenen Aufarbeitung mit Austausch der 5 molaren Ammoniumacetat-Lösung gegen Wasser vorbereitet und anschließend mit NaOH-Lösung neutralisiert wurde

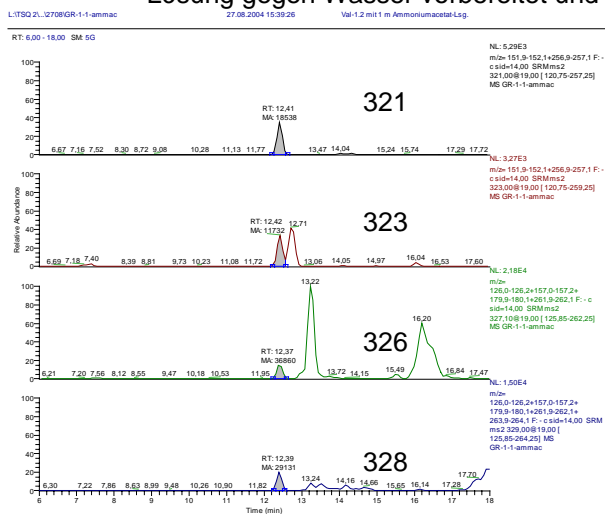


Abb. 3-55. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.3.5.1. beschriebenen Aufarbeitung mit Austausch der 5 molaren Ammoniumacetat-Lösung gegen 1 molare Ammoniumacetat-Lösung vorbereitet wurde

Da mit der mittels Ammoniumacetat gepufferten Lösung des Gelée Royales im Vergleich zur ungepufferten wässrigen Lösung eine gute und gleichmäßige Empfindlichkeitssteigerung für alle Massenspuren erzielt werden konnte (Vergleich Abb. 3-52 und 3-55), wurden weitere Versuche mit Ammoniumacetat-Lösungen unterschiedlicher Konzentration gemacht. Ammoniumacetat hat den Vorteil, dass es flüchtig ist und sich somit für die LC-MS-Analytik eignet.

Die beste Wiederfindung erhält man mit einer 5 molaren Ammoniumacetat-Lösung (Vergleich Abb. 3-56 und 3-57). Konzentrationen größer oder kleiner als 5 molar führen zu einer Verschlechterung der Empfindlichkeit. Daher wurde diese Konzentration für die endgültige Aufarbeitung gewählt (vergl. 2.3.5.1). Einerseits muss mit dieser hoch konzentrierten Lösung gearbeitet werden, damit eine Neutralisierung des Gelée Royales erfolgt, andererseits darf die Ammoniumacetat-Lösung nicht zu hoch konzentriert sein, da sie sonst zu viskos wird und sich somit schlecht mikrofiltrieren und mittels Autosampler injizieren lässt.

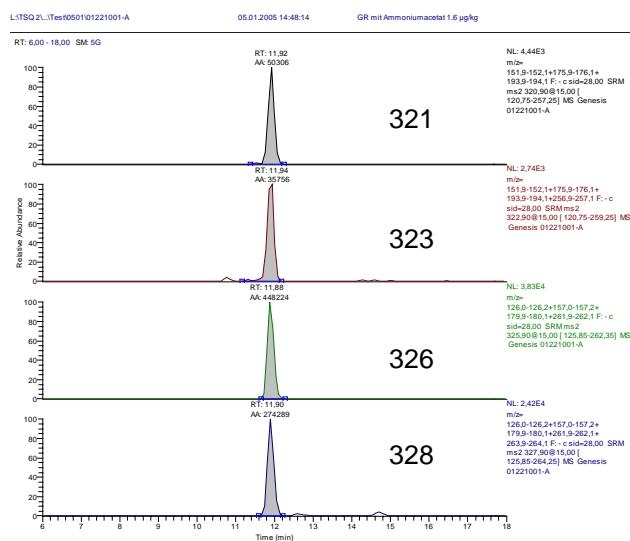


Abb. 3-56. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.3.5.1. beschriebenen Aufarbeitung vorbereitet wurde

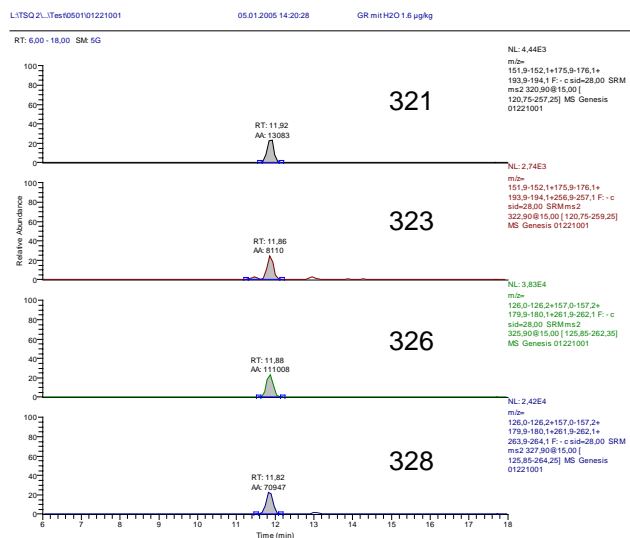


Abb. 3-57. Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.3.5.1. beschriebenen Aufarbeitung mit Austausch der 5 molaren Ammoniumacetat-Lösung gegen Wasser vorbereitet wurde

Honig, Pollen

Für Honig und Pollen erreicht man zwar auch beim Lösen in Reinstwasser eine gute Empfindlichkeit, die jedoch durch den Austausch durch 5 molare Ammoniumacetat-Lösung nicht wesentlich beeinflusst wird. Daher wurde zur Harmonisierung der Methode für alle Bienenprodukte die 5 molare Ammoniumacetat-Lösung gewählt.

3.3.1.3. Carrez-Fällung

Gelée Royale

Die Carrez-Klärung wird zur Entfernung von Proteinen eingesetzt (vergl. 3.1.1.3). Nach dem Lösen in 5 molarer Ammoniumacetat-Lösung führt eine Carrez-Klärung jedoch zu einer vollständigen Unterdrückung der Signale für CAP und CAP-d5 (Vergleich 3-58 und 3-59).

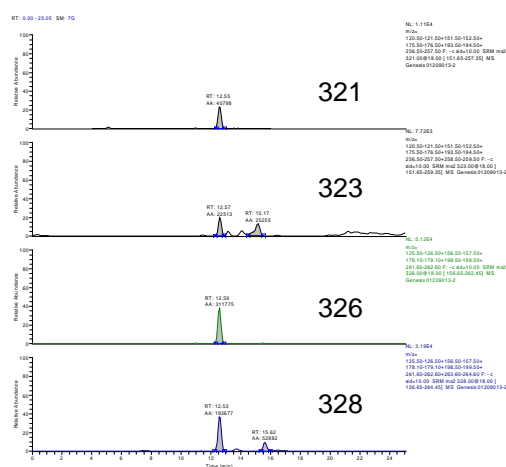


Abb. 3-58.

Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.3.5.1. beschriebenen Aufarbeitung vorbereitet wurde

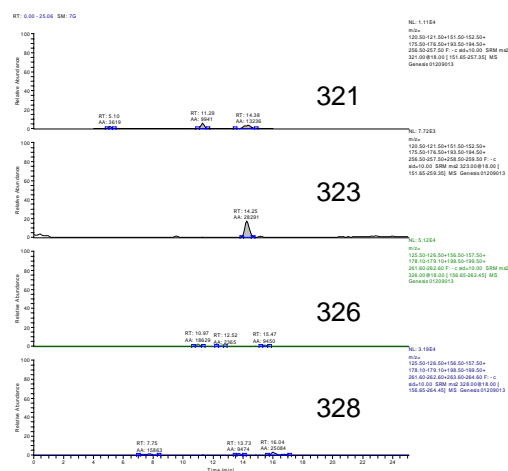


Abb. 3-59.

Chromatogramm eines mit CAP kontaminierten frischen Gelée Royales, das gemäß der unter 2.3.5.1. beschriebenen Aufarbeitung mit zusätzlicher Carrez- Klärung vorbereitet wurde

Da der Zusatz von jeweils 200 µl Carrez I- und II-Lösung zur Probelösung zu einer Erniedrigung des pH-Wertes auf < 3 führt, die auch durch das Ammoniumacetat nicht abgepuffert werden kann, ist anzunehmen, dass die Unterdrückung der CAP-Signale auf ein pH-Wert-Problem zurückzuführen ist.

3.3.1.4. Entfettung mit Hexan

Gelée Royale

Die Entfettung mit Hexan hat bei der Analyse mittels online-Festphasenextraktion keinen Einfluss auf die Wiederfindung und auf die Matrixstörung im Chromatogramm, daher wurde auf diesen zusätzlichen Aufarbeitungsschritt verzichtet.

3.3.2. online-SPE

Bei dieser Methode ersetzt die online-SPE die komplette manuelle Aufarbeitung. Der Analyt wird von den Matrixbestandteilen weitestgehend isoliert und aufkonzentriert.

3.3.2.1. Auswahl des Festphasenmaterials

Die Eignung des Festphasenmaterials RP18 wurde bereits für die online-SPE-LC-MS-Methode überprüft (vergl. 3.1.2). Zusätzlich wurde eine RP8-Phase getestet, die sich aber aufgrund geringerer Wiederfindungen als ungeeignet erwies.

3.3.2.2. Auswahl der Wasch- und Elutionslösungen

Wie unter 3.1.2.4 beschrieben, wurden für die CAP-Analyse mittels online-SPE-LC-MS Wasser mit einem geringen Methanol-Anteil (5 %) als Wasch- und Methanol als Elutionslösung verwendet. Bei der unter 3.1 beschriebenen Analyse mittels LC-MS wurde jedoch ein bereits durch Flüssig-flüssig-Extraktion aufgereinigter Extrakt auf die Festphasen-Kartusche injiziert. Die Aufarbeitung für die online-SPE-LC-MS/MS beinhaltet nur ein Lösen der zu analysierenden Probe, daher werden mehr Matrixbestandteile auf die Kartusche transferiert. Um die Matrix besser vom Analyten abtrennen zu können, wurden verschiedene Lösungsmittelanteile sowie -zusätze für die Waschlösung zur Reinigung der Festphasen-Kartusche getestet. Ziel war es, eine Waschlösung zu erhalten, die die störenden Matrix-Begleitstoffe weitestgehend entfernt, ohne zu Analyt-Verlusten zu führen und damit das Signal/Rausch-Verhältnis zu steigern.

Die Verwendung von Reinstwasser mit einem Anteil von 5 - 10 % Methanol oder 5 % Isopropanol als Waschlösung für die Festphasenkartusche hat keinen Einfluss auf die Elutionskraft und somit auf die Wiederfindung, jedoch wird auch keine Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses erreicht.

Die Erhöhung des organischen Anteils auf 15 % Methanol oder 10 % Isopropanol führt dazu, dass das CAP nicht mehr ausreichend auf der SPE-Kartusche zurückgehalten wird. Es kommt zu Analyt-Verlusten, die sich in schlechteren Wiederfindungen äußern.

Da ein erhöhter Anteil organischen Lösungsmittels keinen positiven Einfluss auf die Chromatographie hatte, wurde als Waschlösung Reinstwasser mit einem Zusatz von 5 % Methanol beibehalten. Methanol wurde dem Lösungsmittel Isopropanol vorgezogen, da bezüglich eines Methanolzusatzes zur Waschlösung bereits Erfahrungen vorlagen (vergl. 2.1.1.4).

Als Elutionslösung können sowohl reines Methanol als auch Methanol/Acetonitril (v/v 50/50) verwendet werden. Bei beiden ist kein Unterschied in der Wiederfindung und im Signal/Rausch-Verhältnis zu beobachten.

3.3.3. Chromatographie

Die chromatographischen Bedingungen wurden komplett von der LC-MS/MS-Methode übernommen (vergl. 3.2.2).

3.3.4. Massenspektrometrie

Auch die massenspektrometrischen Bedingungen wurden komplett von der LC-MS/MS-Methode übernommen (vergl. 3.2.3)

3.3.5. Quantifizierung

Die Validierung unter 3.5.3 zeigt, dass diese Methode im unteren Konzentrationsbereich zu niedrige Werte liefert. Dies könnte auf ein durch Matrixstörungen erhöhtes Untergrundrauschen oder auf Suppressionseffekte zurückgeführt werden, was sich in niedrigeren Konzentrationsbereichen stärker bemerkbar macht.

Ammoniumacetat wirkt sich zudem auf die Empfindlichkeit des CAP aus. Eine Standardlösung derselben Konzentration, einmal mit Wasser und einmal mit 5 molarer Ammoniumacetatlösung angesetzt, verdeutlicht dieses: Vergleicht man die Chromatogramme dieser Lösungen miteinander (siehe Abb. 3-60 und 3-61) wird deutlich, dass sowohl für CAP als auch für CAP-d5 die Empfindlichkeit abnimmt, wenn die Standardlösung mit 5 molarer Ammoniumacetatlösung angesetzt wird. Daher gilt auch hier der Grundsatz, dass die Standardlösung in derselben Lösung angesetzt werden muss, in der der Probenextrakt gelöst ist.

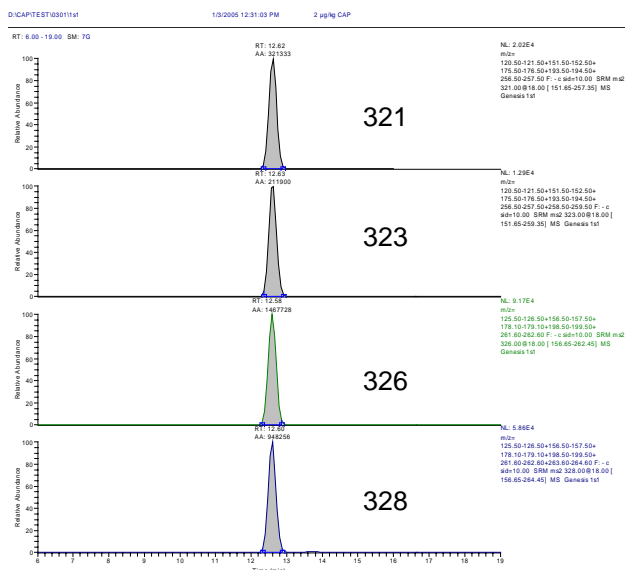


Abb. 3-60. Chromatogramm einer Standardlösung, die mit Wasser angesetzt wurde

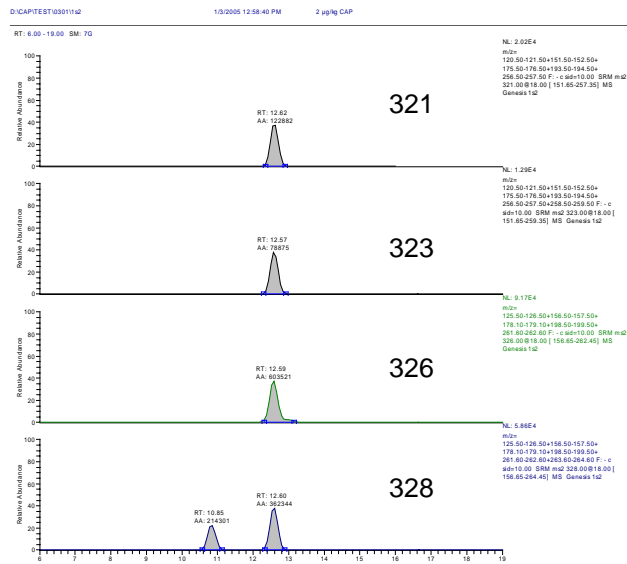


Abb. 3-61. Chromatogramm einer Standardlösung, die mit 5 molarer Ammoniumacetatlösung angesetzt wurde

Um diese Methode mit der LC-MS/MS-Methode vergleichen zu können, wurden ein nachweislich mit Chloramphenicol belasteter Honig und ein kontaminiertes Gelée Royale, die zuvor mit der alten Aufarbeitung mittels LC-MS/MS analysiert worden waren, mit der neuen Methode gemessen. Für beide wurde mit der neuen Methode im Rahmen der Messunsicherheit dasselbe Ergebnis ermittelt wie mit der alten Methode (vergl. Abb. 3-62 und 3-63):

Honig: 1,0 µg/kg, altes Ergebnis mittels LC-MS/MS: 1,1 µg/kg
 Gelee Royale: 1,5 µg/kg, altes Ergebnis mittels LC-MS/MS: 1,6 µg/kg

Für höhere Konzentrationen wird somit für die Analyse der nur in 5 molarer Ammoniumacetatlösung gelösten Probe mittels der online-SPE-LC-MS/MS dasselbe Ergebnis erhalten wie mittels LC-MS/MS-Analyse des zuvor mit Ethylacetat gereinigten Extraktes.

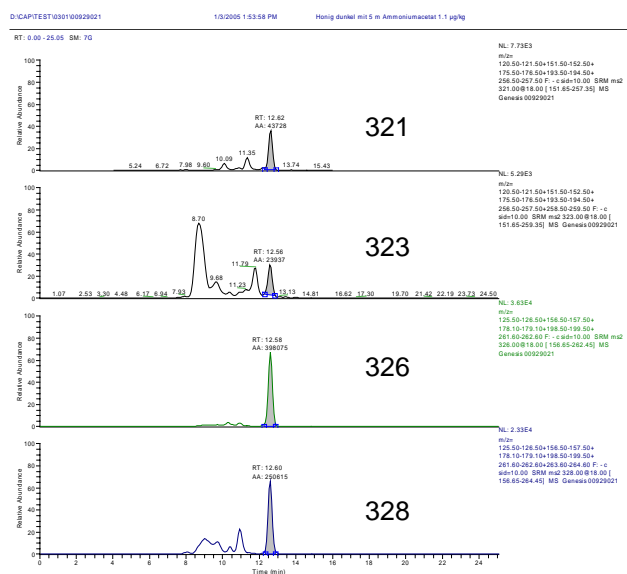


Abb. 3-62. Chromatogramm eines Honigs, der mittels der online-SPE-LC-MS/MS-Methode analysiert wurde (Ergebnis: 1,0 µg/kg – Ergebnis mittels LC-MS/MS: 1,1 µg/kg)

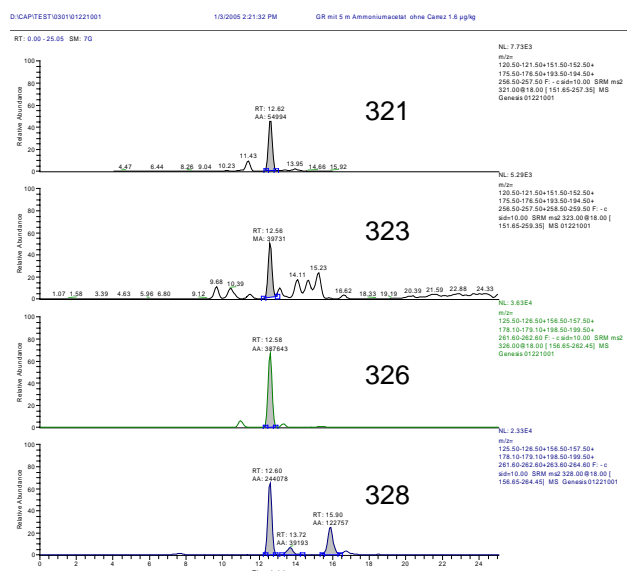


Abb. 3-63. Chromatogramm eines Gelee Royales, das mittels der online-SPE-LC-MS/MS-Methode analysiert wurde (Ergebnis: 1,5 µg/kg – Ergebnis mittels LC-MS/MS: 1,6 µg/kg)

Wie die Abbildung 3-64 zeigt, wird für unbelastete Honige ein sauberes Chromatogramm mit wenig Matrixstörungen erhalten, das eine sichere Aussage darüber zulässt, ob eine Probe mit CAP belastet ist.

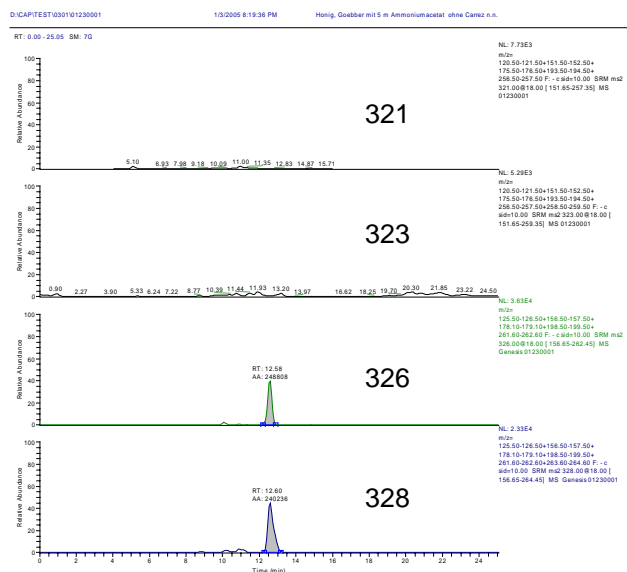


Abb. 3-64. Chromatogramm eines mit CAP unbelasteten Honigs, der mittels online-SPE-LC-MS/MS analysiert wurde

Gemäß 3.5.3.3 und 3.5.3.7 kann eine Bestimmungsgrenze von 0,3 µg/kg und somit der MRPL-Wert mit dieser Methode erreicht werden. Bei Dotierungsversuchen war die Wiederfindung in diesem Bereich mit < 70 % für Honig und < 50 % für Gelee Royale jedoch nicht zufriedenstellend. Daher ist in den meisten Fällen eine Quantifizierung mittels dieser Methode nicht möglich. Jedoch eignet sie sich sehr gut als Screening auf CAP-Belastungen $\geq 0,3$ µg/kg. Dies ist speziell von Vorteil, wenn schnelle Aussagen über eine eventuelle Belastung einer Probe mit CAP getroffen werden müssen (z. B. auf Kundenwunsch in einem Auftrags-Labor), da Aufarbeitung und Analyse zusammen nicht mehr als eine Stunde in Anspruch nehmen. Des

Weiteren kann das unter 2.3.1 bis 2.3.3. beschriebene Trennsystem sehr gut für beide Aufarbeitungen (siehe 2.2.4 und 2.3.5) ohne weiteren Umbau der Anlagen genutzt werden. So können alle Proben zunächst mittels dieser Methode auf CAP-Konzentrationen $\geq 0,3 \mu\text{g/kg}$ gescreent werden, und nur Positiv-Befunde müssten zur genaueren Quantifizierung mit der aufwändigeren Probenaufarbeitung erneut analysiert werden.

Dies System kann aus Kostengründen den ELISA-Test (siehe 2.5) selbstverständlich nicht ersetzen. Es ist aber von Vorteil, wenn sehr schnelle Ergebnisse benötigt werden oder die LC-MS/MS nicht ausgelastet ist.

3.4. Abhängigkeit der Chloramphenicol-Analyse von Art und Beschaffenheit des Bienenproduktes

3.4.1. Honig

Die breite natürliche Vielfalt von Honigen (vergl. 1.1.4) wirkt sich auch auf die Analytik aus.

Die Extraktion des Chloramphenicols und die sich anschließende Chromatographie werden dabei einerseits stark von der Sorte, andererseits von der Herkunft des Honigs beeinflusst. Um dies anhand von Chromatogrammen deutlich zu machen, wurden Honige verschiedener Tracht und Herkunft, die nicht mit CAP belastet waren, mit $1 \mu\text{g/kg}$ Chloramphenicol dotiert und mittels LC-MS/MS analysiert.

Als Grundsatz gilt: Je dunkler der Honig, desto schwieriger ist die Analyse. Dies äußert sich durch schlechte Wiederfindungen und starke Matrixstörungen bzw. hohes Grundrauschen. Waldhonige sind dunkler als Blütenhonige und unterscheiden sich durch die Rohstoffe, die von der Biene zur Produktion des Honigs gesammelt werden (siehe 1.1.3). Die unterschiedlichen Rohstoffe wirken sich auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Honigs aus. So haben beispielsweise Waldhonige im allgemeinen einen höheren pH-Wert und eine höhere elektrische Leitfähigkeit. Insgesamt sind Waldhonige schwieriger auf CAP zu analysieren als Blütenhonige. Der Vergleich der Chromatogramme dieser beiden Honigarten (Abb. 3-65 und 3-66) zeigt, dass für Blütenhonig eine deutlich bessere Wiederfindung für das CAP (in diesem Fall das Dreifache) gegeben ist.

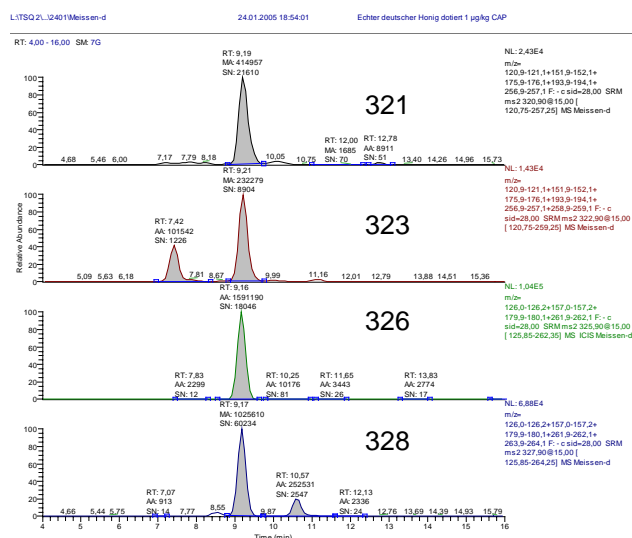


Abb. 3-65. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Deutschen Blütenhonigs, der mittels LC-MS/MS analysiert wurde

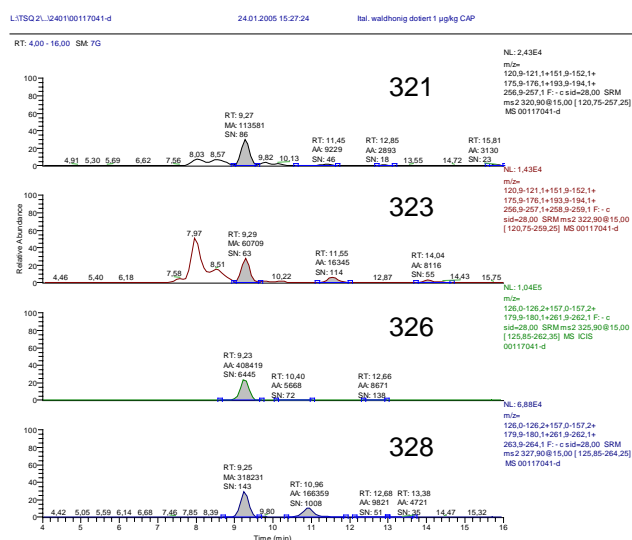


Abb. 3-66. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Italienischen Waldhonigs, der mittels LC-MS/MS analysiert wurde

Jedoch gibt es auch Unterschiede unter den Blütenhonigen. Sehr helle Honige wie Akazienhonig, Raps oder Klee-Honig zeigen kaum Matrixstörungen und eine gute Wiederfindung, während dunklere Sorten, wie z. B. Heidehonig, Chromatogramme mit hohem Grundrauschen und großen Stör-Peaks erzeugen. Die Wiederfindungsrate ist ebenfalls schlechter (vergl. Abb. 5-67 bis 3-69). Dies lässt sich durch die unterschiedlichen Nektarinhaltsstoffe der einzelnen Pflanzen erklären.

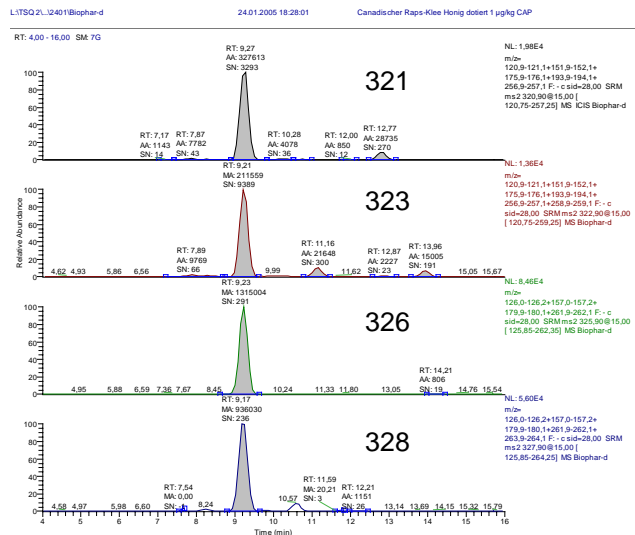


Abb. 3-67. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Canadischer Raps-Klee-Honigs, der mittels LC-MS/MS analysiert wurde

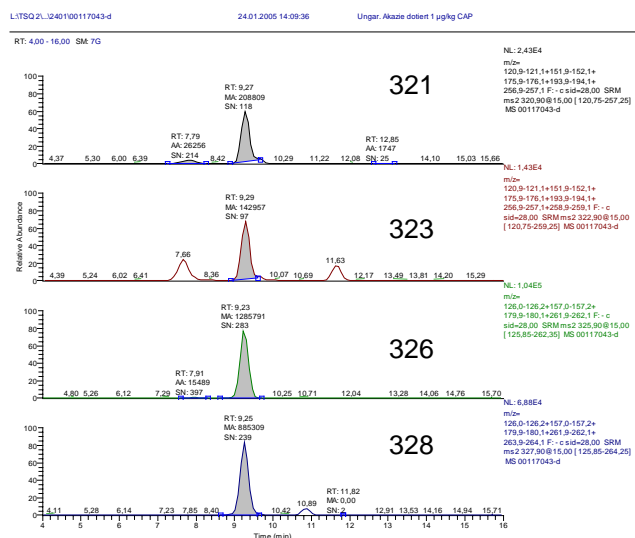


Abb. 3-68. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Ungarischer Akazienhonigs, der mittels LC-MS/MS analysiert wurde

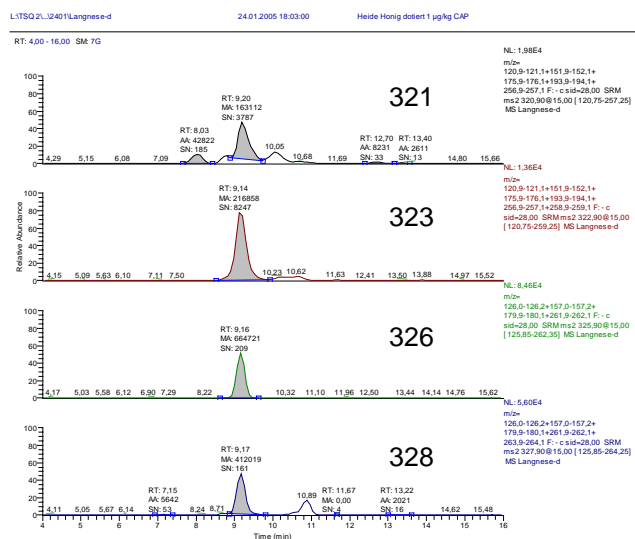


Abb. 3-69. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Heide-Honigs, der mittels LC-MS/MS analysiert wurde

Je nach Region setzt sich der Honig aufgrund des variierenden Pflanzenangebots aus unterschiedlichen Trachten zusammen. Die unterschiedliche chemische Zusammensetzung des Nektars wirkt sich auch hier auf den Honig und somit auf die CAP-Analyse aus. So ist z.B. ein Honig aus Brasilien (Abb. 3-72) oder Argentinien (Abb. 3-71) schwieriger zu analysieren als ein Honig aus West (Abb. 3-65) - oder Osteuropa (Abb. 3-70). Es ist zu vermuten, dass Honig aus Ländern mit einem großen Pflanzenreichtum wie beispielsweise Brasilien eine größere Anzahl unterschiedlicher chemischer Verbindungen enthält, die die Analyse stören können, als Honig aus Ländern, in denen Monokulturen (z. B. deutscher Raps) vorherrschend sind.

Bei manchen Honigen sind im Chromatogramm sogenannte Fingerprints zu erkennen. Das sind Signale im Chromatogramm, die in fast jedem Honig dieser Sorte und/oder Herkunft vorkommen und zu seiner Identifizierung genutzt werden können. Zurückzuführen sind sie auf charakteristische chemische Verbindungen, die aufgrund der gesammelten Tracht in jedem Honig dieser Sorte bzw. Region vorkommen.

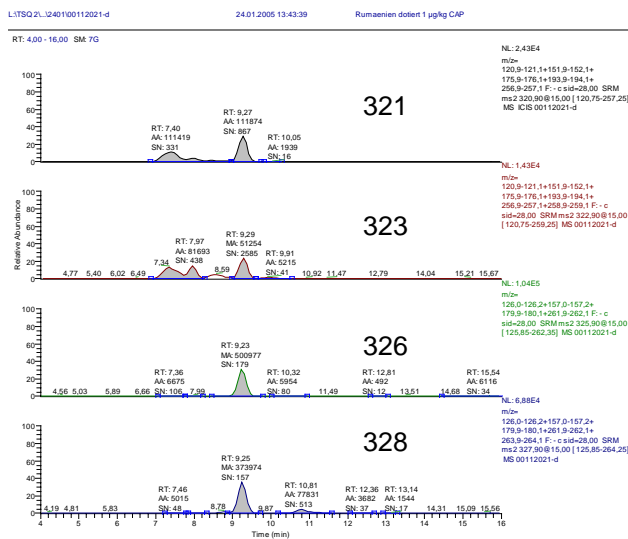


Abb. 3-70. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Rumänischen Blütenhonigs, der mittels LC-MS/MS analysiert wurde

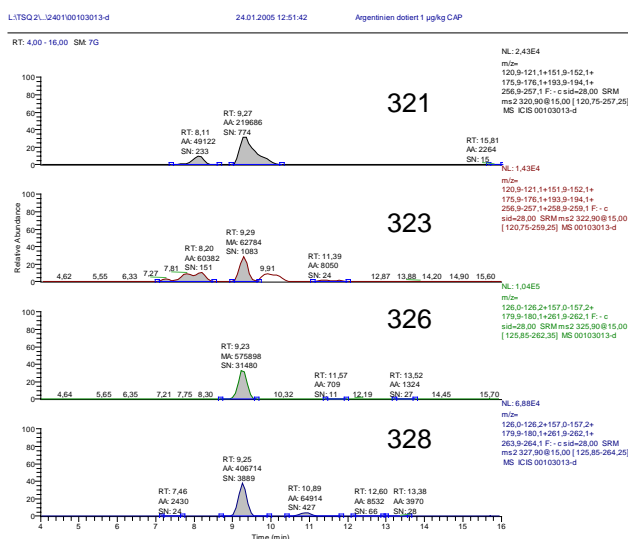


Abb. 3-71. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Argentinischen Blütenhonigs, der mittels LC-MS/MS analysiert wurde

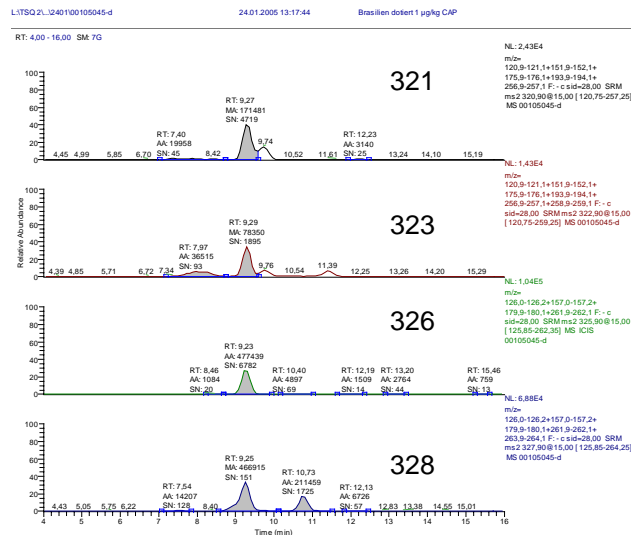


Abb. 3-72. Chromatogramm eines mit 1 µg/kg CAP dotierten Brasilianischen Blütenhonigs, der mittels LC-MS/MS analysiert wurde

Des Weiteren konnte über die mehrjährige Analyse von Chloramphenicol in Honig beobachtet werden, dass sich die Honige auch abhängig von den unterschiedlichen jährlichen Ernten unterscheiden. So musste z. B. für die neue Ernte mexikanischer Yucatan-Honige und chilenischer Honige das Gradienten-Programm für die LC-MS/MS-Methode verlängert und teilweise mit einer Carrez-Klärung gearbeitet werden, um Matrixstörungen, die den CAP-Peak überlagerten, zu verschieben oder zu entfernen. In diesem Zusammenhang war auch beim CAP-ELISA-Test eine Zunahme der Falsch-Positiv-Befunde im unteren Konzentrationsbereich (0,1 - 0,3 µg/kg) zu verzeichnen. Ähnliche Erfahrungen wurden für diese beiden Honigtypen auch bei der Analyse von Sulfonamiden, Tetracyclinen und Streptomycin gemacht. Dies macht deutlich, dass für die Analyse von Rückständen in Honig bzw. Bienenprodukten keine abschließend gültige Methode erstellt werden kann. Da Bienenprodukte Naturprodukte sind und dementsprechend starken Schwankungen in ihren Zusammensetzungen abhängig von ihrer botanischen und geographischen Herkunft, sowie ihres Erntejahres unterliegen, müssen die verwendeten Analysemethoden ständig angepasst werden.

3.4.2. Gelée Royale

Frische Gelée Royales zeigen sehr starke Unterschiede bei der Analyse auf Chloramphenicol. Einige lassen sich mit sehr guten Wiederfindungen analysieren, während andere starke Matrixstörungen zeigen. Bisweilen können einige Gelée Royale Proben nicht mit der Standard-Aufarbeitung analysiert werden, stattdessen muss eine Abwandlung der Probenvorbereitung erfolgen (z. B. durch Carrez-Fällung) oder es muss auf das Prinzip der Propolis-Aufarbeitung zurückgegriffen werden (vergl. 3.2.1.3). Dies scheint sich, ebenso wie beim Honig, auf eine unterschiedliche chemische Zusammensetzung zurückzuführen zu lassen, jedoch konnten keine deutlichen Regelmäßigkeiten, was regionale Herkunft oder Farbe betrifft, erkannt werden. Ein Hinweis auf eine eventuelle regionale Abhängigkeit gab die Tatsache, dass Gelée Royale Proben einzelner bestimmter Kunden sich auffällig schwer analysieren ließen.

Deutlich erkennbar ist jedoch, dass beim lyophilisierten Gelée Royale schlechtere Wiederfindungen erreicht werden als beim frischen Gelée Royale. Erklären lässt sich

das damit, dass das lyophilisierte Gelée Royale aufgrund des Wasserentzuges höher konzentriert ist, wodurch die Extraktion erschwert wird.

3.4.3. Blütenpollen

Blütenpollen unterscheiden sich ebenfalls in ihrer Analysierbarkeit auf Chloramphenicol. Der Unterschied macht sich jedoch bei der Analyse mittels online-SPE-LC-MS, vermutlich aufgrund der schlechteren Selektivität dieser Methode, stärker bemerkbar als bei der Detektion mittels Tandem-MS. Daher wurden für die online-SPE-LC-MS zwei Möglichkeiten der Probenvorbereitung entwickelt.

Erklären lassen sich die Unterschiede auch hier durch die Abweichungen des Ausgangsmaterials in der chemischen Zusammensetzung, die sich aufgrund der unterschiedlichen regionalen Herkunft und Tracht ergeben.

3.4.4. Propolis

Propolis ist das am schwierigsten zu analysierende Bienenprodukt (vergl. 3.2.1.3). Es weist starke Unterschiede sowohl in seiner Verarbeitungsform (Rohpropolis, Propolis-Extrakt, Propolis-Tinktur) als auch in seiner natürlichen chemischen Zusammensetzung auf. Es wird von den Bienen aus Harz hergestellt, das hauptsächlich von Knospen, aber auch von Blättern, Zweigen oder von der Rinde der Bäume gesammelt wird. Dieses Harz ist je nach Region und der dort vorherrschenden Vegetation sehr unterschiedlich (vergl. 1.5). Daher war es nicht möglich, eine Aufarbeitung zu entwickeln, die sich auf alle Propolis-Proben anwenden ließ. Mit der unter 2.2.4.6 beschriebenen Proben-Vorbereitung lassen sich jedoch die meisten Propolis-Proben aufarbeiten.

3.5. Validierungen

Die EN ISO/IEC 17025 definiert Validierung als die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden [105]. Die Forderung, dass eine Methode für den vorgesehenen Gebrauch geeignet ist, bedeutet, dass der vorgesehene Gebrauch klar beschrieben sein muss und die sich aus der beabsichtigten Anwendung ergebenden besonderen Forderungen spezifiziert sind.

Für die Bestimmung von Chloramphenicol in Bienenprodukten ist es schwierig, eine allgemein gültige Validierung aufzustellen, da sich, wie unter 3.4. beschrieben, die Bienenprodukte je nach Sorte und Herkunft stark unterscheiden. Um mit den Validierungen einen möglichst hohen Anteil der Proben abzudecken, wurde ein handelsüblicher Polyflora-Honig, der am häufigsten produziert und verkauft wird, für alle in dieser Arbeit aufgeführten Validierungen beispielhaft verwendet. Zusätzlich handelt es sich bei Polyflora-Honigen um eine schwierig zu analysierende Matrix, da sie aus Mischungen vieler verschiedener Honige unterschiedlicher Herkunft hergestellt werden. Eine Validierung mit einer schwierigen Matrix sichert die Anwendbarkeit auf möglichst viele Honigtypen.

Alle Berechnungen wurden mit der Validierungssoftware VALOO 1.0 (Copyright © 1999 by analytik-software Dr. Stella Windmann) durchgeführt.

3.5.1. online-SPE-LC-MS (vergl. Methode 2.1)

Für die Validierung wurde das LC-MS-System MSQ von Thermo Finnigan (Single Quadrupole) verwendet.

Die Quantifizierung von CAP erfolgt über einen externen Standard. Das deuterierte Chloramphenicol, das als interner Standard hinzugefügt wird, dient nur der Identifizierung des Chloramphenicols. In die Berechnung fließt der interne Standard CAP-d5 nicht mit ein (vergl. 3.1.4.4.C), weshalb er auch nicht in der Validierung berücksichtigt wurde.

Da die Konzentration des Chloramphenicols nicht wiederfindungskorrigiert wird, werden für die Validierung die Flächeneinheiten und nicht die berechneten Konzentrationen herangezogen.

Die Ergebnis-Berechnung erfolgt für die beiden Massenspuren einzeln, um vergleichen zu können, ob sich für beide Massenspuren derselbe Wert für CAP ergibt (siehe 3.1.4.4.B). Die CAP-Konzentration berechnet sich dann aus dem Mittelwert der beiden Massenspuren. Daher wurden auch beide Massenspuren einzeln validiert.

3.5.1.1. Linearität

Die Linearität ist die Fähigkeit einer Methode, innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereichs Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind [106].

Sie wird durch die bei der Kalibrierung mit verschiedenen Konzentrationen der Chloramphenicol-Standardlösung erhaltenen Regressiongeraden beurteilt. Bei der Messung von Aliquoten einer Standardlösung wird die Linearität der Apparatur und des Detektors geprüft. Im günstigsten Fall ist diese gleich der Linearität der Methode [106].

Die **Steigung b** ist ein Maß für die Empfindlichkeit und damit die Güte der Methode. Je größer die Steigung, um so empfindlicher ist die Methode, desto leichter können kleine Konzentrationsunterschiede noch registriert werden: das bedeutet, dass eine geringe Konzentrations- bzw. Mengenänderung in den Proben zu einer möglichst großen Änderung des Messwertes (Signals) führt.

Ein **Achsenabschnitt a** ungleich 0 bedeutet, dass bei einer Konzentration von 0 ein Signal gemessen wird, dieser Blindwert stellt einen konstanten, systematischen Fehler dar.

Der **Korrelationskoeffizient r** ist ein wichtiges Kriterium für die Linearität, da er ein Maß dafür ist, wie gut eine Korrelation zweier Werte durch eine mathematische Funktion (in diesem Fall eine Gerade) zu beschreiben ist. Er gibt somit den Grad der Anpassung eines mathematischen Modells an die experimentell ermittelten Werte an, während die Güte einer Methode eher mit der Empfindlichkeit (Steigung) zu beurteilen ist.

Die **Reststandardabweichung** ist die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade.

$$s_y = \sqrt{\frac{1}{N-2} \left(Q_{yy} - \frac{Q_{xy}^2}{Q_{xx}} \right)}$$

Formel aus [107]

s_y : Reststandardabweichung des Messwertes

N : Anzahl der gewählten Konzentrationsstufen

X : Konzentration

Y : Messwert

Q_{yy} : Quadratsumme aus Messwert

Q_{xy} : Quadratsumme Messwert und Konzentration

Q_{xx} : Quadratsumme aus Konzentration

Wird nun die Reststandardabweichung auf die Mitte des Arbeitsbereiches normiert (dies geschieht durch Division mit der Steigung), so kann man die **Verfahrensstandardabweichung** errechnen.

$$s_{x0} = \frac{s_y}{b}$$

Formel aus [107]

s_{x0} : Verfahrensstandardabweichung

b : Steigung der Regressionsgeraden

Die Verfahrensstandardabweichung ist ein Maß für die Leistungsfähigkeit der Methode. Sie ist umso leistungsfähiger, je größer die Steigung und je kleiner die Reststandardabweichung ist.

Vorausgesetzt, dass die Messwerte sich auf gleiche Konzentrationen beziehen, erlaubt der **Verfahrensvariationskoeffizient (relative Verfahrensstandardabweichung)** einen Vergleich verschiedener Verfahren [106].

$$V_{x0} = \frac{s_{y0}}{\bar{x}} 100\%$$

Formel aus [107]

V_{x0} : Verfahrensvariationskoeffizient (relative Verfahrensstandardabweichung)

s_{y0} : Standardabweichung des Blindwertes

\bar{x} : Mittelwert der Standardkonzentrationen x_i aus dem Kalibrierexperiment

Die Ermittlung der Linearität erfolgt über die Messung von Aliquoten einer Standardlösung.

	Chloramphenicol Masse 321 (CAP)	Chloramphenicol Masse 323 (CAP-Kontrolle)
% (100 % = 3,83 µg/kg Probe)	3,83 µg/kg	3,83 µg/kg
	Peakfläche	
6,25 %	6152	3958
12,5 %	12270	7686
25%	23369	13596
50 %	74446	45951
100 %	148051	94122
125 %	183726	118225
150 %	224363	142828
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$	$y = a + bx$
Steigung b	40211	25796
Achsenabschnitt a	-7174	-5312
Relative Verfahrensstandard- abweichung [%]	4,4	4,7
Reststandardabweichung	4527	3086
Korrelationskoeffizient	0,9989	0,9988

Tab. 3-8. Linearität

Optischer Linearitätstest: Eine graphische Darstellung der Kalibrierdaten lässt eine Unlinearität vermuten [107].

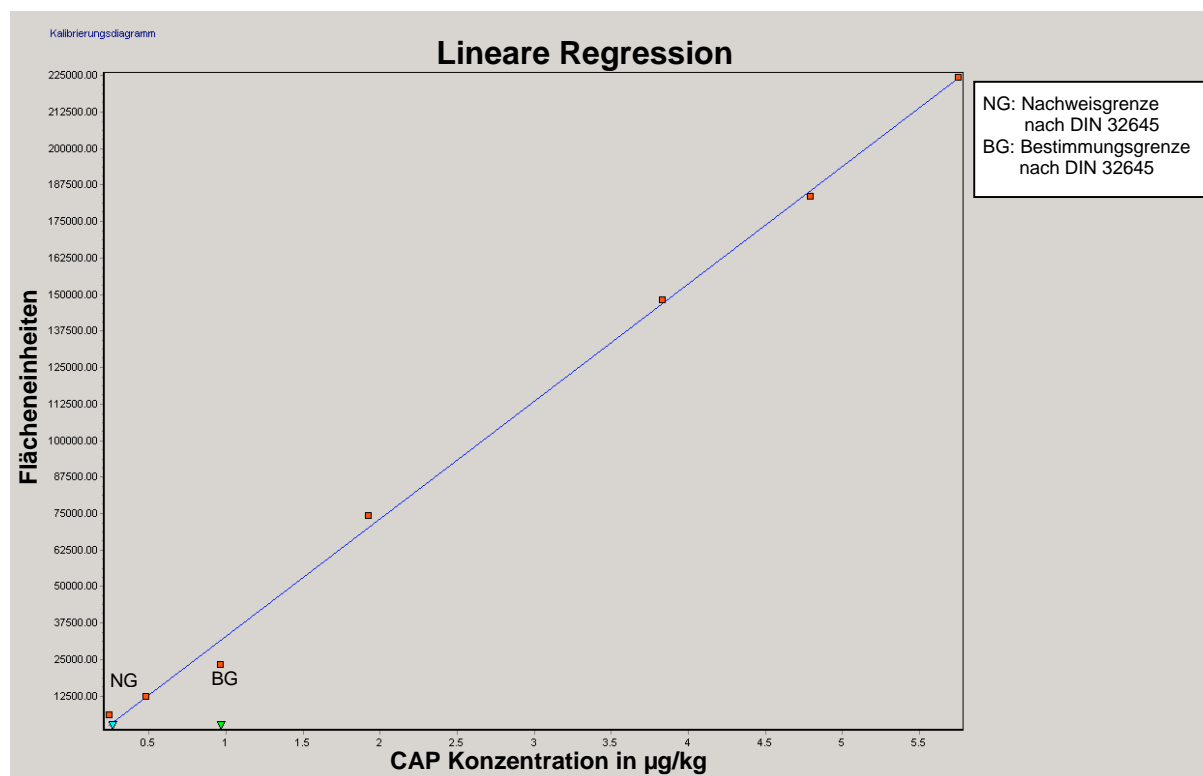


Abb. 3-73. Regressionsgerade für die Masse 321

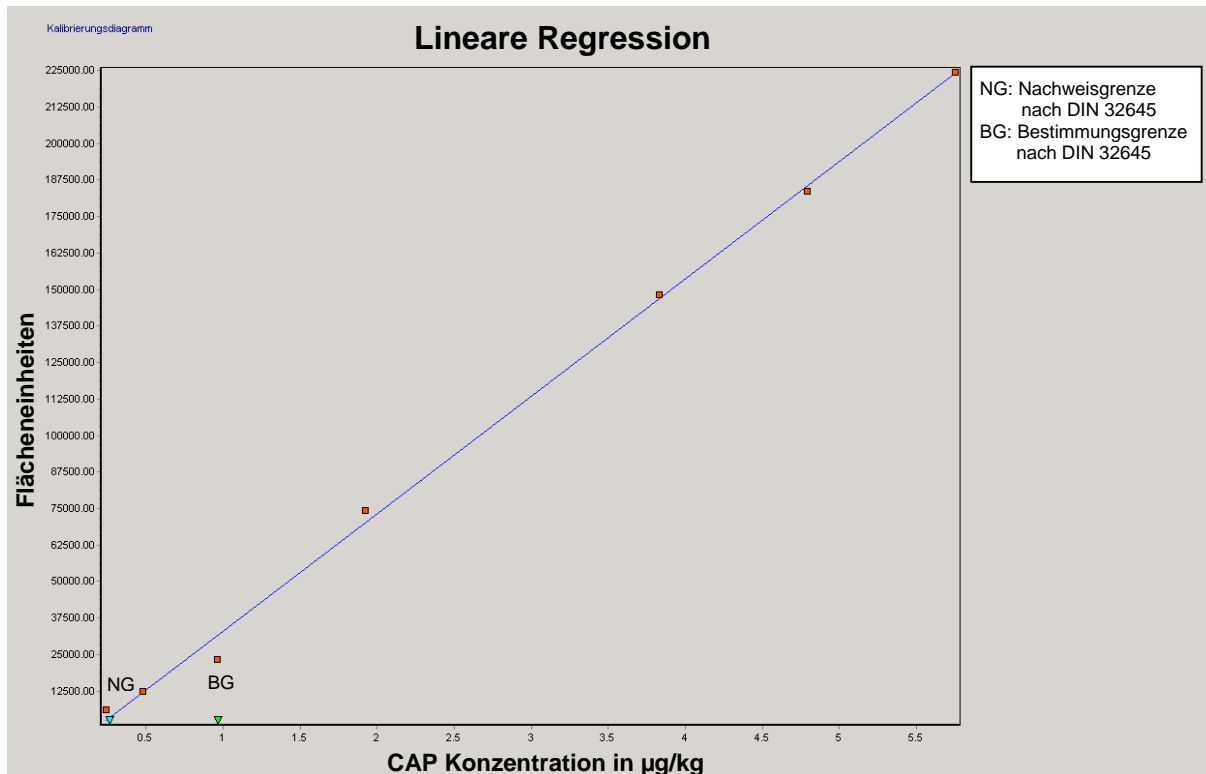


Abb. 3-74. Regressionsgerade für die Masse 323

Sowohl der Korrelationskoeffizient, als auch der optische Linearitätstest lassen für beide Massenspuren eine lineare Kalibrierfunktion erkennen.

3.5.1.2. Präzision

Die Präzision gibt den Grad der Streuung einzelner Werte um den Mittelwert an. Die Streuung ist das Ergebnis von zufälligen Fehlern. Die statistische Größe der Präzision ist die Standardabweichung.

Für die Bestimmung der Präzision des Analyseverfahrens wurde die **Wiederholstandardabweichung** herangezogen. Unter Wiederholstandardabweichung wird die Standardabweichung verstanden, die durch die Wiederholung voneinander unabhängiger Messungen der Standardlösung bzw. derselben Probe in kurzen Zeitabständen, von demselben Bearbeiter (d.h. die Teilschritte Probenvorbereitung, Durchführung der Messung und Auswertung werden jeweils von der gleichen Person durchgeführt) im selben Labor mit derselben Ausrüstung erhalten wird [106].

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Formel aus [106]

s: (Wiederhol)standardabweichung

x_i : Einzelwert

\bar{x} : Mittelwert der Standardkonzentrationen x_i aus dem Kalibrierexperiment

n: Anzahl der Messungen

Es wird wie folgt verfahren:

- A) Ein Standard (100 %) wird sechsmal injiziert (jeweils dieselbe Standardlösung).
- B) Von einer mit Chloramphenicol belasteten Probe werden sechs Aufarbeitungen durchgeführt, die jeweils einfach injiziert werden.

A) Standard

	Standard (100 %) Chloramphenicol Masse 321 (CAP)		Standard (100 %) Chloramphenicol Masse 323 (CAP-Kontrolle)	
Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	3,83		3,83	
	Peakfläche			
	175659		111195	
	177726		110935	
	186741		118277	
	190206		119148	
	176173		111479	
	172575		108724	
Mittelwert	179847		113293	
Relative Standardabweichung [%]	$\pm 3,9$		$\pm 3,8$	
	Peak- fläche	berech- nete Konzen- tration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Peak- fläche	berech- nete Konzen- tration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Absolute Standardabweichung	7014	$\pm 0,15$	4305	$\pm 0,15$
Wiederholbarkeit (P = 95 %)	19783	$\pm 0,42$	12122	$\pm 0,41$

Tab. 3-9. Präzision des Standards

B) Belastete Honigprobe (kontaminiert mit 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CAP)

	Probe Chloramphenicol Masse 321 (CAP)		Probe Chloramphenicol Masse 323 (CAP-Kontrolle)	
Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	1,00		1,00	
	Peakfläche			
	30193		20780	
	27191		17193	
	29958		20285	
	30334		19122	
	27408		16718	
	28196		18021	
Mittelwert	28880		18687	
Relative Standardabweichung [%]	$\pm 5,0$		$\pm 8,9$	
	Peak- fläche	berech- nete Konzen- tration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Peak- fläche	berech- nete Konzen- tration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Absolute Standardabweichung	1444	$\pm 0,05$	934	$\pm 0,09$
Wiederholbarkeit (P = 95 %)	4043	$\pm 0,14$	4672	$\pm 0,25$

Tab. 3-10. Präzision der Probe

Nach Horwitz ist bei einer Konzentration von 1 µg/kg eine relative Standardabweichung von 30 % akzeptabel [106]. Dieser akzeptierte Wert wird von der angewendeten Methode deutlich unterschritten.

3.5.1.3. Wiederfindung

Die Wiederfindung oder Wiederfindungsrate ist das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe. Mit Hilfe der Wiederfindung kann die gesamte Methode bewertet werden. Bei einer Wiederfindung von 100 % ist die Selektivität, die Richtigkeit und die Robustheit für die verwendete Konzentration, die verwendete Matrix und die verwendeten experimentellen Bedingungen bewiesen. Die Richtigkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und einem als richtig angesehenen Wert. Man bezieht sich auf einen Wert, der als fehlerfrei und somit richtig gilt, z. B. zertifiziertes Referenzmaterial, da der wahre Wert prinzipiell nicht bekannt sein kann. Robustheit beschreibt die Fähigkeit eines Verfahrens, ein Ergebnis zu liefern, das durch variierende Bedingungen nicht oder unwesentlich verfälscht wird [106].

Es wird wie folgt verfahren:

1. Eine unbelastete Probe wird mit Standard CAP (100 %) versetzt .
2. Eine unbelastete Probe wird mit Standard CAP (20 %) versetzt.

Sollwert (µg/kg Probe)	Istwert (µg/kg Probe)	Wiederfindung
3,83 (100 %)	3,37	87,6 %
0,76 (20 %)	0,69	90,2 %

Tab. 3-11. Wiederfindung

Gemäß der Entscheidung der Kommission 2002/657 ist für die Bestimmung der Richtigkeit der Messungen durch Wiederfindung von zugesetzten bekannten Mengen des Analyten zu einer Leerwertmatrix bei einer Konzentration von ≤ 1 µg/kg für die mittlere Wiederfindung ein Bereich von - 50 % bis + 20 %, für Konzentrationen > 1 µg/kg bis 10 µg/kg ein Bereich von - 30 % bis + 10 % zulässig. Die Ergebnisse für die durchgeführten Wiederfindungsversuche liegen innerhalb dieser geforderten Bereiche.

3.5.1.4. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Gemäß DIN 32645 wird die Nachweisgrenze als kleinste nachweisbare Menge definiert. Das bedeutet, dass die Irrtumswahrscheinlichkeit, ob Analyt vorhanden ist oder nicht, 50 % beträgt [100].

Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste quantifizierbare Menge. Es ist die Menge, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantitativ erfasst werden kann. Sie entspricht annähernd dem zwei- bis dreifachen der Nachweisgrenze.

Die Kalibriergerade wurde mittels CAP-Standardlösungen erstellt, die keine Matrix enthielten. Eine Berechnung der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 mittels der Software Valoo 1.0. (Copyright © 1999 by analytik-software Dr. Stella Windmann) könnte daher keine Matrixeinflüsse berücksichtigen. Daher

wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze über die Signalhöhe in einer dotierten Matrixprobe bestimmt. Für die Ermittlung der Nachweisgrenze wird ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 und für die Bestimmungsgrenze von 9:1 empfohlen [106].

Dazu wurden von einem 0,1 µg/kg CAP enthaltenden Honig die Signalhöhe für Chloramphenicol und die des Untergrundrauschens bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Für beide Massenspuren 321 und 323 ergab sich für 0,1 µg/kg ein Signal-Rausch (Signal-to-Noise)-Verhältnis von 3,3, so dass diese Konzentration als Nachweisgrenze für die Bestimmung von Chloramphenicol mittels dieser Methode angenommen wird.

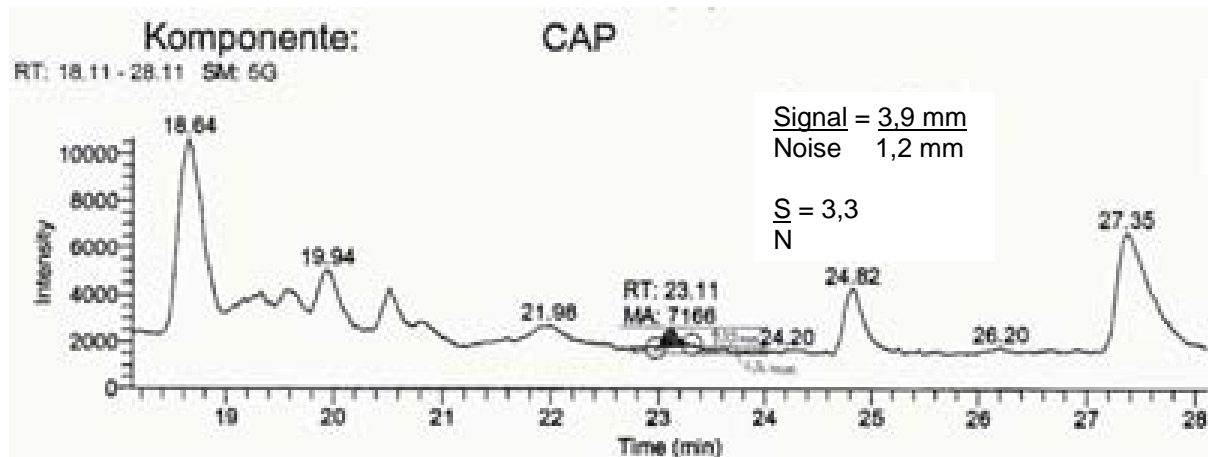


Abb. 3-75. Bestimmung der Nachweisgrenze aus dem Chromatogramm eines 0,1 µg/kg CAP enthaltenden Honigs für die Massenspur 321

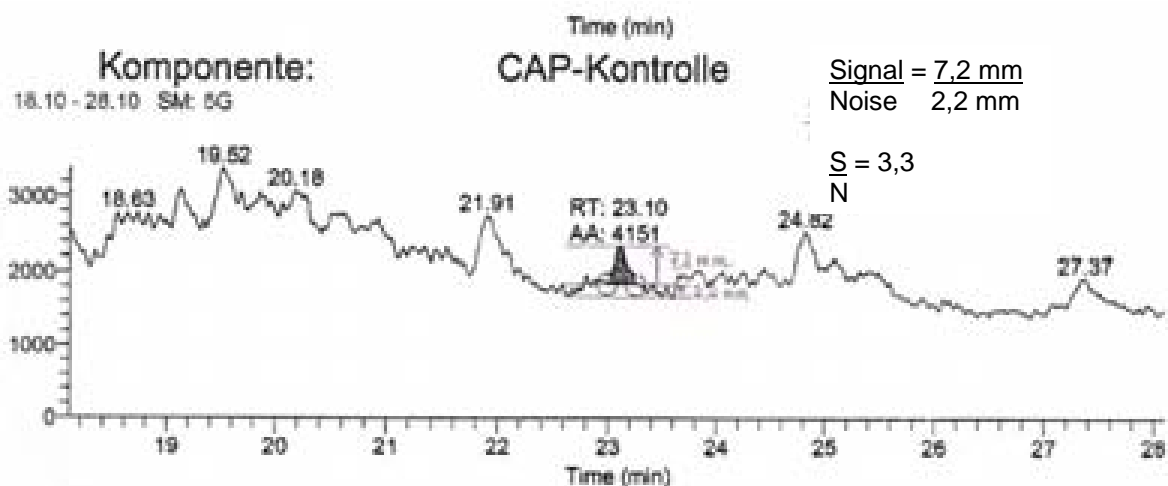


Abb. 3-76. Bestimmung der Nachweisgrenze aus dem Chromatogramm eines 0,1 µg/kg CAP enthaltenden Honigs für die Massenspur 323

Massen- spur	Peak- höhe (Signal) [mm]	Höhe des Rauschens (Noise) [mm]	Signal/Noise	ermittelte Nachweis- grenze [µg/kg]	berechnete Bestimmungs- grenze [µg/kg]
321	3,9	1,2	3,3	0,1	0,3
323	7,2	2,2	3,3	0,1	0,3

Tab. 3-12. Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet aus dem Signal-to-Noise-Verhältnis

Mittels dieser Methode wird somit für beide Massenspuren der MRPL-Wert von 0,3 µg/kg als Bestimmungsgrenze erreicht.

3.5.1.5. Messungenauigkeit

Analysenwerte sind mit einer gewissen Messungenauigkeit verbunden, die sich aus den zufälligen und systematischen Abweichungen bei der Durchführung einer Analyse ergibt. Durch die Addition und Subtraktion der Messungenauigkeit vom Analysenwert ergibt sich der sogenannte Vertrauensbereich des Analyseergebnisses. Als experimentell ermittelter Wert für die Messungenauigkeit kann die **Wiederholbarkeit (kritische Wiederholdifferenz r)** einer Bestimmung herangezogen werden. Sie gibt die zu akzeptierende Differenz zweier Einzelwerte wieder [106].

$$r = f\sqrt{2}s$$

s: Standardabweichung

f: empirisch ermittelter Zahlenwert, der von dem gewählten Signifikanzniveau und der Verteilung der Werte abhängt [106]

Für ein Signifikanzniveau P = 95 % (das Signifikanzniveau P bezeichnet die relative Sicherheit für eine statistische Entscheidung, hier bedeutet es, dass 95 % aller Messwerte innerhalb der Messungenauigkeit liegen - Vertrauensbereich) und unter der Annahme einer Normalverteilung ist der Wert von f = 1,96 [106].

$$r = 1,96\sqrt{2}s = 2,77s \approx 2,8s$$

	Wiederholbarkeit r (≈ 2,8 x s)			
	Standard c (3,833 µg/kg)		Honig c (1,0 µg/kg)	
	µg/kg	%	µg/kg	%
Chloramphenicol 321	0,42	11,0	0,14	14,0
Chloramphenicol 323	0,41	10,7	0,25	25,0

Tab. 3-13. Messungenauigkeit

3.5.2. LC-MS/MS (vergl. Methode 2.2)

Für die Validierung wurde das LC-MS-System TSQ (Triple Quadrupole) von Thermo Electron verwendet.

Da die Europäische Union am 12. August 2002 die *Entscheidung 2002/657/EG zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen* erlassen hat, die am 1. September 2002 inkrafttrat, wurde die Validierung der später entwickelten LC-MS/MS-Methode an diese neuen Vorschriften angelehnt [29].

Die Validierung der Methode mittels online-SPE-LC-MS nach diesem Schema war nicht möglich, da zu diesem Zeitpunkt das erforderliche Massenspektrometer (MSQ) nicht mehr zur Verfügung stand.

Da die Auswertung bei dieser Methode über einen internen Standard erfolgt, wurde die Validierung mit den Werten der wiederfindungskorrigierten, berechneten Konzentrationen durchgeführt.

Die Berechnung der CAP-Konzentration erfolgt über die Bildung des Mittelwertes aus den Produkt-Ionen der beiden Massen 321 und 323. Daher erfolgt auch die Validierung über die Mittelwerte.

Darüberhinaus wurde durch das Erstellen der Kalibrierkurven mit Hilfe von dotierten Honig- bzw. Gelée Royale-Proben der Einfluss der Matrix mit einbezogen.

3.5.2.1. Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – Honig

Definitionen der Validierungsparameter siehe 3.5.1.1.

Wie unter 3.5.1.1. erläutert, wird bei der Messung von Aliquoten einer Standardlösung die Linearität der Apparatur und des Detektors geprüft. Im günstigsten Fall ist diese gleich der Linearität der Methode. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Matrix den linearen Bereich einengen kann [106]. Daher wird zur Erstellung der Regressionsgeraden und Bestimmung der Wiederfindung wie folgt verfahren:

Eine Leerwertprobe (Probe ohne CAP-Belastung) wird in Anlehnung an die EU-Entscheidung 2002/657/EG mit den folgenden Konzentrationen dotiert:

a) 0 % MRPL-Wert (0 µg/kg)	3 Aufarbeitungen
b) 50 % MRPL-Wert (0,15 µg/kg)	3 Aufarbeitungen
c) 100 % MRPL-Wert (0,3 µg/kg)	6 Aufarbeitungen
d) 150 % MRPL-Wert (0,45 µg/kg)	6 Aufarbeitungen
e) 200 % MRPL-Wert (0,6 µg/kg)	6 Aufarbeitungen
f) 400 % MRPL-Wert (1,2 µg/kg)	3 Aufarbeitungen

Jede Aufarbeitung wurde jeweils einmal gemessen.

MRPL (Minimum Required Performance Limit) bezeichnet die geforderte Mindestleistungsgrenze, d.h. der Mindestgehalt eines Analyten in einer Probe, der mindestens nachgewiesen und bestätigt werden muss [29]. Für Chloramphenicol in Honig beträgt dieser MRPL-Wert gemäß der Entscheidung 2003/181/EG 0,3 µg/kg [30]

Zur späteren Berechnung der laborinternen Reproduzierbarkeit (3.5.2.5) wurden drei Messreihen aufgestellt. Die ersten beiden Messreihen variieren durch die Probenvorbereitung, die von unterschiedlichen Personen durchgeführt wurden. Die dritte Messreihe unterscheidet sich von der ersten durch eine andere Honig-Matrix.

1. Messreihe:

	Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP (n = 6)	Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP
% bezogen auf den MRPL-Wert (100 % = 0,3 µg/kg Probe)		
	c (Ist) [µg/kg]	Wiederfindung [%]
0 % MRPL (0 µg/kg)	0	
50 % MRPL (0,15 µg/kg)	0,16	106,7
100 % MRPL (0,3 µg/kg)	0,28	93,9
150 % MRPL (0,45 µg/kg)	0,41	90,7
200 %MRPL (0,6 µg/kg)	0,55	91,4
400 % MRPL (1,2 µg/kg)	1,12	93,3
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$	
Steigung b	0,9214	
Achsenabschnitt a	0,0061	
Relative Verfahrensstandardabweichung [%]	2,8	
Reststandardabweichung	0,0139	
Korrelationskoeffizient	0,9995	

Tab. 3-14. Honig: Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – 1. Messreihe

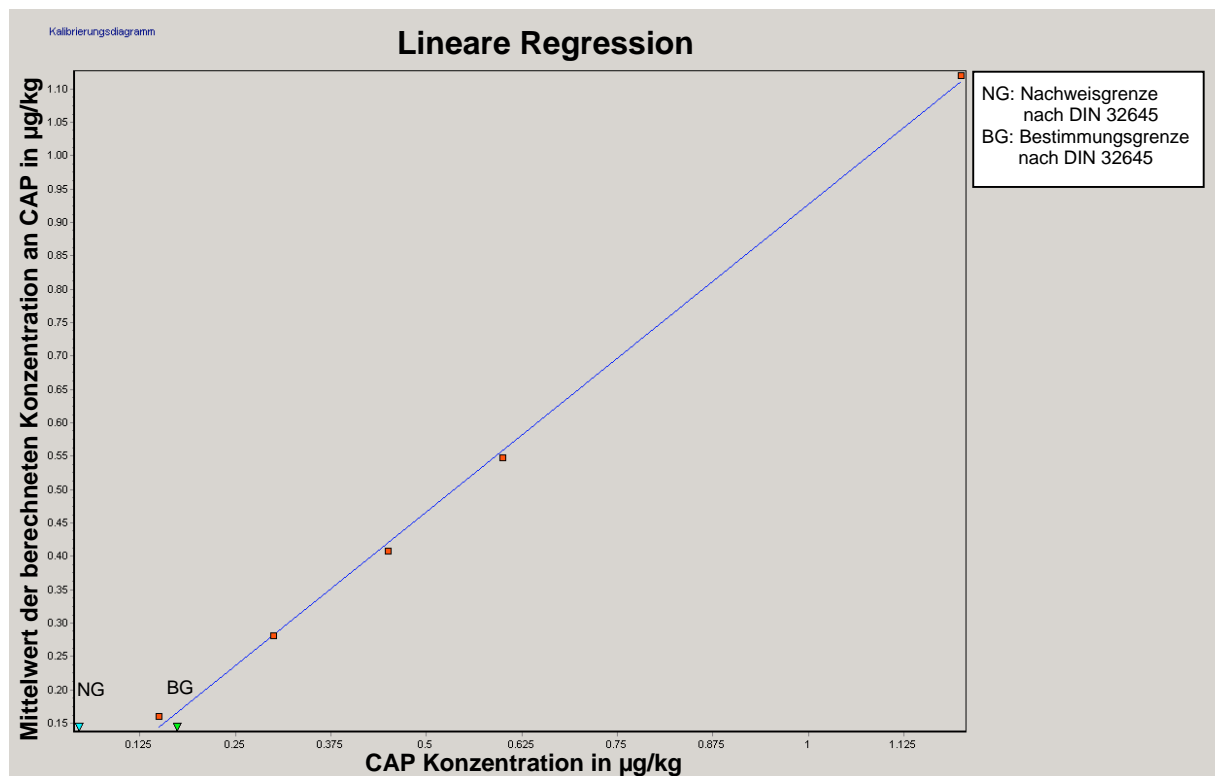


Abb. 3-77. Regressionsgerade – Honig – 1. Messreihe

2. Messreihe:

	Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP (n = 6)	Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP
% bezogen auf den MRPL-Wert (100 % = 0,3 µg/kg Probe)		
	c (Ist) [µg/kg]	Wiederfindung [%]
0 % MRPL (0 µg/kg)	0	
50 % MRPL (0,15 µg/kg)	0,11	71,1
100 % MRPL (0,3 µg/kg)	0,26	85,0
150 % MRPL (0,45 µg/kg)	0,39	87,0
200 % MRPL (0,6 µg/kg)	0,61	100,8
400 % MRPL (1,2 µg/kg)	1,14	94,7
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$	
Steigung b	0,9870	
Achsenabschnitt a	-0,0340	
Relative Verfahrensstandardabweichung [%]	5,8	
Reststandardabweichung	0,0307	
Korrelationskoeffizient	0,9978	

Tab. 3-15. Honig: Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – 2. Messreihe

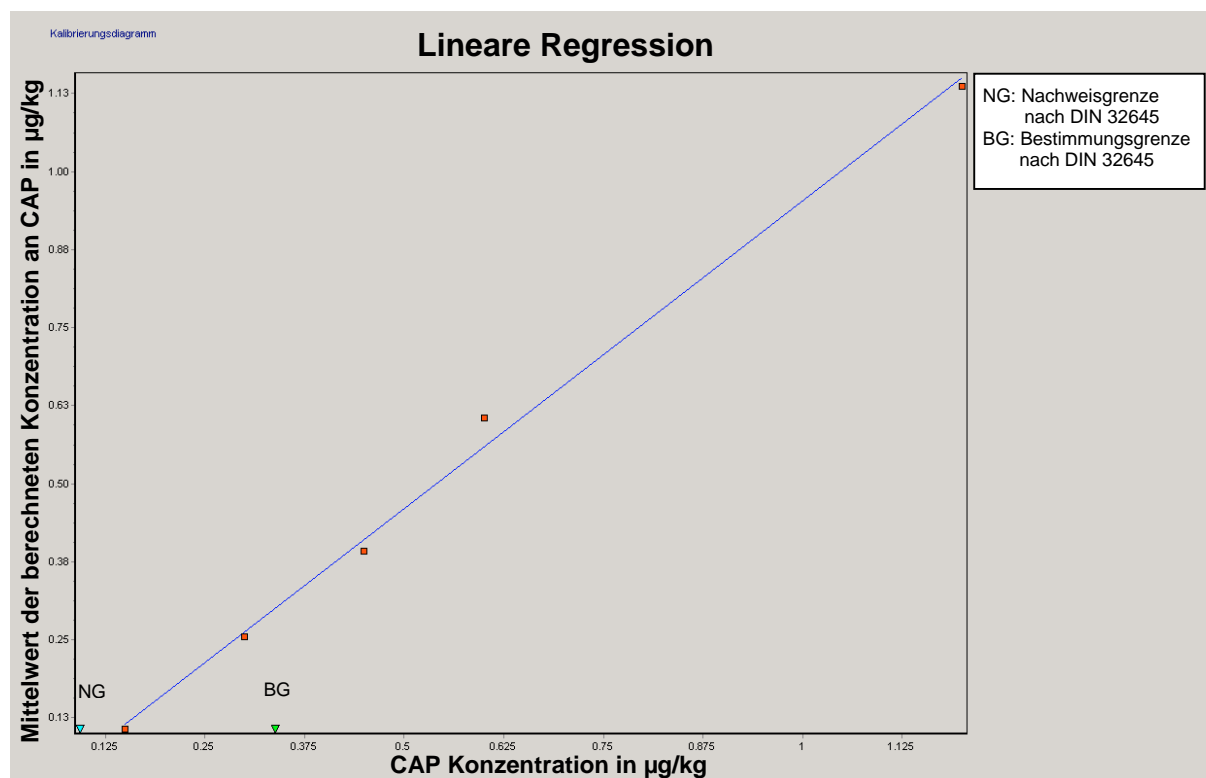


Abb. 3-78. Regressionsgerade – Honig – 2. Messreihe

3. Messreihe:

	Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP (n = 6)	Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP
% bezogen auf den MRPL-Wert (100 % = 0,3 µg/kg Probe)		
	c (Ist) [µg/kg]	Wiederfindung [%]
0 % MRPL (0 µg/kg)	0	
50 % MRPL (0,15 µg/kg)	0,12	80,0
100 % MRPL (0,3 µg/kg)	0,24	80,0
150 % MRPL (0,45 µg/kg)	0,38	83,7
200 % MRPL (0,6 µg/kg)	0,54	89,5
400 % MRPL (1,2 µg/kg)	0,97	80,8
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$	
Steigung b	0,8129	
Achsenabschnitt a	0,0097	
Relative Verfahrensstandardabweichung [%]	6,0	
Reststandardabweichung	0,0264	
Korrelationskoeffizient	0,9976	

Tab. 3-16. Honig: Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – 3. Messreihe

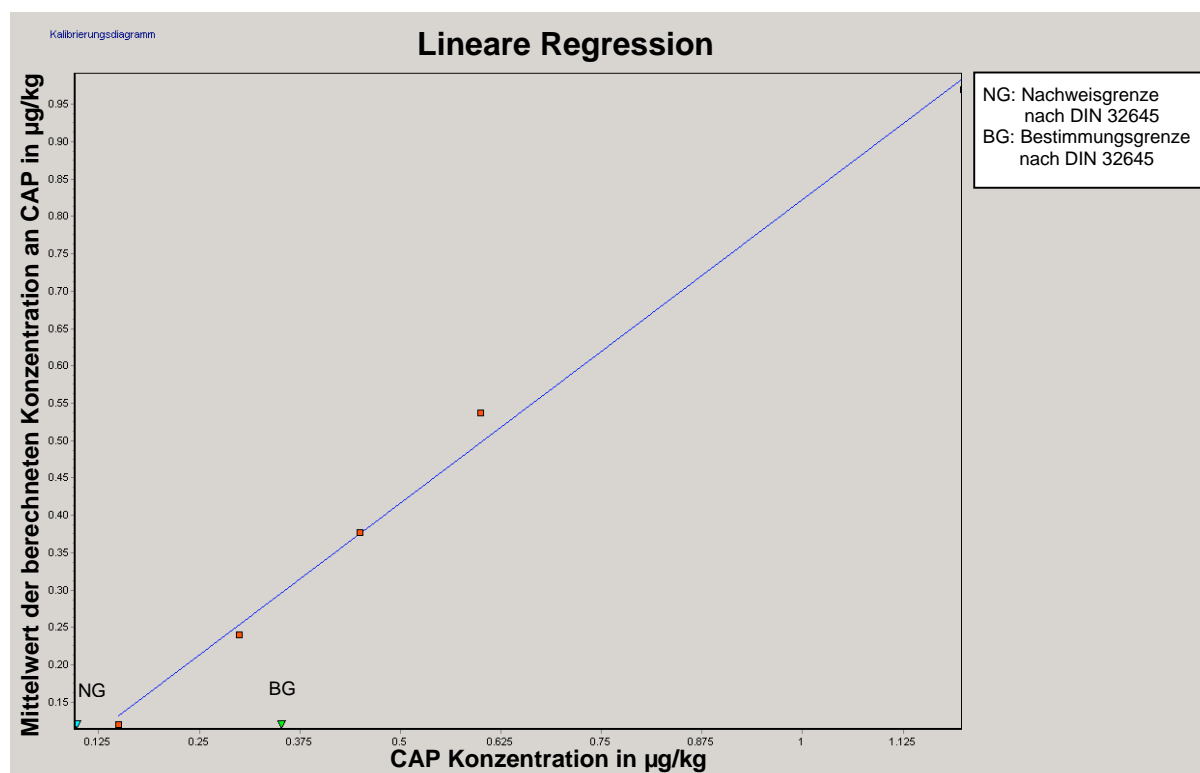


Abb. 3-79. Regressionsgerade – Honig – 3. Messreihe

Sowohl die Korrelationskoeffizienten als auch die optischen Linearitätstests lassen für alle drei Messreihen eine lineare Kalibrierfunktion erkennen.

Die gemäß der Entscheidung der Kommission 2002/657 geforderten mittleren Wiederfindungen für den Konzentrationsbereich $\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (-50 % bis + 20 %) werden von allen drei Messreihen für alle analysierten Konzentrationen erreicht.

3.5.2.2. Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) - Honig

Definition der Validierungsparameter siehe 3.5.1.2 und 3.5.1.3.

1. Messreihe:

	CAP	Wiederfindung		Wiederfindung	CAP	Wiederfindung
	100 % MRPL (0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	%	150 % MRPL (0,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	%	200 % MRPL (0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	%
	c (Ist) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		c (Ist) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		c (Ist) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	
1. Messung	0,26	86,7	0,42	93,3	0,63	105,0
2. Messung	0,27	90,0	0,41	91,1	0,53	88,3
3. Messung	0,27	90,0	0,41	91,1	0,50	83,3
4. Messung	0,28	93,3	0,41	91,1	0,51	85,0
5. Messung	0,28	93,3	0,40	88,8	0,58	96,7
6. Messung	0,33	110,0	0,40	88,8	0,54	90,0
Mittelwert	0,28	93,3	0,41	91,1	0,55	91,7
Relative Standardabweichung [%]	$\pm 8,8$		$\pm 1,8$		$\pm 8,9$	
Absolute Standardabweichung [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	$\pm 0,02$		$\pm 0,01$		$\pm 0,05$	
Wiederholbarkeit (95 %) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	$\pm 0,07$		$\pm 0,02$		$\pm 0,14$	

Tab. 3-17. Honig: Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – 1. Messreihe

2. Messreihe:

	CAP	Wiederfindung		Wiederfindung	CAP	Wiederfindung
	100 % MRPL (0,3 µg/kg)	%	150 % MRPL (0,45 µg/kg)	%	200 % MRPL (0,6 µg/kg)	%
	c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]	
1. Messung	0,30	100,0	0,31	68,9	0,45	75,0
2. Messung	0,21	70,0	0,36	80,0	0,59	98,3
3. Messung	0,38	126,7	0,37	82,2	0,59	98,3
4. Messung	0,15	50,0	0,41	91,1	0,65	108,3
5. Messung	0,19	63,3	0,53	117,7	0,63	105,0
6. Messung	0,30	100,0	0,37	82,2	0,72	120,0
Mittelwert	0,26	86,7	0,39	86,7	0,61	101,7
Relative Standardabweichung [%]	± 33,7		± 19,1		± 14,9	
Absolute Standardabweichung [µg/kg]	± 0,09		± 0,07		± 0,09	
Wiederholbarkeit (95 %) [µg/kg]	± 0,24		± 0,21		± 0,25	

Tab. 3-18. Honig: Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – 2. Messreihe

3. Messreihe:

	CAP	Wiederfindung		Wiederfindung	CAP	Wiederfindung
	100 % MRPL (0,3 µg/kg)	%	150 % MRPL (0,45 µg/kg)	%	200 % MRPL (0,6 µg/kg)	%
	c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]	
1. Messung	0,26	86,7	0,28	62,2	0,52	86,7
2. Messung	0,22	73,3	0,40	88,9	0,56	93,3
3. Messung	0,25	83,3	0,42	93,3	0,52	86,7
4. Messung	0,25	83,3	0,47	104,4	0,50	83,3
5. Messung	0,23	76,7	0,33	73,3	0,53	88,3
6. Messung	0,23	76,7	0,36	80,0	0,59	98,3
Mittelwert	0,24	80,0	0,38	84,4	0,54	90,0
Relative Standardabweichung [%]	± 6,5		± 18,0		± 6,1	
Absolute Standardabweichung [µg/kg]	± 0,02		± 0,07		± 0,03	
Wiederholbarkeit (95 %) [µg/kg]	± 0,04		± 0,19		± 0,09	

Tab. 3-19. Honig: Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – 3. Messreihe

Nach Horwitz ist bei einer Konzentration von 1 µg/kg eine relative Standardabweichung von 30 % akzeptabel [106]. Dieser Wert wird von allen Konzentrationsbereichen der ersten und dritten Messreihe unterschritten. In der zweiten Messreihe wurde für die Konzentration 0,3 µg/kg eine relative Standardabweichung von 33,7 % ermittelt. Da die Konzentration jedoch nur ein Drittel von 1 µg/kg beträgt, ist die erreichte Standardabweichung somit akzeptabel.

3.5.2.3. Nachweis- und Bestimmungsgrenze - Honig

Definition siehe 3.5.1.4.

Die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze wurden nach DIN 32645 mittels der Software Valoo 1.0. (Copyright © 1999 by analytik-software Dr. Stella Windmann) berechnet [100].

	Nachweisgrenze [µg/kg] für Chloramphenicol	Bestimmungsgrenze [µg/kg] für Chloramphenicol
1. Messreihe:	0,05	0,17
2. Messreihe:	0,09	0,34
3. Messreihe:	0,10	0,35
Mittelwert aus allen drei Messreihen	0,08	0,29

Tab. 3-20. Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet nach DIN 32645 - Honig

Von dieser Methode wird somit im Mittel der MRPL-Wert von 0,3 µg/kg als Bestimmungsgrenze erreicht (siehe hierzu auch 3.5.2.5.3.)

3.5.2.4. Messungenauigkeit - Honig

Definition siehe 3.5.1.5.

Die Messungenauigkeit wird durch die Wiederholbarkeit einer Bestimmung ausgedrückt und gibt die zu akzeptierende Differenz zweier Einzelwerte wieder.

	Wiederholbarkeit r ($\approx 2,8 \times s$)					
	Probe 100 % MRPL (0,3 µg/kg)		Probe 150 % MRPL (0,45 µg/kg)		Probe 200 % MRPL (0,6 µg/kg)	
	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%
1. Messreihe						
CAP	0,07	23,4	0,02	4,7	0,14	23
2. Messreihe						
CAP	0,24	81,1	0,21	47,1	0,25	42,4
3. Messreihe						
CAP	0,04	14,6	0,19	42,6	0,09	15,4

Tab. 3-21. Messungenauigkeit - Honig

3.5.2.5. Laborinterne Reproduzierbarkeit - Honig

Die laborinterne Reproduzierbarkeit ist die in ein und demselben Labor unter festgesetzten Bedingungen über begründete lange Zeiträume erzielte Präzision [29]. Zur Ermittlung werden die unter 3.5.2.1 beschriebenen Messreihen dotierter Leerwertproben mit Variation der Bedingungen gemessen (andere Analytiker, andere Geräte, etc.). Die erstellten drei Messreihen unterscheiden sich voneinander wie unter 3.5.2.1 beschrieben.

3.5.2.5.1. Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) - Honig

Definition siehe 3.5.1.1.

	Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP	Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP
% bezogen auf den MRPL-Wert (100 % = 0,3 µg/kg Probe)		
	c (Ist) [µg/kg]	Wiederfindung [%]
0 % MRPL (0 µg/kg)		
1. Messreihe	0	
2. Messreihe	0	
3. Messreihe	0	
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	0	
50 % MRPL (0,15 µg/kg)		
1. Messreihe	0,16	106,7
2. Messreihe	0,11	71,1
3. Messreihe	0,12	80,0
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	0,13	85,9
100 % MRPL (0,3 µg/kg)		
1. Messreihe	0,28	93,9
2. Messreihe	0,26	85,0
3. Messreihe	0,24	80,0
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	0,26	86,3
150 % MRPL (0,45 µg/kg)		
1. Messreihe	0,41	90,7
2. Messreihe	0,39	87,0
3. Messreihe	0,38	83,7
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	0,39	87,2
200 % MRPL (0,6 µg/kg)		
1. Messreihe	0,55	91,4
2. Messreihe	0,61	100,8
3. Messreihe	0,54	89,5
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	0,56	93,9
400 % MRPL (1,2 µg/kg)		
1. Messreihe	1,12	93,3
2. Messreihe	1,14	94,7
3. Messreihe	0,97	80,8
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	1,08	89,6
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$	
Steigung b	0,9071	
Achsenabschnitt a	-0,0061	
Relative Verfahrensstandardabweichung [%]	3,4	
Reststandardabweichung	0,0166	
Korrelationskoeffizient	0,9992	

Tab. 3-22. Honig: Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – Laborinterne Reproduzierbarkeit

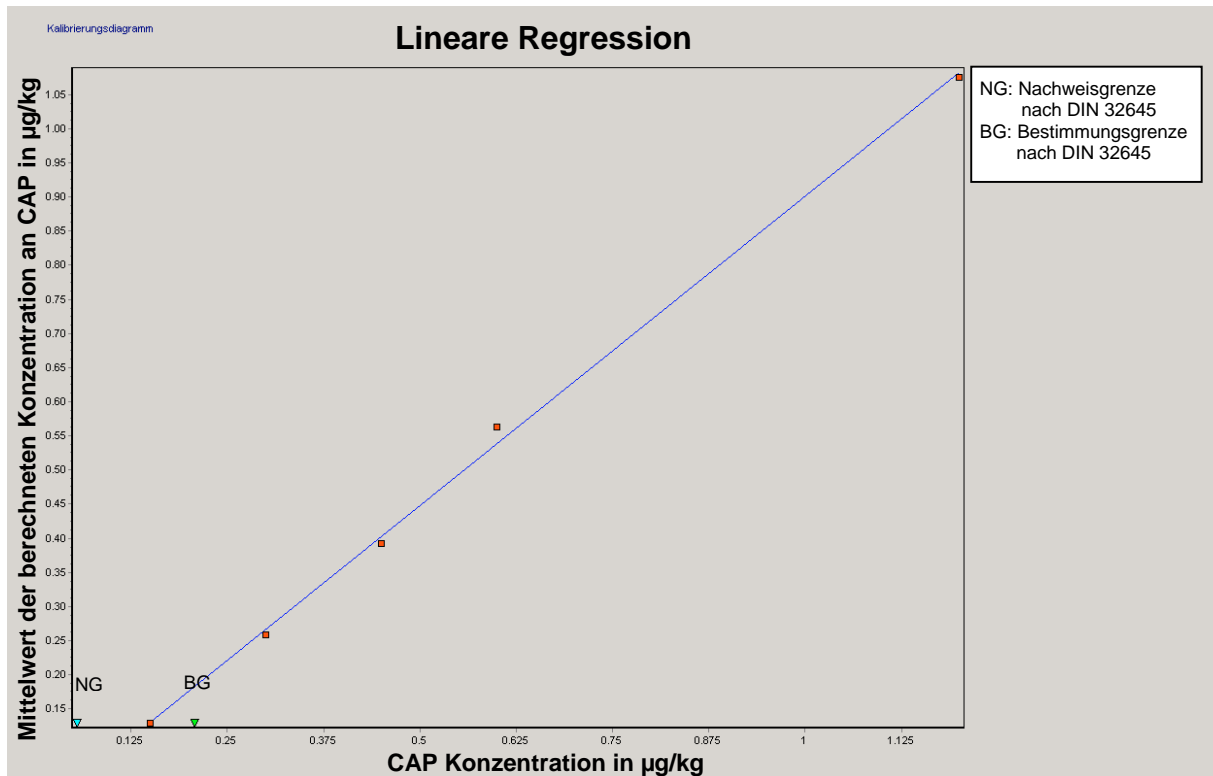


Abb. 3-80. Regressionsgerade – Honig – Laborinterne Reproduzierbarkeit

Die gemäß der Entscheidung der Kommission 2002/657 geforderten mittleren Wiederfindungen für den Konzentrationsbereich $\leq 1 \mu\text{g/kg}$ (- 50 % bis + 20 %) werden für die Mittelwerte aus allen drei Messreihen für alle analysierten Konzentrationen erreicht.

Sowohl der Linearitätstest als auch die Mittelwerte der Wiederfindungen sind für die Berechnung über alle drei Messreihen besser als für die einzelnen Messreihen, da sich Abweichungen durch die große Anzahl an Messungen besser ausgleichen.

3.5.2.5.2. Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) - Honig

Definition siehe 3.5.1.2 und 3.5.1.3.

	CAP	Wiederfindung		Wiederfindung	CAP	Wiederfindung
	100 % MRPL (0,3 µg/kg)	%	150 % MRPL (0,45 µg/kg)	%	200 % MRPL (0,6 µg/kg)	%
	c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]	
1. Messreihe						
1. Messung	0,26	86,7	0,42	93,3	0,63	105,0
2. Messung	0,27	90,0	0,41	91,1	0,53	88,3
3. Messung	0,27	90,0	0,41	91,1	0,50	83,3
4. Messung	0,28	93,3	0,41	91,1	0,51	85,0
5. Messung	0,28	93,3	0,40	88,8	0,58	96,7
6. Messung	0,33	110,0	0,40	88,8	0,54	90,0
2. Messreihe						
1. Messung	0,30	100,0	0,31	68,9	0,45	75,0
2. Messung	0,21	70,0	0,36	80,0	0,59	98,3
3. Messung	0,38	126,7	0,37	82,2	0,59	98,3
4. Messung	0,15	50,0	0,41	91,1	0,65	108,3
5. Messung	0,19	63,3	0,53	117,7	0,63	105,0
6. Messung	0,30	100,0	0,37	82,2	0,72	120,0
3. Messreihe						
1. Messung	0,26	86,7	0,28	62,2	0,52	86,7
2. Messung	0,22	73,3	0,40	88,9	0,56	93,3
3. Messung	0,25	83,3	0,42	93,3	0,52	86,7
4. Messung	0,25	83,3	0,47	104,4	0,50	83,3
5. Messung	0,23	76,7	0,33	73,3	0,53	88,3
6. Messung	0,23	76,7	0,36	80,0	0,59	98,3
Mittelwert	0,26	86,7	0,39	86,7	0,56	93,3
Relative Standardabweichung [%]	± 20,2		± 14,4		± 11,7	
Absolute Standardabweichung [µg/kg]	± 0,05		± 0,06		± 0,07	
Wiederholbarkeit (95 %) [µg/kg]	± 0,15		± 0,16		± 0,19	

Tab. 3-23. Honig: Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – Laborinterne Reproduzierbarkeit

Nach Horwitz ist bei einer Konzentration von 1 µg/kg eine relative Standardabweichung von 30 % akzeptabel [106]. Dieser Wert wird von allen Konzentrationsbereichen unterschritten.

3.5.2.5.3. Nachweis- und Bestimmungsgrenze - Honig

Definition siehe 3.5.1.4.

	Nachweisgrenze [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Chloramphenicol	0,06	0,21

Tab. 3-24. Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet nach DIN 32645 - Honig – laborinterne Reproduzierbarkeit

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgt nach DIN 32645 [100]. Aufgrund der Berechnungsgrundlage dieser beiden Validierungsparameter werden die ermittelten Werte mit der Verwendung eines größeren Datenpools kleiner. Dies erklärt, warum diese Werte für die laborinterne Reproduzierbarkeit, in die die dreifache Menge an Werten gegenüber der einzelnen Messreihe einfließt, kleiner sind als die berechneten für die einzelnen Messreihen. Der in der Entscheidung 2003/181/EG für CAP festgelegte MRPL-Wert von 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wird von dieser Methode für die gewählte Honigmatrix als Bestimmungsgrenze erreicht.

3.5.2.5.4. Entscheidungsgrenze ($CC\alpha$) und Nachweisvermögen ($CC\beta$) - Honig

Gemäß der Entscheidung 2002/657/EG werden statt der Nachweis- und Bestimmungsgrenze die Entscheidungsgrenze ($CC\alpha$) und das Nachweisvermögen ($CC\beta$) bestimmt.

Die Entscheidungsgrenze ($CC\alpha$) ist der Grenzwert, bei und über dem mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von α bestimmt werden kann, dass eine Probe positiv ist. Der α -Fehler (falsch-positive Entscheidung) ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Probe in Wirklichkeit substanzfrei ist, obwohl ein positiver Messwert vorliegt.

Das Nachweisvermögen ($CC\beta$) ist der kleinste Gehalt des Stoffes, der mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von β in einer Probe nachgewiesen, identifiziert oder quantifiziert werden kann. Im Fall von Stoffen, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, ist das Nachweisvermögen die niedrigste Konzentration, bei der eine Methode in der Lage ist, tatsächlich verunreinigte Proben mit einer statistischen Sicherheit von $1-\beta$ nachzuweisen.

Der β -Fehler (falsch-negative Entscheidung) ist die Wahrscheinlichkeit, dass die untersuchte Probe die Substanz doch enthält, obwohl das Analyseergebnis als Null (Blindwert) angesehen wird [29][107].

Für Stoffe, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, wie im Fall von Chloramphenicol, gilt folgendes:

Ermittlung der Entscheidungsgrenze ($CC\alpha$):

Die Entscheidungsgrenze kann aus der Kalibriergeraden und der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit ermittelt werden. Die entsprechende Konzentration am Achsenabschnitt a addiert mit dem 2,33fachen der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit des Achsenabschnittes ist gleich der Entscheidungsgrenze [29].

$$0,0061 \mu\text{g}/\text{kg} + 2,33 \times 0,0012322 \mu\text{g}/\text{kg} = 0,00897 \mu\text{g}/\text{kg}$$

Ermittlung des Nachweisvermögens (CC β):

Das Nachweisvermögen berechnet sich aus der Konzentration an der Entscheidungsgrenze addiert mit dem 1,64fachen der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit des mittleren gemessenen Gehalts an der Entscheidungsgrenze [29].

$$0,00897 \mu\text{g/kg} + 1,64 \times 0,001821473 \mu\text{g/kg} = 0,01194 \mu\text{g/kg}$$

Entscheidungsgrenze (CCα) [$\mu\text{g/kg}$]	0,009
Nachweisvermögens (CCβ) [$\mu\text{g/kg}$]	0,012

Tab. 3-25. Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen - Honig

3.5.2.5.5. Messungenaugigkeit - Honig

Definition siehe 3.5.1.5.

	Wiederholbarkeit r ($\approx 2,8 \times s$)					
	Probe 100 % MRPL (0,3 $\mu\text{g/kg}$)		Probe 150 % MRPL (0,45 $\mu\text{g/kg}$)		Probe 200 % MRPL (0,6 $\mu\text{g/kg}$)	
	$\mu\text{g/kg}$	%	$\mu\text{g/kg}$	%	$\mu\text{g/kg}$	%
CAP	0,15	49,4	0,16	35,6	0,19	31,0

Tab. 3-26. Messungenaugigkeit – Honig – laborinterne Reproduzierbarkeit

3.5.2.6. Ringversuch - Honig

Vom Central Science Laboratory Sand Hutton, York, YO41 1LZ, UK wurde von Januar bis März 2005 der Ringversuch FAPAS® Series 2 Round 61 für die Bestimmung von Chloramphenicol in Honig durchgeführt. Teilgenommen an diesem Ringversuch haben 67 Labore aus 32 Ländern.

Festgesetzter Wert für Chloramphenicol [$\mu\text{g/kg}$]	Anzahl der Werte, die innerhalb des erlaubten z-scores ($ z \leq 2$) lagen	Gesamtzahl der teilnehmenden Labore	Anteil der Ergebnisse, die im zufrieden stellenden Bereich lagen [%]
0,54	56	67	84

Tab. 3-27. Zusammenstellung der Ringversuchs-Daten

Die Ergebnisse einer typischen chemischen Analyse sind normalverteilt. Das bedeutet, dass sich die Mehrheit der Ergebnisse um einen Mittelwert konzentriert. Einige Ergebnisse befinden sich jedoch in den Grenzbereichen dieser Normalverteilung. Aus den Eigenschaften der Normalverteilung ergeben sich folgende Charakteristika:

Im Bereich eines sogenannten z-scores zwischen -2 und $+2$ liegen 95 % aller Messwerte.

Die Güte des laborspezifischen Ergebnisses bei einem Ringversuch wird deshalb über den z-score festgelegt: Messwerte mit einem zugehörigen z-score zwischen -2 und $+2$ gelten als akzeptabel.

Der z-score der einzelnen Labore wird wie folgt berechnet:

$$z = \frac{(x - X)}{\sigma}$$

mit x = Messwert des Labors [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
 X = festgesetzter Wert für CAP [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
 σ = durchschnittliche Standardabweichung aller beteiligten Labore [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
(in diesem Fall $0,12 \mu\text{g}/\text{kg}$, berechnet nach Horwitz)

Der für den Ringversuch in unserem Labor ermittelte CAP-Gehalt betrug sowohl mittels LC-MS/MS als auch mittels ELISA $0,6 \mu\text{g}/\text{kg}$. Daher ergab sich folgender z-score:

$$z = \frac{0,6 - 0,54}{0,12} = 0,5$$

Der erreichte z-score liegt somit sehr gut im Vertrauensbereich.

Die Verteilung der z-scores aller Labore kann der Abb. 3-81 entnommen werden:

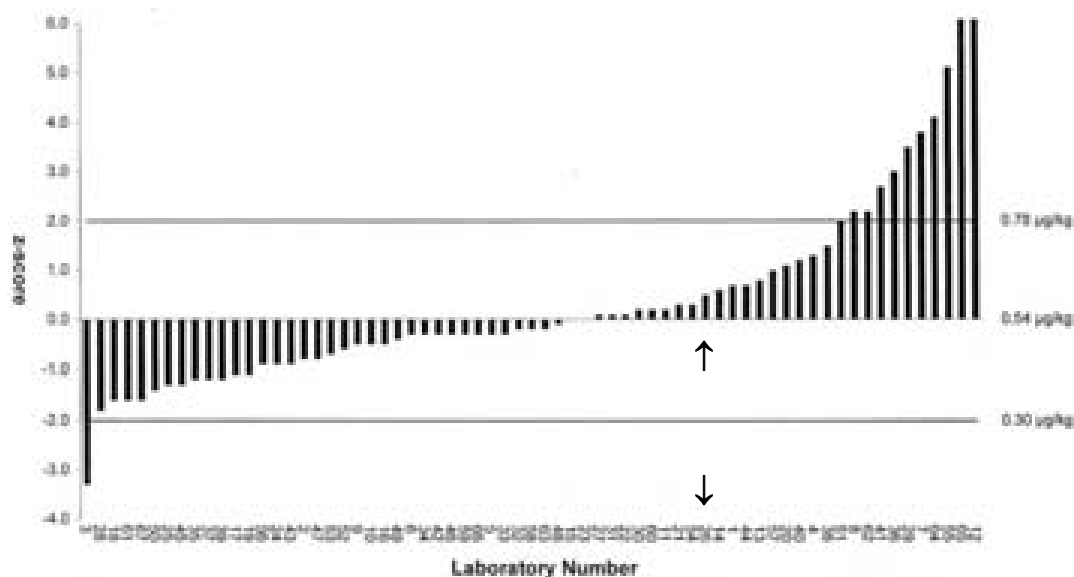


Abb. 3-81. z-scores für Chloramphenicol ($0,54 \mu\text{g}/\text{kg}$) aller beteiligten Labore
(eigene Nummer 26 - siehe Pfeil ↓)

Table 1: Results and z-Scores for Honey Test Material

laboratory number	analyze			z-score
	chromaphenol			
	result	internal standard used?	recovery %	
	assigned value 0.54 µg/kg			
001	0.60	YES		0.7
002	0.48	yes		-0.8
003	0.18	Yes		-3.3
004	1.7	Yes		1.3
005	0.91	Yes		-0.3
006	0.9	Yes		-0.3
007	1.3		100	3.8
008	0.8	No	87	2.2
009	0.477	Yes		-0.9
010	0.48	yes		-0.9
011	0.57	yes		0.2
012	2.8	No	78	17.3
013	0.84	yes		0.8
014	0.81	yes		0.8
015	0.837	yes		0.9
016	0.48	yes		-0.9
017	0.470	Yes	100	-1.1
018	0.348	Yes		-1.8
019	0.41	yes		-1.1
020	0.67	Yes		1.1
021	0.58	Yes		0.3
022	0.991	no	138	0.1
023	0.54	Yes		0.0
024	0.44	yes	—	-0.9
025	0.39		78	-1.3
→ 026	1.8	yes		0.8

The information is shown as reported by participants. Participants with performance(s) outside the satisfactory range, i.e. (z) >2 are shown in bold.

Tab. 3-28. Zusammenstellung der Ergebnisse der einzelnen Labore (eig. Nummer 026 siehe →)

Table 1 (continued): Results and z-Scores for Honey Test Material

laboratory number	analyze			z-score
	chromaphenol			
	result	internal standard used?	recovery %	
	assigned value 0.54 µg/kg			
027	0.58	Yes		0.1
028	0.33	YES		-1.8
029	0.992	no	uncorr	3.8
030	0.58	No	133	0.2
031	0.58	Yes		0.1
032	0.52	No	102	-0.2
033	0.91	Yes		-0.3
034	0.50	Yes		-0.3
035	0.4		uncorr	-1.2
036	0.9	yes		3.8
037	0.4	yes		-1.2
038	0.72	no	uncorr	1.9
039	0.40	yes		-1.2
040	0.8815	h	98	1.2
041	0.88	yes	101.8	3.7
042	0.5	yes	100	-0.3
043	0.44	Yes		-0.9
044	0.829	no	98	0.7
045	0.38	yes		-1.3
046	0.50	yes		-0.3
047	0.48	Yes		-0.8
048	0.53	yes		-0.1
049	0.48	yes		-0.4
050	0.38	yes		-1.4
051	0.776	yes		2.0
052	0.47	no	uncorr	-0.8

The information is shown as reported by participants. Participants with performance(s) outside the satisfactory range, i.e. (z) >2 are shown in bold.

Tab. 3-29. Zusammenstellung der Ergebnisse der einzelnen Labore (eig. Nummer 026 siehe →)1. Fortsetzung

Table 1 (continued): Results and z-Scores for Honey Test Material

laboratory number	analyze			z-score
	chromaphenol			
	result	internal standard used?	recovery %	
	assigned value 0.54 µg/kg			
053	0.48	no	uncorr	-0.7
054	0.38	yes		0.3
055	1.183	no	100	8.1
056	0.43	yes	80.4	-0.9
057	0.88	yes	88.82	1.0
058	0.52	No	78	-0.2
059	0.5		uncorr	-0.3
060	0.58	yes		0.2
061	0.38	Yes		-1.6
062	0.8	No	116	3.2
063	0.52	No	80*	-0.2
064	1.53		100	4.1
065	1.88	no	uncorr	11.2
066	0.50	yes		-0.3
067	0.35	yes		-1.6

The information is shown as reported by participants. Participants with performance(s) outside the satisfactory range, i.e. (z) >2 are shown in bold. * recovery correction not applied

Tab. 3-30. Zusammenstellung der Ergebnisse der einzelnen Labore (eig. Nummer 026 siehe →) 2. Fortsetzung

3.5.2.7. Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) - Gelée Royale

Definition siehe 3.5.1.1. und 3.5.2.1.

Es wird wie folgt verfahren:

Eine Leerwertprobe wird in Anlehnung an die Entscheidung 2003/181/EG mit folgenden Konzentrationen dotiert:

- | | |
|----------------------------------|------------------|
| a) 0 % MRPL-Wert (0 µg/kg) | 3 Aufbereitungen |
| b) 50 % MRPL- Wert (0,15 µg/kg) | 3 Aufbereitungen |
| c) 100 % MRPL- Wert (0,3 µg/kg) | 6 Aufbereitungen |
| d) 150 % MRPL- Wert (0,45 µg/kg) | 6 Aufbereitungen |
| e) 200 % MRPL- Wert (0,6 µg/kg) | 6 Aufbereitungen |
| f) 400 % MRPL- Wert (1,2 µg/kg) | 3 Aufbereitungen |

Jede Aufarbeitung wurde jeweils einmal gemessen.

Zur späteren Berechnung der laborinternen Reproduzierbarkeit (siehe 3.5.2.11) wurden drei Messreihen aufgestellt. Die zweite. Messreihe variiert von der ersten Messreihe durch die Probenvorbereitung, die von einer anderen Person durchgeführt wurde. Die dritte Messreihe unterscheidet sich von der ersten dadurch, dass für die Messung ein anderes LC-MS/MS-System (Finnigan TSQ Quantum Discovery MAX) verwendet wurde.

1. Messreihe:

	Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP (n = 6)	Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP
% bezogen auf den MRPL-Wert (100 % = 0,3 µg/kg Probe)		
	c (Ist) [µg/kg]	Wiederfindung [%]
0 % MRPL (0 µg/kg)	0	
50 % MRPL (0,15 µg/kg)	0,12	80,0
100 % MRPL (0,3 µg/kg)	0,19	63,9
150 % MRPL (0,45 µg/kg)	0,32	70,7
200 % MRPL (0,6 µg/kg)	0,44	73,1
400 % MRPL (1,2 µg/kg)	1,08	90,3
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$	
Steigung b	0,9434	
Achsenabschnitt a	-0,0791	
Relative Verfahrensstandardabweichung [%]	9,8	
Reststandardabweichung	0,0500	
Korrelationskoeffizient	0,9937	

Tab. 3-31. Gelée Royale: Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – 1. Messreihe

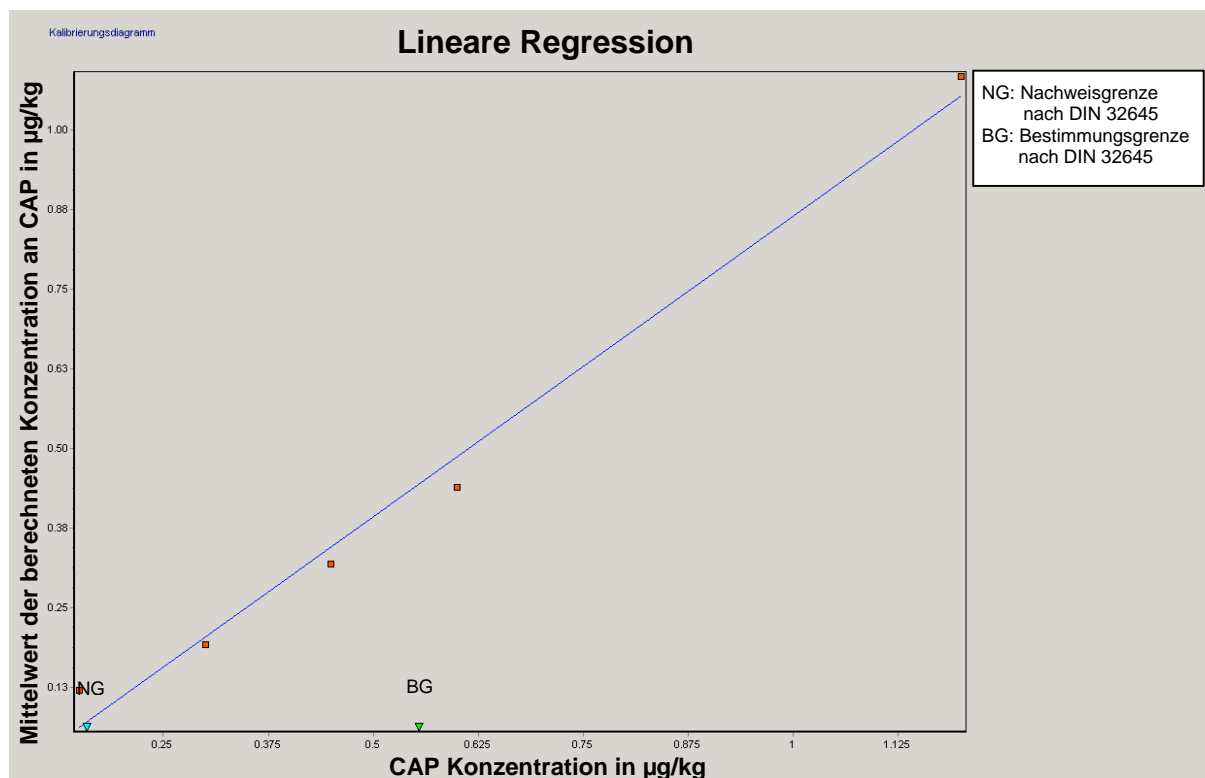


Abb. 3-82. Regressionsgerade – Gelée Royal – 1. Messreihe

2. Messreihe:

	Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP (n = 6)	Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP
% bezogen auf den MRPL-Wert (100 % = 0,3 µg/kg Probe)		
	c (Ist) [µg/kg]	Wiederfindung [%]
0 % MRPL (0 µg/kg)	0	
50 % MRPL (0,15 µg/kg)	0,18	120,0
100 % MRPL (0,3 µg/kg)	0,36	118,9
150 % MRPL (0,45 µg/kg)	0,60	133,3
200 % MRPL (0,6 µg/kg)	0,84	140,6
400 % MRPL (1,2 µg/kg)	1,62	135,3
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$	
Steigung b	1,3884	
Achsenabschnitt a	-0,0291	
Relative Verfahrensstandardabweichung [%]	4,0	
Reststandardabweichung	0,0300	
Korrelationskoeffizient	0,9989	

Tab. 3-32. Gelée Royale: Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – 2. Messreihe

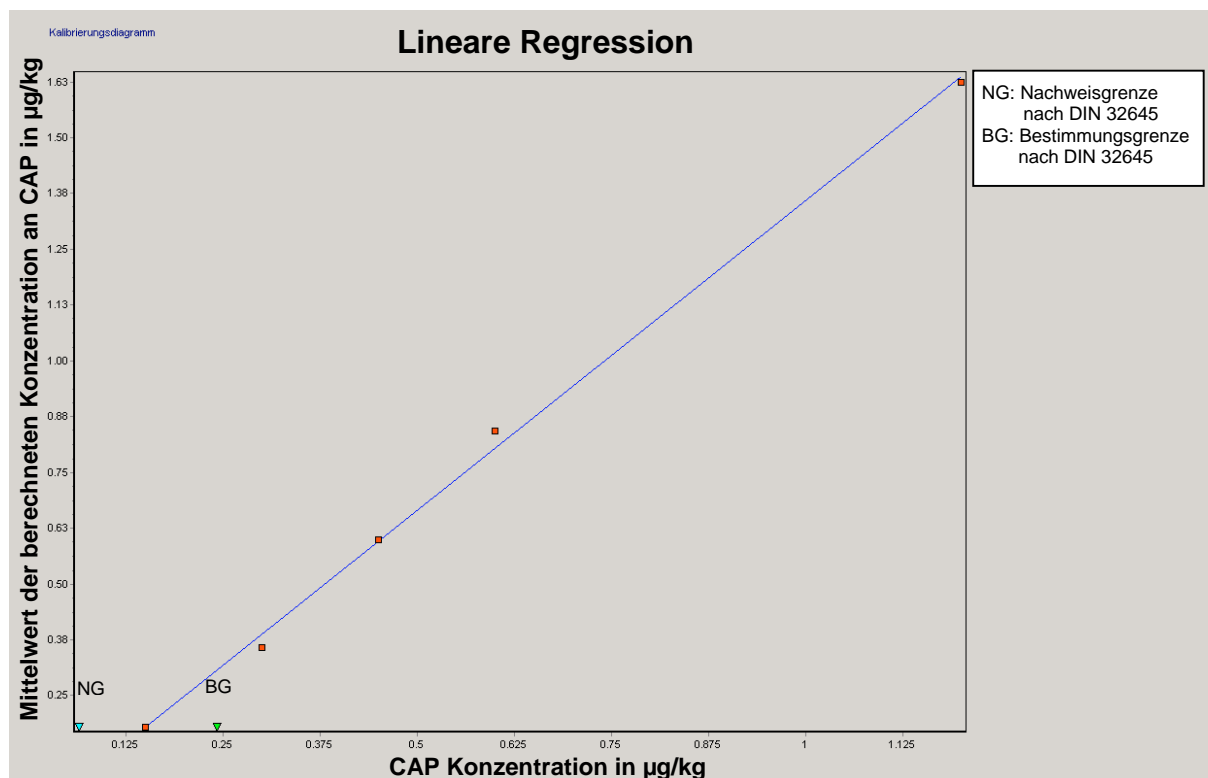


Abb. 3-83. Regressionsgerade – Gelée Royale – 2. Messreihe

3. Messreihe:

	Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP (n = 6)	Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP
% bezogen auf den MRPL-Wert (100 % = 0,3 µg/kg Probe)		
	c (Ist) [µg/kg]	Wiederfindung [%]
0 % MRPL (0 µg/kg)	0	
50 % MRPL (0,15 µg/kg)	0,13	84,5
100 % MRPL (0,3 µg/kg)	0,28	93,9
150 % MRPL (0,45 µg/kg)	0,45	98,9
200 % MRPL (0,6 µg/kg)	0,68	112,8
400 % MRPL (1,2 µg/kg)	1,44	120,0
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$	
Steigung b	1,2693	
Achsenabschnitt a	-0,0914	
Relative Verfahrensstandardabweichung [%]	3,9	
Reststandardabweichung	0,0268	
Korrelationskoeffizient	0,9990	

Tab. 3-33. Gelée Royale: Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – 3. Messreihe

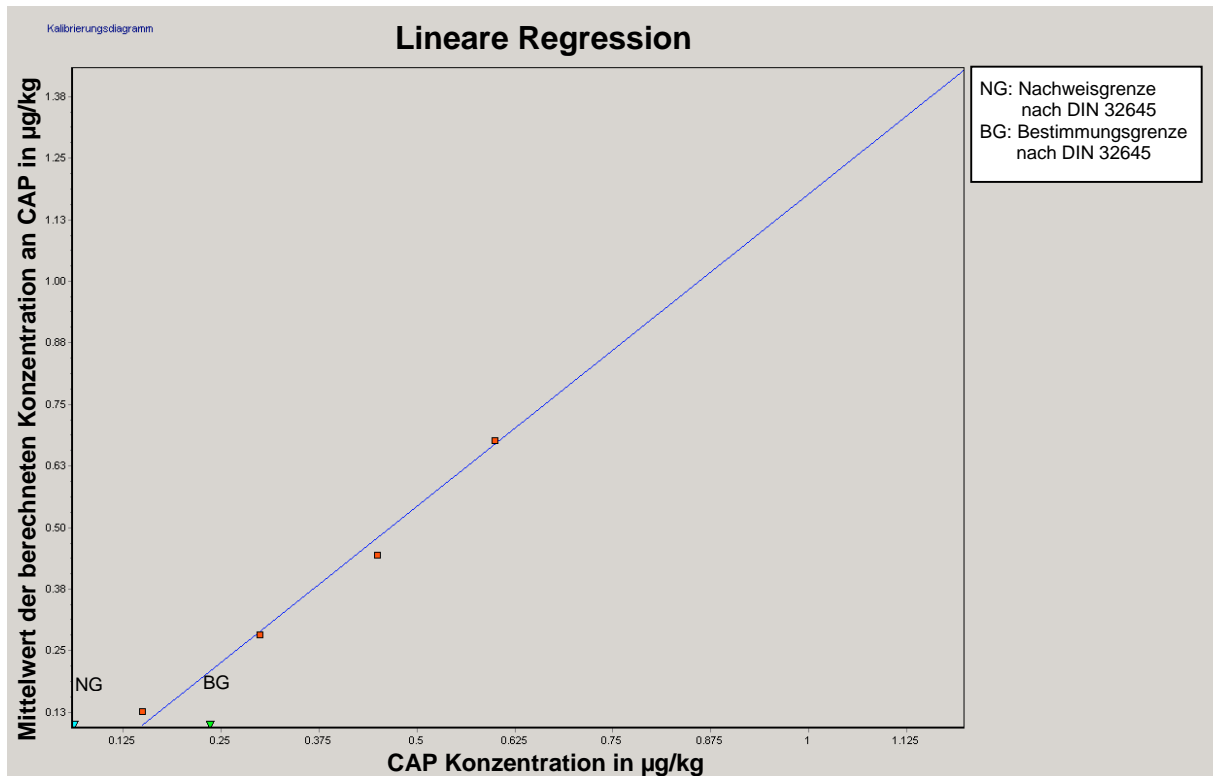


Abb. 3-84. Regressionsgerade – Gelée Royale – 3. Messreihe

Sowohl die Korrelationskoeffizienten als auch die optischen Linearitätstests lassen für alle drei Messreihen eine lineare Kalibrierfunktion erkennen.

Die gemäß der Entscheidung der Kommission 2002/657 geforderten mittleren Wiederfindungen für den Konzentrationsbereich $\leq 1 \mu\text{g/kg}$ (- 50 % bis + 20 %) werden von der ersten und der dritten Messreihe für alle analysierten Konzentrationen erreicht. Die dritte Messreihe überschreitet für die Konzentrationen 0,45, 0,6 und 1,2 $\mu\text{g/kg}$ mit + 33,3, + 40,6 und + 35,3 % die zu akzeptierenden Werte. Jedoch ist aus rechtlicher Sicht für Werte oberhalb 0,3 $\mu\text{g/kg}$ eine erhöhte Wiederfindung akzeptabel, da Lebensmittel mit CAP-Konzentrationen von $\geq 0,3 \mu\text{g/kg}$ nicht verkehrsfähig sind und eine Abweichung der Werte nach oben daher unbedeutend ist.

3.5.2.8. Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – Gelée Royale

Definition der Validierungsparameter siehe 3.5.1.2 und 3.5.1.3.

1. Messreihe:

	CAP	Wiederfindung		Wiederfindung	CAP	Wiederfindung
	100 % MRPL (0,3 µg/kg)	%	150 % MRPL (0,45 µg/kg)	%	200 % MRPL (0,6 µg/kg)	%
	c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]	
1. Messung	0,15	50,0	0,30	66,7	0,43	71,7
2. Messung	0,21	70,0	0,34	75,6	0,42	70,0
3. Messung	0,21	70,0	0,27	60,0	0,47	78,3
4. Messung	0,20	66,7	0,30	66,7	0,41	68,3
5. Messung	0,13	43,3	0,38	84,4	0,48	80,0
6. Messung	0,25	83,3	0,32	71,1	0,42	70,0
Mittelwert	0,19	63,3	0,32	71,1	0,44	73,3
Relative Standardabweichung [%]	± 23,0		± 12,0		± 6,7	
Absolute Standardabweichung [µg/kg]	± 0,04		± 0,04		± 0,03	
Wiederholbarkeit (95 %) [µg/kg]	± 0,12		± 0,11		± 0,08	

Tab. 3-34. Gelée Royale: Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – 1. Messreihe

2. Messreihe:

	CAP	Wieder- findung		Wieder- findung	CAP	Wieder- findung
	100 % MRPL (0,3 µg/kg)	%	150 % MRPL (0,45 µg/kg)	%	200 % MRPL (0,6 µg/kg)	%
	c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]	
1. Messung	0,34	88,2	0,61	135,6	0,78	130,0
2. Messung	0,31	103,3	0,58	128,9	1,00	166,7
3. Messung	0,42	140	0,55	122,2	0,79	131,7
4. Messung	0,32	106,6	0,60	133,3	0,95	158,3
5. Messung	0,32	106,6	0,65	144,4	0,72	120,0
6. Messung	0,43	143,3	0,61	135,6	0,82	136,7
Mittelwert	0,36	120,0	0,60	133,3	0,84	140,0
Relative Standardab- weichung [%]	± 15,1		± 5,6		± 12,8	
Absolute Standardab- weichung [µg/kg]	± 0,05		± 0,03		± 0,11	
Wiederhol- barkeit (95 %) [µg/kg]	± 0,15		± 0,09		± 0,31	

Tab. 3-35. Gelée Royale: Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – 2. Messreihe

3. Messreihe:

	CAP	Wieder- findung		Wieder- findung	CAP	Wieder- findung
	100 % MRPL (0,3 µg/kg)	%	150 % MRPL (0,45 µg/kg)	%	200 % MRPL (0,6 µg/kg)	%
	c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]	
1. Messung	0,29	96,7	0,41	91,1	0,67	130,0
2. Messung	0,25	83,3	0,40	88,9	0,85	166,7
3. Messung	0,30	100,0	0,40	88,9	0,53	131,7
4. Messung	0,28	93,3	0,47	104,4	0,60	158,3
5. Messung	0,31	103,3	0,49	108,9	0,70	120,0
6. Messung	0,26	86,7	0,50	111,1	0,71	136,7
Mittelwert	0,28	93,3	0,45	100,0	0,68	113,3
Relative Standardab- weichung [%]	± 8,2		± 10,5		± 16,1	
Absolute Standardab- weichung [µg/kg]	± 0,02		± 0,05		± 0,11	
Wiederhol- barkeit (95 %) [µg/kg]	± 0,07		± 0,13		± 0,31	

Tab. 3-36. Gelée Royale: Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – 3. Messreihe

Nach Horwitz ist bei einer Konzentration von 1 µg/kg eine relative Standardabweichung von 30 % akzeptabel [106]. Dieser Wert wird von allen Messreihen für die untersuchten Konzentrationsbereiche unterschritten.

3.5.2.9. Nachweis- und Bestimmungsgrenze – Gelée Royale

Definition siehe 3.5.1.4.

	Nachweisgrenze [µg/kg] für Chloramphenicol	Bestimmungsgrenze [µg/kg] für Chloramphenicol
1. Messreihe	0,16	0,56
2. Messreihe	0,07	0,24
3. Messreihe	0,06	0,24
Mittelwert aus allen drei Messreihen	0,10	0,35

Tab. 3-37. Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet nach DIN 32645 – Gelée Royale

Mittels dieser Methode wird außer für die erste Messreihe der MRPL-Wert von 0,3 µg/kg als Bestimmungsgrenze erreicht (siehe hierzu auch 3.5.2.11.3.).

3.5.2.10. Messungenauigkeit – Gelée Royale

Definition siehe 3.5.1.5.

	Wiederholbarkeit r ($\approx 2,8 \times s$)					
	Probe 100 % MRPL (0,3 µg/kg)		Probe 150 % MRPL (0,45 µg/kg)		Probe 200 % MRPL (0,6 µg/kg)	
	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%
1. Messreihe						
Chloramphenicol	0,12	41,5	0,11	24,0	0,08	13,8
2. Messreihe						
Chloramphenicol	0,15	50,8	0,09	21,0	0,31	51,0
3. Messreihe						
Chloramphenicol	0,07	21,8	0,13	29,4	0,31	51,3

Tab. 3-38. Messungenauigkeit – Gelée Royale

3.5.2.11. Laborinterne Reproduzierbarkeit – Gelée Royale

Definition siehe 3.5.2.5.

Zur Ermittlung werden die unter 3.5.2.7 beschriebenen Messreihen dotierter Leerwertproben mit Variation der Bedingungen gemessen (andere Analytiker, andere Geräte, etc.).

3.5.2.11.1. Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – Gelée Royale

Definition siehe 3.5.1.1.

	Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP	Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP
% bezogen auf den MRPL-Wert (100 % = 0,3 µg/kg Probe)		
	c (Ist) [µg/kg]	Wiederfindung [%]
0 % MRPL (0 µg/kg)		
1. Messreihe	0	
2. Messreihe	0	
3. Messreihe	0	
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	0	
50 % MRPL (0,15 µg/kg)		
1. Messreihe	0,12	80,0
2. Messreihe	0,18	120,0
3. Messreihe	0,13	84,5
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	0,14	94,8
100 % MRPL (0,3 µg/kg)		
1. Messreihe	0,19	63,9
2. Messreihe	0,36	118,9
3. Messreihe	0,28	93,9
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	0,28	92,2
150 % MRPL (0,45 µg/kg)		
1. Messreihe	0,32	70,7
2. Messreihe	0,60	133,3
3. Messreihe	0,45	98,9
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	0,45	101,0
200 % MRPL (0,6 µg/kg)		
1. Messreihe	0,44	73,1
2. Messreihe	0,84	140,6
3. Messreihe	0,68	112,8
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	0,65	108,8
400 % MRPL (1,2 µg/kg)		
1. Messreihe	1,08	90,3
2. Messreihe	1,62	135,3
3. Messreihe	1,44	120,0
Mittelwert aus allen 3 Messreihen	1,38	115,2
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$	
Steigung b	1,2004	
Achsenabschnitt a	-0,0666	
Relative Verfahrens-Standardabweichung [%]	3,5	
Reststandardabweichung	0,0268	
Korrelationskoeffizient	0,9992	

Tab. 3-39. Gelée Royale: Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte)
– Laborinterne Reproduzierbarkeit

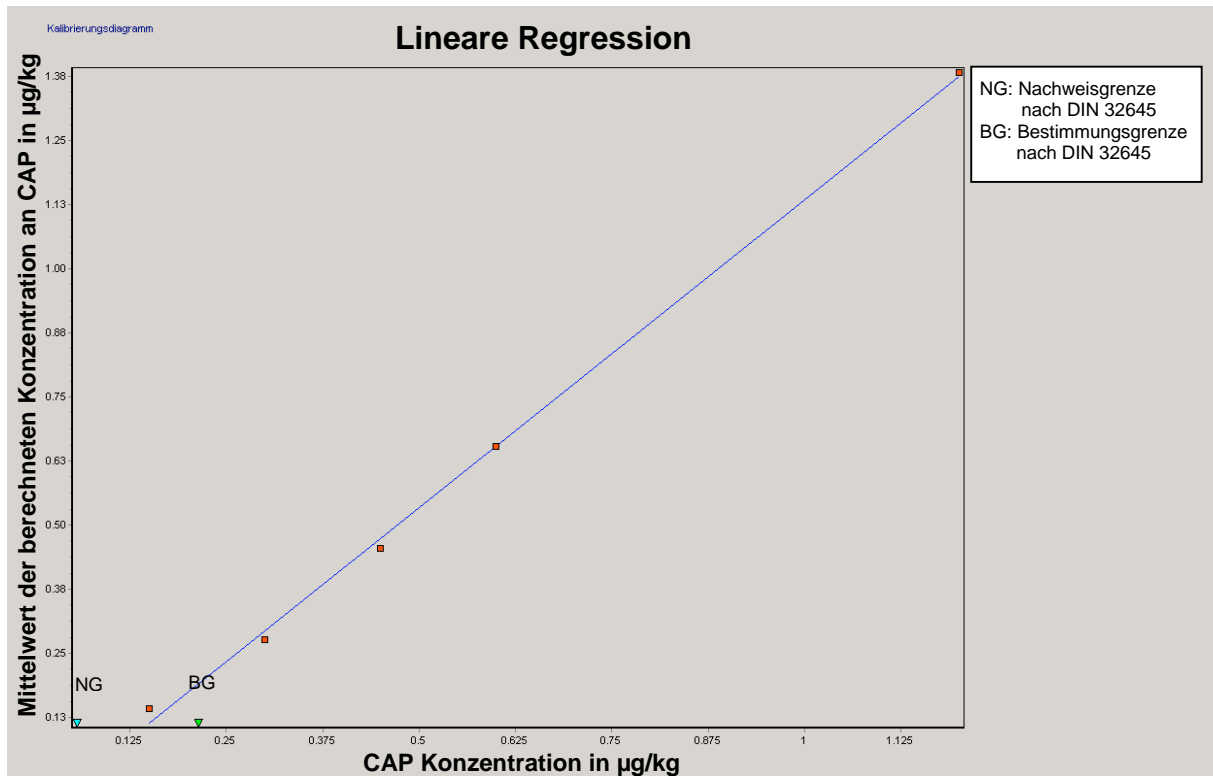


Abb. 3-85. Regressionsgerade – Gelée Royale – laborinterne Reproduzierbarkeit

Die gemäß der Entscheidung der Kommission 2002/657 geforderten mittleren Wiederfindungen für den Konzentrationsbereich $\leq 1 \mu\text{g/kg}$ (- 50 % bis + 20 %) werden für die Mittelwerte aus allen drei Messreihen für alle analysierten Konzentrationen erreicht.

Wie bei Honig sind auch beim Gelée Royale sowohl der Linearitätstest als auch die Mittelwerte der Wiederfindungen für die Berechnung über alle drei Messreihen besser als für die einzelnen Messreihen, da sich Abweichungen durch die große Anzahl an Messungen besser ausgleichen.

3.5.2.11.2. Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung)- Gelée Royale

Definition siehe 3.5.1.2. und 3.5.1.3.

	CAP	Wiederfindung		Wiederfindung	CAP	Wiederfindung
	100 % MRPL (0,3 µg/kg)	%	150 % MRPL (0,45 µg/kg)	%	200 % MRPL (0,6 µg/kg)	%
	c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]	
1. Messreihe						
1. Messung	0,15	50,0	0,30	66,7	0,43	71,7
2. Messung	0,21	70,0	0,34	75,6	0,42	70,0
3. Messung	0,21	70,0	0,27	60,0	0,47	78,3
4. Messung	0,20	66,7	0,30	66,7	0,41	68,3
5. Messung	0,13	43,3	0,38	84,4	0,48	80,0
6. Messung	0,25	83,3	0,32	71,1	0,42	70,0
2. Messreihe						
1. Messung	0,34	88,2	0,61	135,6	0,78	130,0
2. Messung	0,31	103,3	0,58	128,9	1,00	166,7
3. Messung	0,42	140	0,55	122,2	0,79	131,7
4. Messung	0,32	106,6	0,60	133,3	0,95	158,3
5. Messung	0,32	106,6	0,65	144,4	0,72	120,0
6. Messung	0,43	143,3	0,61	135,6	0,82	136,7
3. Messreihe						
1. Messung	0,29	96,7	0,41	91,1	0,67	130,0
2. Messung	0,25	83,3	0,40	88,9	0,85	166,7
3. Messung	0,30	100,0	0,40	88,9	0,53	131,7
4. Messung	0,28	93,3	0,47	104,4	0,60	158,3
5. Messung	0,31	103,3	0,49	108,9	0,70	120,0
6. Messung	0,26	86,7	0,50	111,1	0,71	136,7
Mittelwert	0,28		0,45		0,65	
Relative Standardabweichung [%]	± 28,9		± 27,4		± 29,2	
Absolute Standardabweichung [µg/kg]	± 0,08		± 0,12		± 0,19	
Wiederholbarkeit (95 %) [µg/kg]	± 0,23		± 0,35		± 0,54	

Tab. 3-40. Gelée Royale: Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung)
– Laborinterne Reproduzierbarkeit

Nach Horwitz ist bei einer Konzentration von 1 µg/kg eine relative Standardabweichung von 30 % akzeptabel [106]. Dieser Wert wird von allen Konzentrationsbereichen unterschritten.

3.5.2.11.3. Nachweis- und Bestimmungsgrenze – Gelée Royale

Definition siehe 3.5.1.4.

	Nachweisgrenze [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Chloramphenicol	0,06	0,21

Tab. 3-41. Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet nach DIN 32645 – Gelée Royale
- laborinterne Reproduzierbarkeit

Der in der Entscheidung 2003/181/EG für CAP festgelegte MRPL-Wert von 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wird von dieser Methode für die gewählte Gelée Royale-Matrix als Bestimmungsgrenze erreicht .

3.5.2.11.4. Entscheidungsgrenze (CC α) und Nachweisvermögen (CC β) – Gelée Royale

Definition siehe 3.5.2.5.4.

Entscheidungsgrenze (CC α):

$$0,0666 + 2,33 \times 0,0192 = 0,1114 \mu\text{g}/\text{kg}$$

Nachweisvermögen (CC β):

$$0,1115 + 1,64 \times 0,0322 = 0,1643 \mu\text{g}/\text{kg}$$

Entscheidungsgrenze (CC α) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,111
Nachweisvermögens (CC β) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0,164

Tab. 3-42. Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen – Gelée Royale

3.5.2.11.5. Messungengenauigkeit – Gelée Royale

Definition siehe 3.5.1.5.

	Wiederholbarkeit r ($\approx 2,8 \times s$)					
	Probe 100 % MRPL (0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)		Probe 150 % MRPL (0,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$)		Probe 200 % MRPL (0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	$\mu\text{g}/\text{kg}$	%	$\mu\text{g}/\text{kg}$	%	$\mu\text{g}/\text{kg}$	%
CAP	0,23	75,5	0,35	78,2	0,54	90,0

Tab. 3-43. Messungengenauigkeit – Gelée Royale – laborinterne Reproduzierbarkeit

3.5.2.12. Wiederfindung und Präzision für die Analyse von Pollen, lyophilisiertem Gelée Royale und Wachs

Für die wichtigsten weiteren Bienenprodukte wie Pollen, lyophilisiertes Gelée Royale und Wachs wurden die Wiederfindung und die Präzision bestimmt. Definition siehe 3.5.1.3.

Die Richtigkeit der Methode wird über die Wiederfindung bestimmt.

Es wird wie folgt verfahren:

1. Eine unbelastete Probe wird mit 30 % des CAP-Standards (1 µg/kg) versetzt.
2. Eine unbelastete Probe wird mit 200 % des CAP-Standards (1 µg/kg) versetzt.

Für die Bestimmung der Präzision des Analyseverfahrens wurde die Wiederholstandardabweichung herangezogen.

Dazu wird eine mit Chloramphenicol belastete Probe sechsmal aufgearbeitet. Von diesen Aufarbeitungen wird jeweils eine Einzelmessung durchgeführt.

3.5.2.12.1. Pollen

Sollwert (µg/kg Probe)	Istwert (µg/kg Probe)	Wiederfindung
0,30	0,27	90,0 %
2,00	2,28	114,0 %

Tab. 3-44. Wiederfindung - Pollen

Die gemäß der Entscheidung der Kommission 2002/657 geforderten mittleren Wiederfindungen für den Konzentrationsbereich ≤ 1 µg/kg (- 50 % bis + 20 %) werden für die Matix Pollen für die analysierte Konzentration erreicht. Jedoch wird für die Konzentration 2,00 µg/kg mit + 14 % der zu akzeptierenden Wert von 10 % überschritten (vergl. 3.5.1.3). Aus rechtlicher Sicht ist für Werte oberhalb 0,3 µg/kg eine erhöhte Wiederfindung akzeptabel, da Lebensmittel mit CAP-Konzentrationen von $\geq 0,3$ µg/kg nicht verkehrsfähig sind und eine Abweichung der Werte nach oben daher unbedeutend ist.

	Chloramphenicol (2 µg/kg)
	c (Ist) [µg/kg]
1. Messung	2,00
2. Messung	2,00
3. Messung	2,14
4. Messung	2,07
5. Messung	2,05
6. Messung	2,08
Mittelwert	2,06
Relative Standardabweichung [%]	± 2,6
Absolute Standardabweichung [µg/kg]	± 0,05
Wiederholbarkeit (95 %) [µg/kg]	0,15

Tab. 3-45. Präzision - Pollen

Nach Horwitz ist im Konzentrationsbereich von 1 µg/kg eine relative Standardabweichung von 30 % akzeptabel [106]. Dieser Wert wird für Pollen für die gemessene Konzentration an CAP deutlich unterschritten.

3.5.2.12.2. Gelée Royale (lyophilisiert)

Sollwert (µg/kg Probe)	Istwert (µg/kg Probe)	Wiederfindung
0,30	0,35	116,7 %
2,00	1,98	99,0 %

Tab. 3-46. Wiederfindung – Gelée Royale (lyophilisiert)

Die Ergebnisse der durchgeführten Wiederfindungsversuche liegen für die Matrix lyophilisiertes Gelée Royale innerhalb des gemäß der Entscheidung der Kommission 2002/657 geforderten Bereichs (vergl. 3.5.1.3).

	Chloramphenicol (1,5 µg/kg)
	c (Ist) [µg/kg]
1. Messung	1,40
2. Messung	1,68
3. Messung	1,61
4. Messung	1,55
5. Messung	1,49
6. Messung	1,49
Mittelwert	1,54
Relative Standardabweichung [%]	± 6,5
Absolute Standardabweichung [µg/kg]	± 0,10
Wiederholbarkeit (95 %) [µg/kg]	0,28

Tab. 3-47. Präzision – Gelée Royale (lyophilisiert)

Nach Horwitz ist im Konzentrationsbereich von 1 µg/kg eine relative Standardabweichung von 30 % akzeptabel [106]. Dieser Wert wird für lyophilisiertes Gelée Royale für die gemessene Konzentration an CAP deutlich unterschritten.

3.5.2.12.3. Wachs

Sollwert (µg / kg Probe)	Istwert (µg/kg Probe)	Wiederfindung
0,30	0,26	86,6 %
2,00	1,91	95,5 %

Tab. 3-48. Wiederfindung – Wachs

Die Ergebnisse der durchgeführten Wiederfindungsversuche liegen für die Matrix Wachs innerhalb des gemäß der Entscheidung der Kommission 2002/657 geforderten Bereichs (vergl. 3.5.1.3)

	Chloramphenicol
	(1,0 µg/kg)
	c (Ist) [µg/kg]
1. Messung	1,14
2. Messung	1,00
3. Messung	1,09
4. Messung	1,11
5. Messung	0,95
6. Messung	1,17
Mittelwert	1,08
Relative Standardabweichung [%]	± 7,9
Absolute Standardabweichung [µg/kg]	± 0,08
Wiederholbarkeit (95 %) [µg/kg]	0,24

Tab. 3-49. Präzision – Wachs

Nach Horwitz ist im Konzentrationsbereich von 1 µg/kg eine relative Standardabweichung von 30 % akzeptabel [106]. Dieser Wert wird bei Wachs für die gemessene Konzentration an CAP deutlich unterschritten.

3.5.3. online-SPE-LC-MS/MS (vergl. Methode 2.3)

Für die Validierung wurde das LC-MS System TSQ (Triple Quadrupole) von Thermo Electron verwendet.

Die Validierung erfolgt über die mittels des internen Standards wiederfindungskorrigierten berechneten Konzentrationen. Die CAP-Konzentration wird über die Bildung des Mittelwertes aus den Tochterionen der beiden Massen 321 und 323 berechnet. Daher erfolgt auch die Validierung über die Mittelwerte.

Durch das Erstellen der Kalibrierkurven mit Hilfe von dotierten Honig- bzw. Gelée Royale-Proben wird der Einfluss der Matrix mit einbezogen.

3.5.3.1. Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) - Honig

Definition siehe 3.5.1.1.

Es wird wie folgt verfahren:

Eine Leerwertprobe (Probe ohne CAP-Belastung) wird in Anlehnung an die EU-Entscheidung 2002/657/EG mit folgenden Konzentrationen dotiert:

- | | |
|----------------------------------|------------------|
| a) 0 % MRPL-Wert (0 µg/kg) | 3 Aufarbeitungen |
| b) 50 % MRPL- Wert (0,15 µg/kg) | 3 Aufarbeitungen |
| c) 100 % MRPL- Wert (0,3 µg/kg) | 6 Aufarbeitungen |
| d) 150 % MRPL- Wert (0,45 µg/kg) | 6 Aufarbeitungen |
| e) 200 % MRPL- Wert (0,6 µg/kg) | 6 Aufarbeitungen |
| f) 400 % MRPL- Wert (1,2 µg/kg) | 3 Aufarbeitungen |

Jede Aufarbeitung wurde jeweils einmal gemessen.

	Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP (n = 6)	Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP
% bezogen auf den MRPL-Wert (100 % = 0,3 µg/kg Probe)		
	c (Ist) [µg/kg]	Wiederfindung [%]
0 % MRPL (0 µg/kg)	0	
50 % MRPL (0,15 µg/kg)	0,11	71,1
100 % MRPL (0,3 µg/kg)	0,20	65,6
150 % MRPL (0,45 µg/kg)	0,40	89,6
200 % MRPL (0,6 µg/kg)	0,55	91,4
400 % MRPL (1,2 µg/kg)	1,36	113,6
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$	
Steigung b	1,2292	
Achsenabschnitt a	-0,1401	
Relative Verfahrensstandardabweichung [%]	7,9	
Korrelationskoeffizient	0,9959	

Tab. 3-50. Honig: Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte)

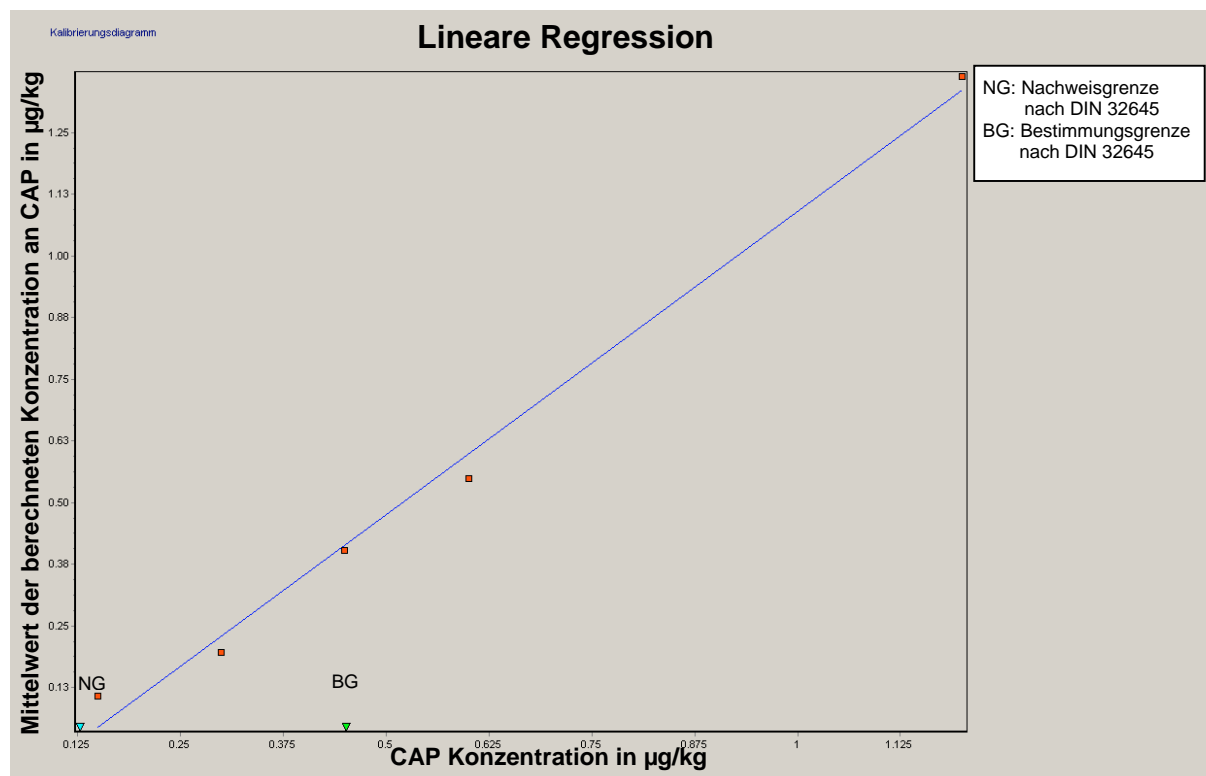


Abb. 3-55. Regressionsgerade – Honig

Sowohl die Korrelationskoeffizienten, als auch die optischen Linearitätstests lassen eine lineare Kalibrierfunktion erkennen.

Die gemäß der Entscheidung der Kommission 2002/657 geforderten mittleren Wiederfindungen für den Konzentrationsbereich $\leq 1 \mu\text{g/kg}$ (- 50 % bis + 20 %) werden für alle analysierten Konzentrationen erreicht.

3.5.3.2. Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) - Honig

Definition siehe 3.5.1.2. und 3.5.1.3.

	CAP	Wiederfindung		Wiederfindung	CAP	Wiederfindung
	100 % MRPL (0,3 $\mu\text{g/kg}$)	%	150 % MRPL (0,45 $\mu\text{g/kg}$)	%	200 % MRPL (0,6 $\mu\text{g/kg}$)	%
	c (Ist) [$\mu\text{g/kg}$]		c (Ist) [$\mu\text{g/kg}$]		c (Ist) [$\mu\text{g/kg}$]	
1. Messung	0,19	63,3	0,39	86,7	0,57	95,0
2. Messung	0,18	60,0	0,39	86,7	0,65	108,3
3. Messung	0,16	53,3	0,48	106,7	0,51	85,0
4. Messung	0,23	76,7	0,42	93,3	0,53	88,3
5. Messung	0,26	86,7	0,37	82,2	0,48	80,0
6. Messung	0,16	53,3	0,37	82,2	0,55	91,7
Mittelwert	0,20	65,6	0,40	89,6	0,55	91,4
Rel. Standardabweichung [%]	$\pm 20,5$		$\pm 10,4$		$\pm 10,7$	
Abs. Standardabweichung [%]	$\pm 0,04$		$\pm 0,04$		$\pm 0,06$	
Wiederholbarkeit (95 %)	$\pm 0,11$		$\pm 0,12$		$\pm 0,17$	

Tab. 3-51. Honig: Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung)

Nach Horwitz ist bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/kg}$ eine relative Standardabweichung von 30 % akzeptabel [106]. Dieser akzeptierte Wert wird von der angewendeten Methode deutlich unterschritten.

3.5.3.3. Nachweis- und Bestimmungsgrenze - Honig

Definition siehe 3.5.1.4.

	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/kg}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/kg}$]
Chloramphenicol	0,13	0,45

Tab. 3-52. Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet nach DIN 32645 - Honig

Da für die Berechnung der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 [100] mittels der Software Valoo 1.0 (Copyright © 1999 by analyt-soft Dr. Stella Windmann) nur wenige Messwerte zur Verfügung standen, wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze über die Signalhöhe in einer dotierten Matrixprobe bestimmt. Für die Ermittlung der Nachweisgrenze wird ein Signal/Rausch (signal-to-noise)-Verhältnis von 3:1 und für die Bestimmungsgrenze von 9:1 empfohlen [106].

Dazu wurden von einem mit 0,3 µg/kg CAP dotierten unbelasteten Honig die Signalhöhe für Chloramphenicol und die des Untergrundrauschens bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Da die Methode nur semi-quantitativ genutzt werden soll, war das Erreichen des MRPL-Wertes als Bestimmungsgrenze von besonderer Bedeutung.

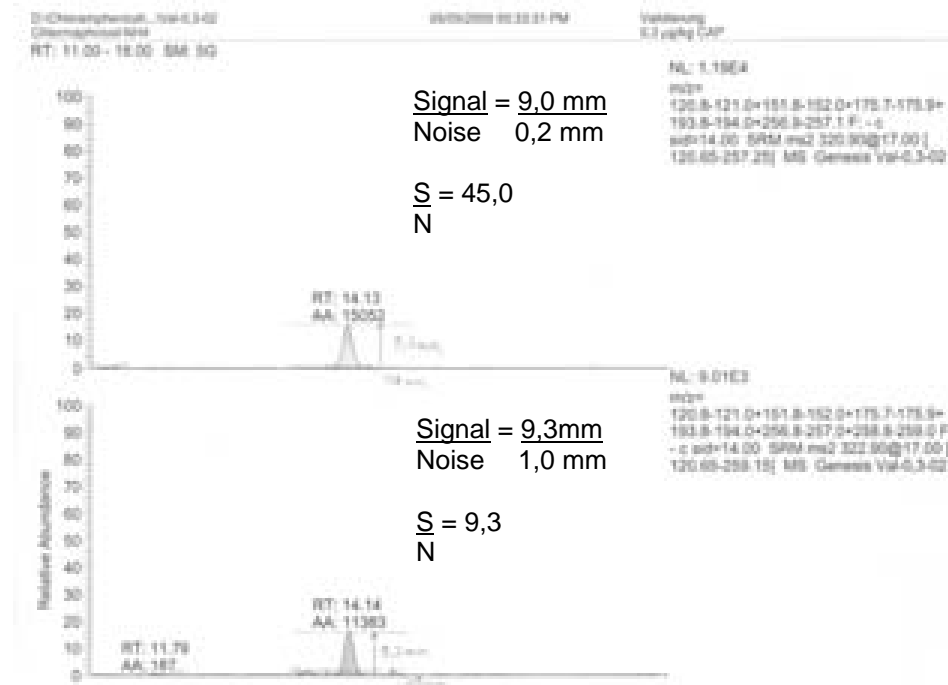


Abb. 3-87. Bestimmung der Bestimmungsgrenze aus dem Chromatogramm eines mit 0,3 µg/kg CAP dotierten Honigs für die Massenspuren 321 und 323

Massenspur	Peakhöhe (Signal) [mm]	Höhe des Rauschens (Noise) [mm]	Signal/Noise
321	9,0	0,2	45,0
323	9,3	1,0	9,3

Tab. 3-53. Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet aus dem Signal/Rausch -Verhältnis

Mittels dieser Methode wird somit für beide Massenspuren der MRPL-Wert von 0,3 µg/kg als Bestimmungsgrenze erreicht.

3.5.3.4. Messungenauigkeit - Honig

Definition siehe 3.5.1.5.

	Wiederholbarkeit r (≈ 2,8 x s)					
	Probe 100 % MRPL (0,3 µg/kg)		Probe 150 % MRPL (0,45 µg/kg)		Probe 200 % MRPL (0,6 µg/kg)	
	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%
CAP	0,11	38,0	0,12	26,3	0,17	27,7

Tab. 3-54. Messungenauigkeit - Honig

3.5.3.5. Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte) – Gelée Royale

Definition siehe 3.5.1.1.

Es wird wie folgt verfahren:

Eine Leerwertprobe (Probe ohne CAP-Belastung) wird in Anlehnung an die EU-Entscheidung 2002/657/EG mit folgenden Konzentrationen dotiert:

- | | |
|----------------------------------|------------------|
| g) 0 % MRPL-Wert (0 µg/kg) | 3 Aufarbeitungen |
| h) 50 % MRPL- Wert (0,15 µg/kg) | 3 Aufarbeitungen |
| i) 100 % MRPL- Wert (0,3 µg/kg) | 6 Aufarbeitungen |
| j) 150 % MRPL- Wert (0,45 µg/kg) | 6 Aufarbeitungen |
| k) 200 % MRPL- Wert (0,6 µg/kg) | 6 Aufarbeitungen |
| l) 400 % MRPL- Wert (1,2 µg/kg) | 3 Aufarbeitungen |

Jede Aufarbeitung wurde jeweils einmal gemessen.

	Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP (n = 6)	Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert der berechneten Konzentration an CAP
% bezogen auf den MRPL-Wert (100 % = 0,3 µg/kg Probe)		
	c (Ist) [µg/kg]	Wiederfindung [%]
0 % MRPL (0 µg/kg)	0	
50 % MRPL (0,15 µg/kg)	0,09	60,0
100 % MRPL (0,3 µg/kg)	0,14	46,7
150 % MRPL (0,45 µg/kg)	0,32	71,1
200 %MRPL (0,6 µg/kg)	0,39	65,0
400 % MRPL (1,2 µg/kg)	0,92	76,7
Lineare Kalibrierung	$y = a + bx$	
Steigung b	0,8133	
Achsenabschnitt a	-0,0672	
Relative Verfahrensstandardabweichung [%]	9,0	
Korrelationskoeffizient	0,9946	

Tab. 3-55. Gelée Royale: Linearität und Wiederfindung (Mittelwerte)

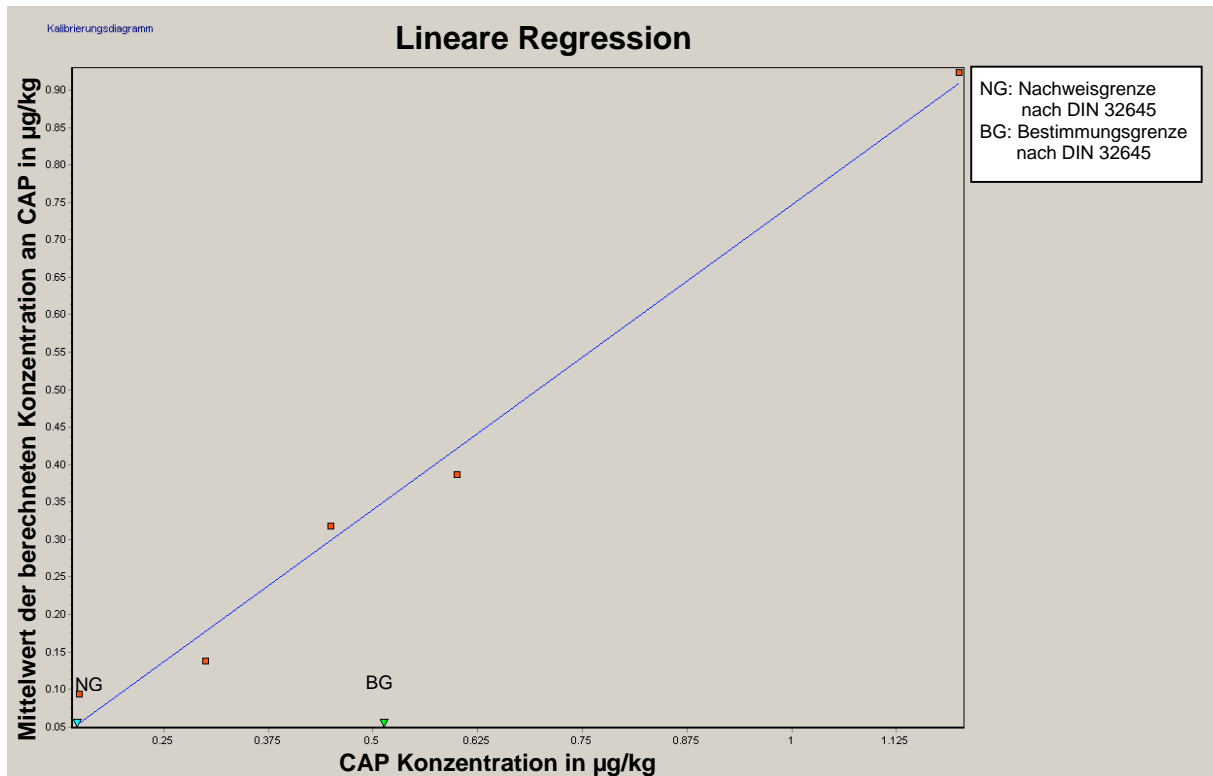


Abb. 3-88. Regressionsgerade – Gelée Royale

Sowohl die Korrelationskoeffizienten, als auch die optischen Linearitätstests lassen für alle drei Messreihen eine lineare Kalibrierfunktion erkennen.

Die gemäß der Entscheidung der Kommission 2002/657 geforderten mittleren Wiederfindungen für den Konzentrationsbereich $\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (- 50 % bis + 20 %) werden für fast alle analysierten Konzentrationen erreicht. Für $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ wird mit 46,7 % die mittlere Wiederfindung unterschritten. Daher kann die Methode auch nur semi-quantitativ genutzt werden.

3.5.3.6. Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung) – Gelée Royale

Definition siehe 3.5.1.2. und 3.5.1.3.

	CAP	Wiederfindung		Wiederfindung	CAP	Wiederfindung
	100 % MRPL (0,3 µg/kg)	%	150 % MRPL (0,45 µg/kg)	%	200 % MRPL (0,6 µg/kg)	%
	c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]		c (Ist) [µg/kg]	
1. Messung	0,11	36,7	0,38	84,4	0,45	75,0
2. Messung	0,11	36,7	0,30	66,7	0,41	68,3
3. Messung	0,15	50,0	0,36	80,0	0,25	41,7
4. Messung	0,19	63,3	0,33	73,3	0,45	75,0
5. Messung	0,14	46,6	0,25	55,6	0,40	66,7
6. Messung	0,13	43,3	0,29	64,4	0,36	60,0
Mittelwert	0,14	46,7	0,32	71,1	0,39	65,0
Rel. Standardabweichung [%]	± 21,7		± 15,05		± 19,40	
Abs. Standardabweichung [%]	± 0,03		± 0,05		± 0,08	
Wiederholbarkeit (95 %)	± 0,08		± 0,14		± 0,21	

Tab. 3-56. Gelée Royale: Präzision und Wiederfindung (Einzelmessung)

Nach Horwitz ist bei einer Konzentration von 1 µg/kg eine relative Standardabweichung von 30 % akzeptabel [106]. Dieser akzeptierte Wert wird von der angewandten Methode für alle Konzentrationen deutlich unterschritten.

3.5.3.7. Nachweis- und Bestimmungsgrenze – Gelée Royale

Definition siehe 3.5.1.4.

	Nachweisgrenze [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Chloramphenicol	0,15	0,51

Tab. 3-57. Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet nach DIN 32645 – Gelée Royale

Zur Berechnung der Bestimmungsgrenze wurde von einem mit $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ CAP dotierten unbelasteten Gelée Royale die Signalhöhe für Chloramphenicol und die des Untergrundrauschens bestimmt und ins Verhältnis gesetzt (Erläuterungen siehe 3.5.3.3).

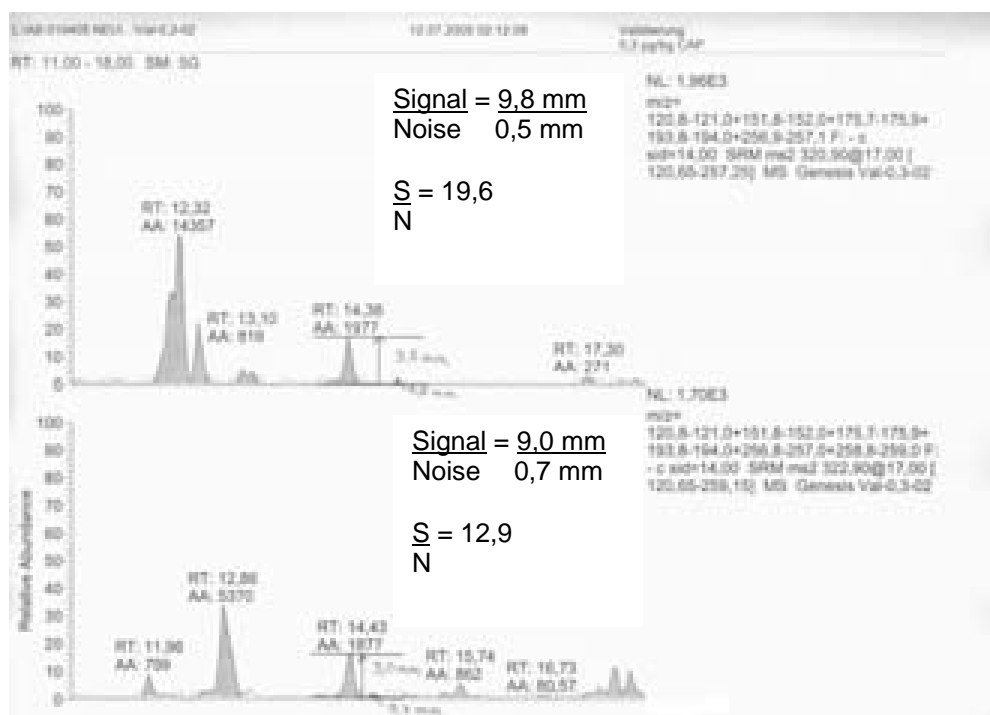


Abb. 3-89. Bestimmung der Bestimmungsgrenze aus dem Chromatogramm eines mit $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ CAP dotierten Gelée Royales für die Massenspur 321 und 323

Massenspur	Peakhöhe (Signal) [mm]	Höhe des Rauschens (Noise) [mm]	Signal/Noise
321	9,8	0,5	19,6
323	9,0	0,7	12,9

Tab. 3-58. Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet aus dem Signal-to-Noise-Verhältnis

Mittels dieser Methode wird somit für beide Massenspuren der MRPL-Wert von $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ als Bestimmungsgrenze erreicht.

3.5.3.8. Messungenauigkeit – Gelée Royale

Definition siehe 3.5.1.5.

	Wiederholbarkeit r ($\approx 2,8 \times s$)					
	Probe 100 % MRPL (0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)		Probe 150 % MRPL (0,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$)		Probe 200 % MRPL (0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	$\mu\text{g}/\text{kg}$	%	$\mu\text{g}/\text{kg}$	%	$\mu\text{g}/\text{kg}$	%
CAP	0,08	26,7	0,14	31,1	0,21	35,0

Tab. 3-59. Messungenauigkeit – Gelée Royale

3.5.4. Vergleich der Methoden anhand der Validierungsdaten

Dem Vergleich der Validierungsparameter für Honig und Gelée Royale ist zu entnehmen, dass die Werte für Gelée Royale insgesamt schlechter sind als die für Honig. Dies lässt sich durch die komplexere Matrix des Gelée Royales erklären.

Die LC-MS ist gegenüber der LC-MS/MS unspezifischer und unempfindlicher, was sich auch in den Validierungsdaten widerspiegelt. Die besten Ergebnisse erhält man für die LC-MS/MS-Analyse des mittels Extraktion mit Ethylacetat aufgereinigten Extraktes. Die alleinige Aufarbeitung durch Festphasenextraktion mittels RP18-Material unter Einsatz der Kopplung der online-SPE mit der LC-MS/MS liefert zu schlechte Reproduzierbarkeiten und Wiederfindungen, um diese Methode quantitativ zu nutzen. Jedoch wird der MRPL-Wert von 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ erreicht. Daher kann diese Methode als Screeningmethode auf CAP-Belastungen $\geq 0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ genutzt werden, da sie im Gegensatz zur LC-MS/MS-Methode aufgrund der einfachen Probenvorbereitung sehr schnelle Ergebnisse liefert.

3.6. ELISA

Der ELISA-Test ist eine Screeningmethode. Er ist sehr spezifisch, kann aber zu Falsch-Positiv-Ergebnissen führen. Daher müssen Positiv-Befunde durch eine weitere Methode bestätigt werden. Die Bestimmungsgrenze des verwendeten Tests beträgt 0,1 µg/kg.

Für Gelée Royale und Gelée Royale-haltige Produkte kann der ELISA-Test nicht eingesetzt werden. Proben die zuvor mittels LC-MS analysiert worden waren und in denen kein Chloramphenicol nachgewiesen werden konnte, ergaben bei der Analyse mittels ELISA in fast 100 % der Fälle Positiv-Befunde. Dies Ergebnis war unabhängig von der Probenvorbereitung. Sowohl Proben, die mittels der von r-biopharm beschriebenen Aufarbeitung für Honig vorbereitet wurden (siehe 2.5.2), als auch Proben, die mittels der für die LC-MS/MS-Analyse von Gelée Royale (siehe 2.2.4.2) entwickelten Aufarbeitung vorbereitet wurden, führten zu Positiv-Befunden bei der Analyse mittels ELISA.

Gelée Royale	CAP-Konzentration mittels LC-MS ermittelt	CAP-Konzentration mittels ELISA ermittelt
1	< 0,1	0,2
2	< 0,1	0,1
3	1,1	0,2
4	4,2	1,2
5	< 0,1	0,7

Tab. 3-60. Vergleich der mittels ELISA und LC-MS ermittelten CAP-Gehalte für Gelée Royale

Der ELISA-Test zur Bestimmung von CAP kann ausschließlich für die Bestimmung in Honig verwendet werden. Positiv-Befunde werden mit LC-MS bzw. LC-MS/MS abgesichert.

Um die Korrelation der beiden zur Bestimmung von CAP in Honig eingesetzten Methoden zu erhalten, wurden die mittels ELISA ermittelten Werte mit den mit der LC-MS/MS-Methode gemessenen verglichen. In drei Konzentrationsbereichen wurden je 20 Werte stichprobenartig aus den Aufzeichnungen herausgenommen und in einer Tabelle gegenübergestellt. Die Konzentrationsbereiche 0,1 - 0,2, 0,3 - 1,0 und 1,1 - 4,0 µg/kg wurden gewählt, da sie die Häufigkeit der mittels LC-MS/MS ermittelten Positiv-Befunde für CAP in Honig widerspiegeln. Beim ersten Konzentrationsbereich verteilen sich die 20 Werte auf einen Bereich von 0,1 - 0,2 µg/kg. Dies ist der prozentual am häufigsten auftretende Konzentrationsbereich. Der Konzentrationsbereich von 0,3 - 1,0 µg/kg kommt am zweit häufigsten vor. Beim dritten Konzentrationsbereich hingegen verteilen sich die 20 Werte auf einen Bereich von 1,1 - 4,0 µg/kg. Der prozentuale Anteil dieses Bereichs ist der geringste. 4,0 µg/kg ist die Grenzkonzentration für quantitative Aussagen mittels des ELISA-Tests und daher die obere Grenze des dritten Konzentrationsbereichs.

In die Betrachtung und in die stichprobenartige Auswahl der Werte floss die Häufigkeit der Werte an der Gesamtheit der Positiv-Befunde mit ein. Es erfolgte keine komplette statistische Auswertung, sondern es wurde eine zufällige Auswahl der Werte unter Berücksichtigung der Konzentrationsbereiche getroffen.

Konzentrationsbereich 0,1 - 0,2 µg/kg gemäß LC-MS/MS				
Probe	LC-MS/MS c (CAP) [µg/kg]	ELISA c (CAP) [µg/kg]	Abweichung des ELISA- Wertes vom LC-MS/MS-Wert	
			absolut [µg/kg]	relativ [%]
1	0,1	0,1	0	0
2	0,1	0,1	0	0
3	0,1	0,1	0	0
4	0,1	0,2	0,1	100
5	0,1	0,2	0,1	100
6	0,1	0,2	0,1	100
7	0,1	0,1	0	0
8	0,1	0,2	0,1	100
9	0,1	0,2	0,1	100
10	0,1	0,3	0,2	200
11	0,2	0,2	0	0
12	0,2	0,2	0	0
13	0,2	0,3	0,1	50
14	0,2	0,2	0	0
15	0,2	0,2	0	0
16	0,2	0,2	0	0
17	0,2	0,3	0,1	50
18	0,2	0,2	0	0
19	0,2	0,2	0	0
20	0,2	0,2	0	0
Mittlere Abweichung Absolute Zahlen (-4 = 4 = +4)			0,045	40,0

Tab. 3-61. Konzentrationsbereich 0,1 - 0,2 µg/kg:
Vergleich der mittels ELISA ermittelten Konzentrationen für CAP mit denen
mittels LC-MS/MS erhaltenen

Konzentrationsbereich 0,3 - 1,0 µg/kg gemäß LC-MS/MS				
Probe	LC-MS/MS c (CAP) [µg/kg]	ELISA c (CAP) [µg/kg]	Abweichung des ELISA- Wertes vom LC-MS/MS-Wert	
			absolut [µg/kg]	relativ [%]
1	0,3	0,3	0	0
2	0,3	0,4	0,1	33,3
3	0,3	0,4	0,1	33,3
4	0,4	0,3	-0,1	33,3
5	0,4	0,3	-0,1	25
6	0,4	0,4	0	0
7	0,5	0,7	0,2	40
8	0,6	0,8	-0,2	33,3
9	0,6	0,7	0,1	16,7
10	0,6	0,5	-0,1	16,7
11	0,6	0,6	0	0
12	0,7	0,9	0,2	28,6
13	0,7	0,5	-0,2	28,6
14	0,8	1,1	0,3	37,5
15	0,9	1,3	0,4	44,4
16	0,9	1,0	0,1	11,1
17	0,9	0,6	-0,3	33,3
18	1,0	1,4	0,4	40
19	1,0	0,9	-0,1	10
20	1,0	1,4	0,4	40
Mittlere Abweichung Absolute Zahlen (-4 = 4 = +4)			0,17	25,3

Tab. 3-62. Konzentrationsbereich 0,3 - 1,0 µg/kg:
Vergleich der mittels ELISA ermittelten Konzentrationen für CAP mit denen
mittels LC-MS/MS erhaltenen

Konzentrationsbereich 1,1 - 4,0 µg/kg* gemäß LC-MS/MS				
Probe	LC-MS/MS c (CAP) [µg/kg]	ELISA c (CAP) [µg/kg]	Abweichung des ELISA- Wertes vom LC-MS/MS-Wert	
			absolut [µg/kg]	relativ [%]
1	1,1	1,6	0,5	45,5
2	1,1	0,9	-0,2	18,8
3	1,2	1,2	0	0
4	1,2	1,6	0,4	33,3
5	1,4	1,5	0,1	7,1
6	1,5	1,3	-0,2	13,3
7	1,6	1,1	-0,5	31,3
8	1,6	1,1	-0,5	31,3
9	1,6	1,6	0	0
10	1,8	1,9	0,1	5,5
11	1,8	1,7	-0,1	5,5
12	1,9	1,9	0	0
13	1,9	1,7	-0,2	10,5
14	2,1	1,9	-0,2	9,5
15	2,4	1,1	-1,3	54,2
16	2,7	2,8	0,1	3,7
17	2,7	3,0	0,3	11,1
18	3,0	3,3	0,3	10
19	3,0	2,2	-0,8	26,7
20	3,4	2,5	-0,9	26,5
Mittlere Abweichung Absolute Zahlen (-4 = 4 = +4)			0,325	17,2

Tab. 3-63. Konzentrationsbereich 1,1 - 4,0 µg/kg:
Vergleich der mittels ELISA ermittelten Konzentrationen für CAP mit denen
mittels LC-MS/MS erhaltenen

*Der ELISA-Test kann nur Werte bis 4,0 µg/kg exakt quantifizieren.

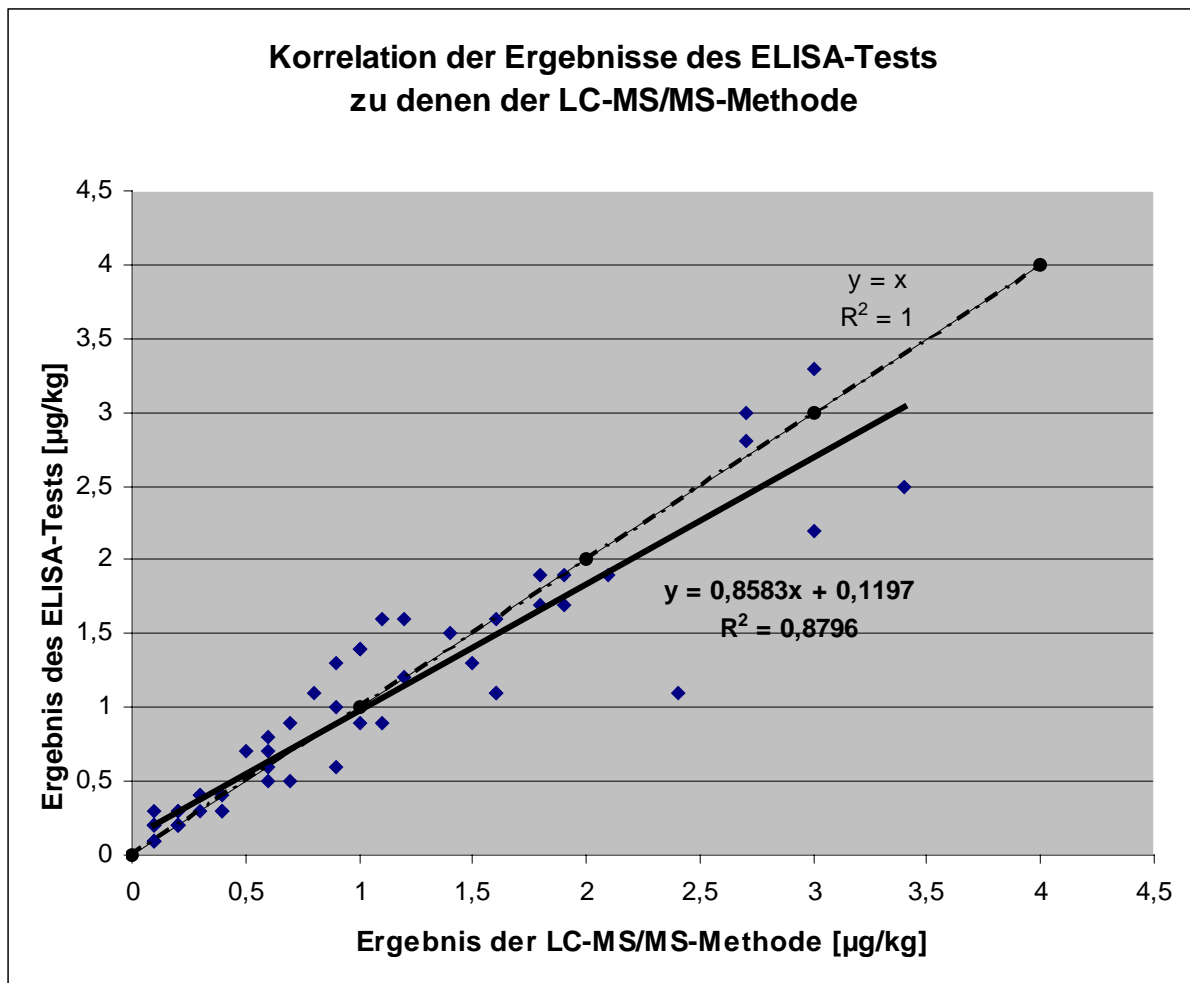


Abb. 3-90. Graphische Darstellung der Korrelation der Ergebnisse des ELISA-Tests zu denen der LC-MS/MS-Methode

Das Diagramm visualisiert die absolute Abweichung der ELISA-Werte von denen, die mit der LC-MS/MS-Methode ermittelt wurden. Die durchgängig dicke Linie entspricht der Regressionsgeraden. Die leicht gestrichelte Linie stellt die Verteilung dar, wenn die Werte der LC-MS/MS-Analyse den Werten des ELISA-Tests entsprächen ($R^2 = 1$). Die tatsächlichen Werte streuen um diese Gerade. Wie zu erwarten, nimmt die Streuung der Absolutwerte vom unteren Konzentrationsbereich zum hohen Konzentrationsbereich hin zu. Die prozentuale Abweichung dagegen verhält sich gegenläufig.

30 % der Ergebnisse stimmen überein, 43 % der ELISA-Ergebnisse liegen höher als der LC-MS/MS-Wert und 27 % der ELISA-Ergebnisse niedriger als der LC-MS-Wert. Jedoch ist die Verteilung in den verschiedenen Konzentrationsbereichen unterschiedlich:

Konzentrationsbereich	Übereinstimmende Werte	ELISA Wert > LC-MS/MS-Werte	ELISA-Werte < LC-MS/MS-Werte
0,1 - 0,2 µg/kg	60 %	40 %	-
0,3 - 1,0 µg/kg	15 %	55 %	30 %
1,1 - 4,0 µg/kg	15 %	35 %	50 %

Tab. 3-64. Übereinstimmung der mittels ELISA ermittelten Konzentrationen für CAP mit denen mittels LC-MS/MS erhaltenen

Insgesamt ist eine sehr gute Korrelation der ELISA-Werte mit den LC-MS/MS-Werten zu beobachten, insbesondere wenn man berücksichtigt, dass es sich beim ELISA-Test um eine Screeningmethode handelt, die nicht den Anspruch exakter quantitativer Ergebnisse erhebt. Im niedrigen Konzentrationsbereich ist die Übereinstimmung am größten, was auch durch den mit 0,1 - 0,2 µg/kg sehr klein gewählten Konzentrationsbereich bedingt ist. Die beiden höheren Konzentrationsbereiche haben mit 15 % denselben prozentualen Anteil an übereinstimmenden Werten. Im Konzentrationsbereich > 1 µg/kg liegen 50 % der mit dem ELISA-Test ermittelten Werte niedriger als die mittels LC-MS/MS ermittelten, während unter 1 µg/kg die ELISA Werte mehrheitlich höher sind als die LC-MS/MS-Werte.

Falsch-Positiv-Befunde konnten beim ELISA-Test relativ selten beobachtet werden. Hauptsächlich waren es mittels ELISA ermittelte Werte im Bereich von 0,1 bis 0,2 µg/kg, die in der anschließenden LC-MS/MS-Bestätigung ein Ergebnis < 0,1 µg/kg ergaben. Hohe Positiv-Befunde die mit der LC-MS/MS nachweislich negativ waren, traten kaum auf.

Falsch-Negativ-Befunde des ELISA-Tests konnten trotz der großen Anzahl an Messungen (ca. 10000) nicht beobachtet werden.

3.7. Herkunftsbestimmung mittels Pollenanalyse

3.7.1. Ergebnisse der Pollenanalysen

Chloramphenicol-Positiv-Befunde traten nicht nur in Honigen aus asiatischen Ländern wie China oder Vietnam auf, sondern auch in Honigen aus Mittel-/Südamerika und Osteuropa. Um die Herkunft des Honigs zu bestätigen und um ausschließen zu können, dass es sich um falsch-deklarierten chinesischen Honig handelt oder dass chinesischer Honig zugesetzt wurde, wurden für einzelne Honige Pollenanalysen durchgeführt.

a) Kundenangabe: Honig aus Brasilien Chloramphenicol-Gehalt: 0,3 µg/kg

Pollenanalyse:

Sorte: Blütenhonig
Herkunft: Südamerika (Brasilien)
kein China-Anteil erkennbar

b) Kundenangabe: Honig aus Russland Chloramphenicol-Gehalt: 16,9 µg/kg

Pollenanalyse:

Sorte: Blütenhonig
Herkunft: Südosteuropa
kein China-Anteil erkennbar

c) Kundenangabe: Honig aus Peru

Chloramphenicol-Gehalt: 12,7 µg/kg

Pollenanalyse:

Sorte: Blütenhonig
Herkunft: Süd-/Mittelamerika
kein China-Anteil erkennbar

d) Kundenangabe: Honig aus der Türkei

Chloramphenicol-Gehalt: 0,4 µg/kg

Pollenanalyse:

Sorte: Baumwollhonig
Herkunft: Türkei
kein China-Anteil erkennbar

e) Kundenangabe: Honig aus Moldawien

Chloramphenicol-Gehalt: 10,6 µg/kg

Pollenanalyse:

Sorte: Sonnenblumenhonig
Herkunft: Osteuropa (Moldawien)
kein China-Anteil erkennbar

f) Kundenangabe: Honig aus Rumänien

Chloramphenicol-Gehalt: 1,8 µg/kg

Pollenanalyse:

Sorte: Lindenhonig
Herkunft: Osteuropa (Rumänien)
kein China-Anteil erkennbar

g) Kundenangabe: Honig aus Bulgarien

Chloramphenicol-Gehalt: 7,1 µg/kg

Pollenanalyse:

Sorte: Korianderhonig
Herkunft: Osteuropa (Bulgarien)
kein China-Anteil erkennbar

h) Kundenangabe: Honig aus der Ukraine

Chloramphenicol-Gehalt: 2,3 µg/kg

Pollenanalyse:

Sorte: Blütenhonig
Herkunft: Ukraine
pollenarm
kein China-Anteil erkennbar

3.7.2. Diskussion der Ergebnisse

Durch die Pollenanalysen konnte kein China-Pollen mikroskopisch nachgewiesen werden, und die geographische Zuordnung aufgrund des Pollenbildes konnte eindeutig erfolgen. Alle Honige stammten laut Pollenanalyse aus den angegebenen Ländern. Daher ist eine Anwendung chloramphenicolhaltiger Arzneimittel in diesen Ländern sehr wahrscheinlich.

Eventuelle Beimengungen von chinesischem Honig, dessen Pollen möglicherweise durch Filtration entfernt wurden, können über die Pollenanalyse nicht ausgeschlossen werden.

Die Anwendung der Ultrafiltration für Honig in China ist bekannt. Jedoch ist anzunehmen, dass bei ultrafiltriertem Honig auch vorhandene Chloramphenicolrückstände entfernt werden.

Eine weitere Kontaminationsquelle könnte Wachs sein, das aus früheren Behandlungen CAP enthält und wiederverwendet wurde. (siehe dazu 3.8).

3.8. Migration des Chloramphenicols

3.8.1. Hintergrund

In der Imkerei wird das Wachs der Waben wiederverwendet. Dazu werden die Altwaben eingeschmolzen und zu Mittelwänden verarbeitet. Mittelwände sind dünne, aus Bienenwachs hergestellte Wachsplatten, die beidseitig mit einer Zellprägung versehen wurden. Sie werden entweder gegossen oder gewalzt und sind ein wichtiges Betriebsmittel in der Imkerei. Diese Mittelwände werden in die Rähmchen des Bienenstockes eingesetzt und von den Bienen weiter ausgebaut.

Chloramphenicol konnte auch in Wachs nachgewiesen werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass sich CAP-Rückstände im Wachs anreichern und sich später in den für die Weiterverwendung aufgearbeiteten Mittelwänden wiederfinden lassen. Von dort aus wäre eine Migration in den Honig möglich, die durch die im Stock herrschenden erhöhten Temperaturen (36 - 37°C) unterstützt würde (siehe dazu den Versuch 2.6).

3.8.2. Ergebnisse

In dem zuvor unbelasteten Honig, der gemäß 2.6 mit CAP (1,5 µg/kg) belasteten Wachs versetzt und bei 37 °C inkubiert wurde, konnten nach 12 Wochen 0,2 µg/kg CAP nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass es sehr wahrscheinlich ist, dass auch im Bienenstock ein Übergang des Chloramphenicols aus dem Wachs in den Honig stattfindet. Somit könnte der Honig allein durch die Verwendung von Wachs, das CAP-Rückstände enthält, kontaminiert werden, ohne dass der Imker dieses Antibiotikum zur Behandlung der Bienen eingesetzt hat.

Damit lassen sich jedoch nur kleinere Chloramphenicol-Konzentrationen im Bereich von 0,1 – 0,5 µg/kg im Honig erklären. Bei größeren Konzentrationen ist die Anwendung von einem Arzneimittel, das CAP enthält, wahrscheinlich.

3.9. Statistische Auswertung der Routine-Untersuchungsergebnisse

Im Zeitraum vom Januar 2002 bis Juli 2004 wurden in den Laboren der APPLICA GmbH 11328 Proben routinemäßig auf Chloramphenicol untersucht. Bei den Proben handelt es sich nicht um speziell für die Forschungsarbeit ausgewählte Proben, sondern um reale Proben, die von Kunden aus aller Welt zur Untersuchung eingeschickt wurden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Datenmaterial die Lage auf dem Weltmarkt relativ gut widerspiegelt. Neben Bienenprodukten wie Honig, Gelée Royale, Pollen, Wachs und Propolis wurden auch Nahrungsergänzungsmittel, wie Gelée Royale-haltige Ampullen mit und ohne Ginseng-Zusatz, mit Honig gesüßte Säfte und Nicht-Bienenprodukte wie Milchpulver und Shrimps analysiert. Der Anteil an dieser Produkte nahm aber einen sehr kleinen Prozentsatz ein, weshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht näher darauf eingegangen wird.

3.9.1. Honig

Der größte Teil der CAP-Analysen wurde an Honigproben durchgeführt. Insgesamt wurden 10180 Honigproben auf Chloramphenicol untersucht, das entspricht 89,9 % aller CAP-Analysen. Die meisten CAP-Analysen für Honig wurden mittels ELISA-Screening durchgeführt. Der ELISA-Test liefert sehr verlässliche Ergebnisse für Negativ-Befunde. Eventuell aufgrund von Matrix-Störungen auftretende Falsch-Positiv-Befunde wurden durch eine Bestätigungsanalyse mittels LC-MS abgesichert.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Verteilung der CAP-Positiv-Befunde auf die einzelnen Länder erörtert. Eine Anwendung von Chloramphenicol in der Imkerei war bisher nur aus China bekannt. Eine Anwendung in anderen Ländern außerhalb der EU, aus denen der größte Anteil an Honig stammt, der sich bei uns auf dem Markt befindet, erschien sehr wahrscheinlich. Daher wurde eine länderbezogene statistische Auswertung der Positiv-Befunde vorgenommen.

Zu dieser Statistik ist anzumerken, dass für die Herkunftsangabe der einzelnen Bienenprodukte die Kundendeklaration übernommen wurde. Zur Überprüfung der Herkunft wurden einzelne Pollenanalysen durchgeführt. Allerdings war es nicht möglich, die Herkunft aller 240 mit CAP kontaminierten Honigproben, zu denen eine Herkunftsangabe vorlag, zu überprüfen, da die Pollenanalyse sehr aufwändig ist und viel Zeit in Anspruch nimmt. Daher wurde stellvertretend für einige Länder eine auf CAP positive Probe stichprobenartig mikroskopisch auf ihre Herkunft hin untersucht. Ein Positiv-Befund für eine Probe, deren Herkunft mittels Pollenanalyse eindeutig bestätigt wurde, lässt den Schluss zu, dass CAP in diesem Land für die Behandlung von Bienen eingesetzt wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um einen Einzelfall, eine Falsch-Deklaration oder eine Streckung mit chinesischem Honig handelt, ist bei einem signifikanten Anteil an Positiv-Befunden sehr gering.

Zu der Repräsentativität der Statistik ist weiterhin anzumerken, dass Mehrfachmessungen für Produkte desselben Loses als Einzelproben gewertet wurden. Außerdem ist zu beachten, dass vom Kunden, wenn ein Verdachtsmoment für Honig einer bestimmten Provenienz bestand, weitere Proben dieses Ursprunges zur Analyse eingesandt wurden. Das gleiche gilt auch für die Statistiken der anderen Bienenprodukte.

In den Tabellen 3-65 und 3-66 sind nur Honige aus Ländern aufgeführt, in denen ein Positiv-Befund für CAP aufgetreten ist.

Herkunft des Honigs (gemäß Kundenangabe)	Anzahl der unbelasteten Proben	Anzahl pos. CAP-Befunde (> 0,1 µg/kg)	CAP 0,1 – 0,2 [µg/kg]	CAP- 0,3 – 1,0 [µg/kg]	CAP- > 1,0 [µg/kg]	Höchster CAP-Befund [µg/kg]
<i>China</i>	62	102	4	26	72	274,8
<i>Vietnam</i>	113	37	18	13	6	5,0
<i>Moldawien</i>	27	40	13	10	17	10,6
<i>Rumänien</i>	308	21	8	4	9	6,6
<i>Bulgarien</i>	221	11	1	2	3	7,1
<i>Ukraine</i>	61	9	4	4	1	2,3
<i>Brasilien</i>	197	5	2	3	-	0,3
<i>Mexico</i>	304	4	4	-	-	0,2
<i>Peru</i>	5	2	-	-	2	83,3
<i>Indien</i>	26	2	-	2	-	0,5
<i>Russland</i>	2	1	-	-	1	16,9
<i>El Salvador</i>	15	1	-	1	-	0,8
<i>Spanien</i>	66	2	2	-	-	0,2
<i>Türkei</i>	117	1	-	1	-	0,4
<i>Argentinien</i>	293	1	1	-	-	0,2
<i>Tanzania</i>	21	1	1	-	-	0,1
<i>ohne Herkunftsangabe</i>	7091	1011				

Tab. 3-65. Verteilung der Positiv-Befunde für Chloramphenicol auf Honige unterschiedlicher geographischer Herkunft

Stand: Juli 2004

Herkunft des Honigs (gemäß Kundenangabe)	Gesamtzahl der auf CAP analysierten Proben	Anteil an Positiv-Befunden für CAP [%]
<i>China</i>	164	62,2
<i>Vietnam</i>	150	24,7
<i>Moldawien</i>	67	59,7
<i>Rumänien</i>	329	6,4
<i>Bulgarien</i>	232	4,7
<i>Ukraine</i>	70	12,9
<i>Brasilien</i>	202	2,5
<i>Mexico</i>	308	1,3
<i>Peru</i>	7	28,6
<i>Indien</i>	28	7,1
<i>Russland</i>	3	33,3
<i>El Salvador</i>	16	6,3
<i>Spanien</i>	68	2,9
<i>Türkei</i>	118	0,8
<i>Argentinien</i>	294	0,3
<i>Tanzania</i>	22	4,5
<i>ohne Herkunftsangabe</i>	8102	12,5

Tab. 3-66. Prozentualer Anteil an Positiv-Befunden für CAP bezogen auf die Gesamtzahl der auf CAP analysierten Honige unterschiedlicher geographischer Herkunft

Stand: Juli 2004

In der Abb. 3-91 ist die prozentuale Verteilung der CAP-Belastung von Honig dargestellt.

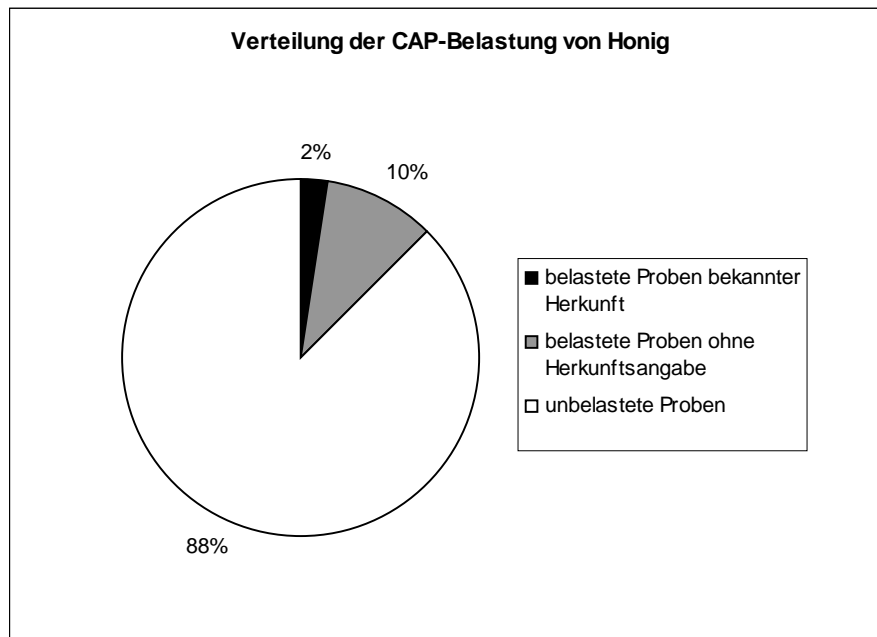


Abb. 3-91. Verteilung der CAP-Belastung von Honig

Angesichts des hohen Anteils an durchgeführten CAP-Analysen ist der Prozentsatz für Positiv-Befunde bekannter Herkunft gering, aber die Absolutmenge von 240 Honigproben bekannter Herkunft, die positiv auf CAP getestet wurden, lässt eine repräsentative Aussage über die CAP-Belastung in einigen Ländern zu.

In der Abb. 3-92 ist die prozentuale Verteilung der 2 % an belasteten Proben bekannter geographischer Herkunft der Abb. 3-91 auf die jeweiligen Länder dargestellt.

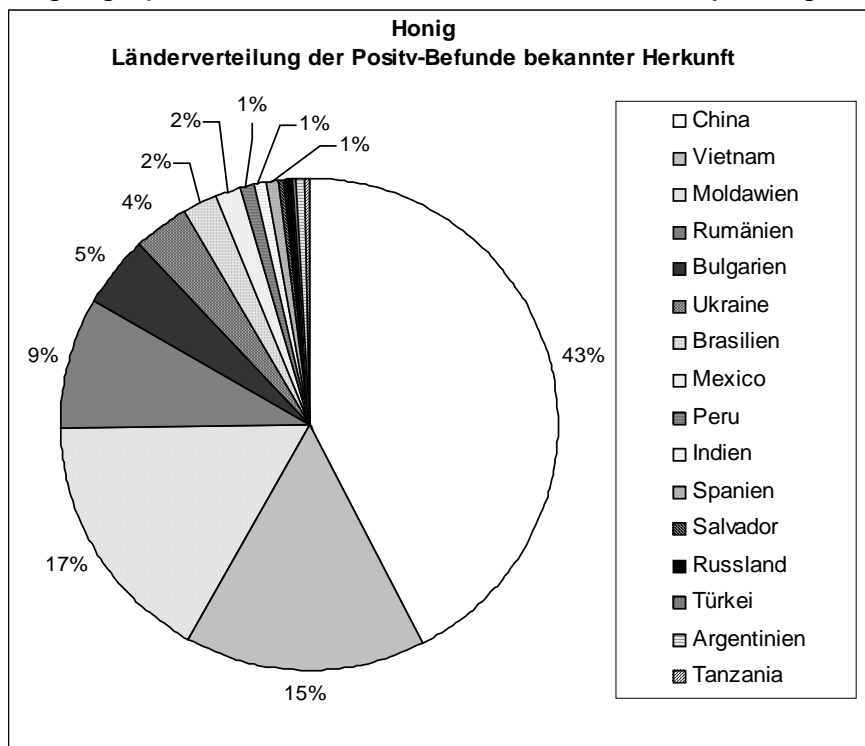


Abb. 3-92. Verteilung der CAP-Positiv-Befunde bekannter geographischer Herkunft nach Ländern (Honig)

Der statistischen Auswertung ist zu entnehmen, dass bezogen auf die Gesamtmenge an insgesamt positiv auf CAP getesteten Honigproben die meisten Honige erwartungsgemäß aus China stammen. Den zweitgrößten Anteil hat danach Vietnam, gefolgt von einigen Ländern Osteuropas und anschließend Süd- und Mittelamerikas.

Bezogen auf die Gesamtmenge an untersuchten Honigproben aus einem Land hat allerdings Moldavien prozentual gesehen nach China den zweitgrößten Anteil an Positiv-Befunden (vergl. Tab. 3-66). Prozentual haben auch Russland und Peru einen großen Anteil an kontaminierten Honigen, aber bei einer Gesamtanzahl von drei bzw. sieben Honigproben ist eine repräsentative Aussage kaum möglich.

Da mittels Pollenanalyse nachgewiesen werden konnte, dass die Honige aus den angegebenen Ländern stammen und ein Zusatz von chinesischem Honig nicht nachweisbar war, ist eine Anwendung chloramphenicolhaltiger Arzneimittel in diesen Ländern sehr wahrscheinlich. Jedoch ist zu beachten, dass es bei geringeren Konzentrationen möglich ist, dass CAP durch wiederverwendetes Wachs in den Honig gelangt ist.

3.9.2. Frisches Gelée Royale

Ein Bienenprodukt, das sehr häufig Chloramphenicolrückstände enthält, ist Gelée Royale. Die Gewinnung dieses Königinnenfuttersaftes ist sehr aufwändig, was sich auch im Preis für dieses Produkt widerspiegelt. Relativ günstig lässt es sich nur in Ländern des asiatischen Raumes, v.a. in China, produzieren. Dies erklärt den hohen Anteil an mit CAP belasteten Proben.

Frisches Gelée Royale						
Herkunft des Gelée Royales (gemäß Kundenangabe)	Anzahl der unbelasteten Proben	Anzahl pos. CAP-Befunde	CAP 0,1 – 0,2 [µg/kg]	CAP 0,3 – 1,0 [µg/kg]	CAP > 1,0 [µg/kg]	Höchster CAP-Befund [µg/kg]
China	40	14	4	2	8	10,6
Vietnam	8	2	-	1	1	1,1
Thailand	12	4	1	-	3	58,9
Indien	-	2	-	-	2	3,8
Amerika*	-	2	-	1	1	1,7
Malaysia	-	1	-	-	1	15,7
Kurdistan	-	1	-	-	1	3,8
Türkei	-	1	-	-	1	2,4
ohne Herkunftsangabe	259	335	83	65	187	224

Tab. 3-67. Verteilung der CAP Positiv-Befunde auf die Gesamtzahl der auf CAP analysierten Gelée Royales unterschiedlicher geographischer Herkunft

* Herkunft nicht weiter spezifiziert

Stand: Juli 2004

Herkunft des frischen Gelée Royales (gemäß Kundenangabe)	Gesamtzahl der auf CAP analysierten Proben	Anteil an Positiv-Befunden für CAP [%]
China	54	25,9
Vietnam	10	20,0
Thailand	16	25,0
Indien	2	100,0
Amerika*	2	100,0
Malaysia	1	100,0
Kurdistan	1	100,0
Türkei	1	100,0
ohne Herkunftsangabe	259	56,4

Tab. 3-68. Prozentualer Anteil an Positiv-Befunden für CAP bezogen auf die Gesamtzahl der auf CAP analysierten Gelée Royales unterschiedlicher geographischer Herkunft

* Herkunft nicht weiter spezifiziert

Stand: Juli 2004

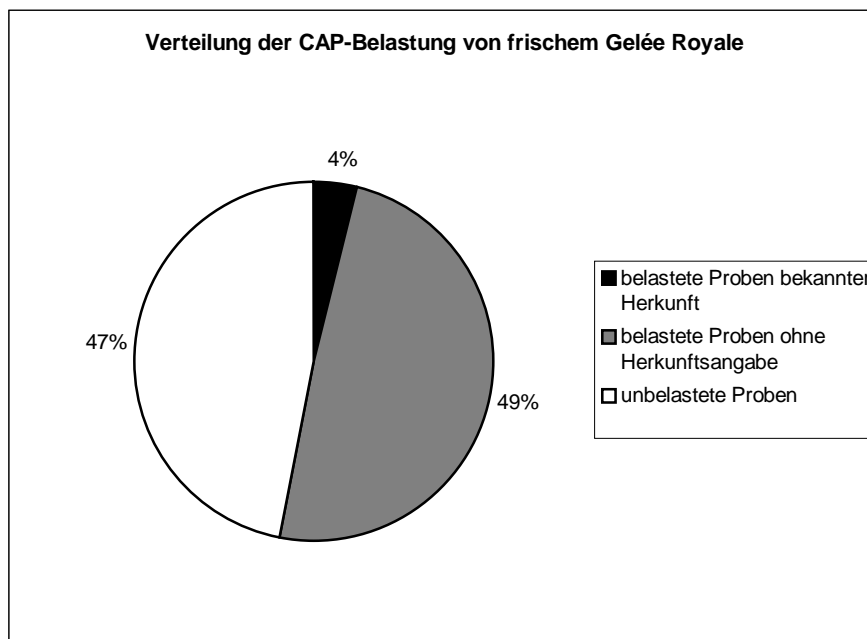


Abb. 3-93. Verteilung der CAP-Belastung von frischem Gelée Royale

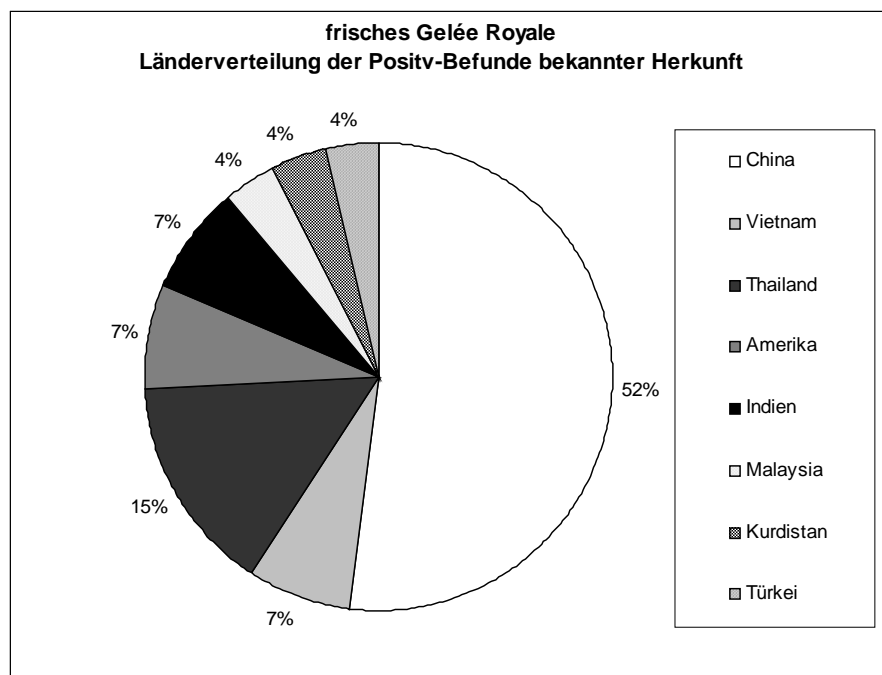


Abb. 3-94. Länderverteilung der Positiv-Befunde bekannter geographischer Herkunft für frisches Gelée Royale

Der Tabelle 3-67 ist zu entnehmen, dass die CAP-Konzentration meist sehr hoch ist. Über die Hälfte der Positiv-Befunde liegt höher als $1,0 \mu\text{g}/\text{kg}$. Zu begründen ist die starke CAP-Belastung von Gelée Royale dadurch, dass der größte Teil (90 % der Weltproduktion) aus China stammt (siehe hierzu auch 1.2.2).

Die in Abb. 3-94 dargestellte Länderverteilung der Positiv-Befunde bekannter Herkunft für frisches Gelée Royale zeigt, dass die meisten Proben aus China, Thailand und Vietnam stammen, somit aus Ländern des asiatischen Raumes. Nur ein kleiner Anteil kommt laut Kundenangabe aus anderen Ländern. Der Anteil CAP belasteter Proben bezogen auf die Gesamtzahl an Proben entspricht mit 20 % für Vietnam und 25 % für Thailand der des chinesischen Gelée Royales (25,9 %). Von den anderen Länder, aus denen auf CAP positiv getestete Proben stammen, liegen zu wenig Daten vor, um eine repräsentative Aussage treffen zu können.

3.9.3. Lyophilisiertes Gelée Royale

Lyophilisiertes Gelée Royale ist sowohl häufiger als auch in höheren Konzentrationen mit Chloramphenicol belastet als frisches Gelée Royale. Dies ist zu erwarten, da lyophilisiertes Gelée Royale aus frischem durch Wasserentzug (Gefriertrocknung) hergestellt wird. Dabei findet eine Aufkonzentrierung evtl. vorhandener Rückstände statt. Dies lyophilisierte Gelée Royale wird z. B. in Kapseln eingesetzt, ohne vorher rückhydratisiert zu werden. Frisches Gelée Royale enthält 60 - 70 % Wasser [8] [4]. Dieses wird bei der Gefriertrocknung zur Herstellung des lyophilisierten Gelée Royales entzogen (siehe 1.2.2). Wie folgendes Rechenbeispiel zeigt, liefert die Aufkonzentrierung beim Trocknen eine Erklärung für die erhöhte Anzahl an Positiv-Befunden für lyophilisiertes Gelée Royale:

Wird aus einem frischen Gelée Royale, das mit $0,04 \mu\text{g}/\text{kg}$ CAP, einer Konzentration, die unter der Nachweisgrenze liegt, belastet ist, ein lyophilisiertes Gelée Royale hergestellt, so würden in diesem unter Berücksichtigung eines Wassergehaltes von

60 – 70 % für ein frisches Gelée Royale 0,1 - 0,13 µg/kg CAP nachgewiesen werden können.

Lyophilisiertes Gelée Royale						
Herkunft des Gelée Royales (gemäß Kundenangabe)	Anzahl der unbelasteten Proben	Anzahl pos. CAP-Befunde	CAP 0,1 – 0,2 [µg/kg]	CAP- 0,3 – 1,0 [µg/kg]	CAP- > 1,0 [µg/kg]	Höchster CAP-Befund [µg/kg]
<i>China</i>	5	-	-	-	-	-
<i>allgemein</i>	24	172	14	51	107	745,1

Tab. 3-69. Verteilung der Positiv-Befunde für Chloramphenicol auf lyophilisiertes Gelée Royale unterschiedlicher geographischer Herkunft

Stand: Juli 2004

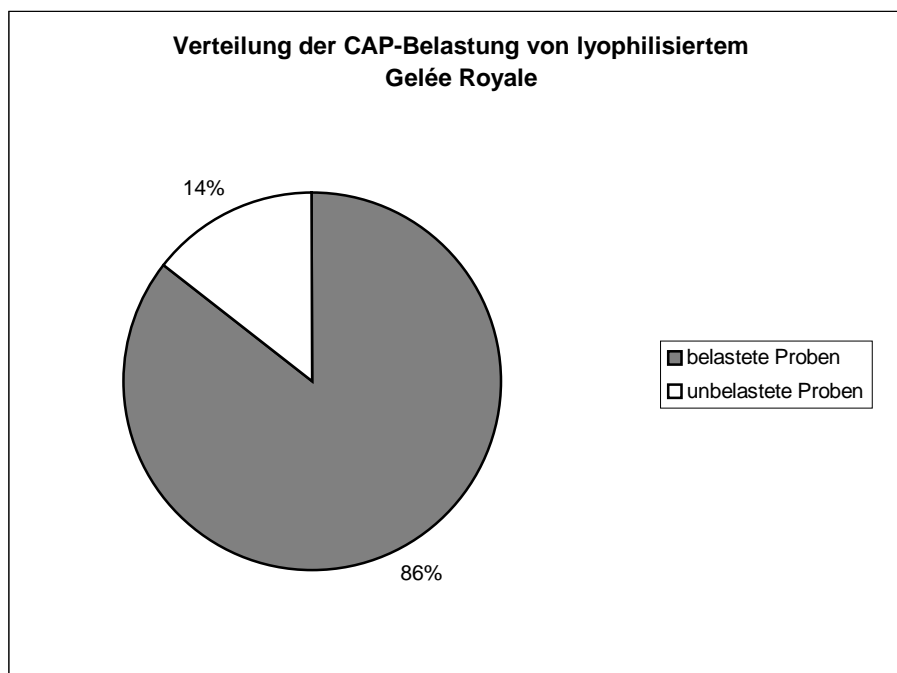


Abb. 3-95. Verteilung der CAP-Belastung von lyophilisiertem Gelée Royale

Die Abb. 3-95 zeigt, dass nur ein sehr kleiner Teil der lyophilisierten Gelée Royale Proben keine CAP-Belastung aufwies.

3.9.4. Pollen

Pollen gehören ebenso zu den potentiell mit CAP kontaminierten Bienenprodukten.

Pollen						
Herkunft der Pollen gemäß (Kundenangabe)	Anzahl der unbelasteten Proben	Anzahl pos. CAP-Befunde	CAP 0,1 – 0,2 [µg/kg]	CAP- 0,3 – 1,0 [µg/kg]	CAP- > 1,0 [µg/kg]	Höchster CAP-Befund [µg/kg]
<i>China</i>	2	1			1	2
<i>allgemein</i>	53	16	4	8	4	173,3

Tab. 3-70. Verteilung der Positiv-Befunde für Chloramphenicol auf Pollen unterschiedlicher geographischer Herkunft

Stand: Juli 2004

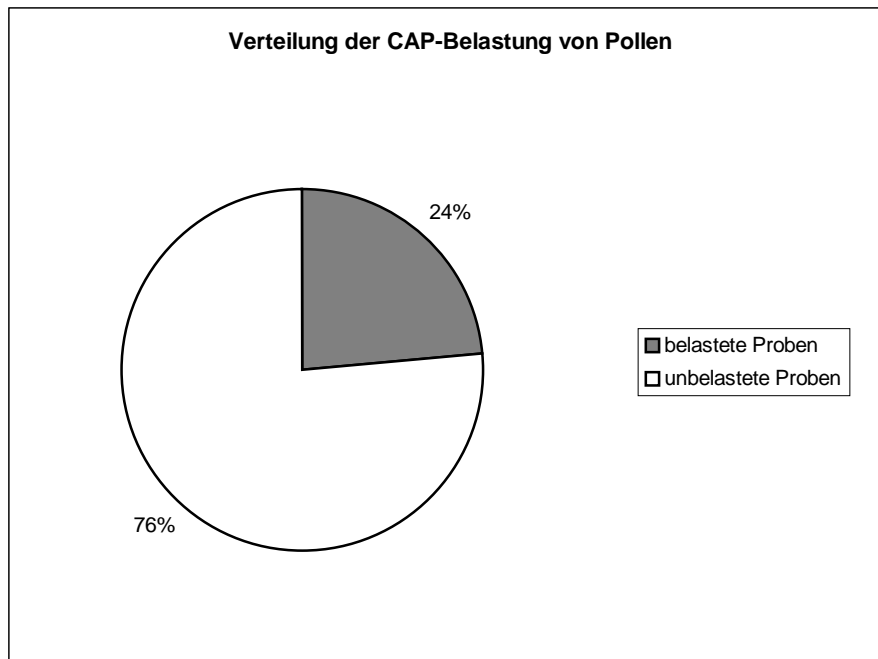


Abb. 3-96. Verteilung der CAP-Belastung von Pollen

Wie in Abb. 3-96 zu erkennen ist, war ca. $\frac{1}{4}$ der untersuchten Pollen-Proben mit CAP belastet.

3.9.5. Wachs

Auch im lipophilen Wachs konnte eine CAP-Belastung nachgewiesen werden. Durch einen Migrations-Versuch konnte gezeigt werden, dass bei Wiederverwendung eines kontaminierten Wachses ein Teil des Chloramphenicols in den mit dem Wachs in Kontakt tretenden Honig migriert (siehe 3.8).

Wachs						
Herkunft des Wachses (nach Kundenangabe)	Anzahl der unbelasteten Proben	Anzahl pos. CAP-Befunde	CAP 0,1 – 0,2 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	CAP- 0,3 – 1,0 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	CAP- > 1,0 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Höchster CAP-Beund [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
<i>allgemein</i>	7	5	-	-	5	1,8

Tab. 3-71. Verteilung der Positiv-Befunde für Chloramphenicol auf Wachs

Stand: Juli 2004

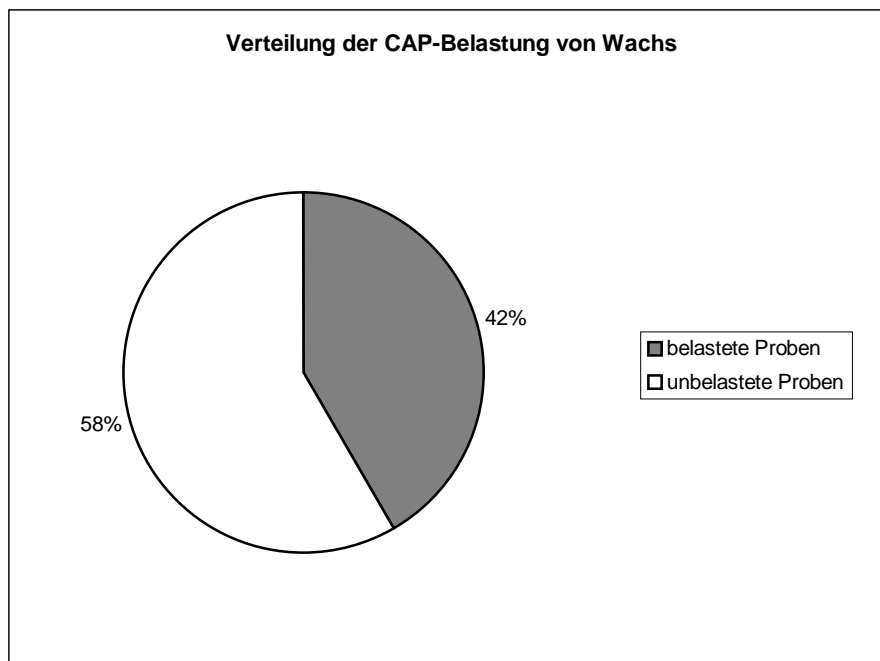


Abb. 3-97. Verteilung der CAP-Belastung von Wachs

Fast die Hälfte der untersuchten Wachsproben war, wie in Abb. 3-97 dargestellt, mit Chloramphenicol belastet.

3.9.6. Propolis

Auch im Kittharz der Bienen, dem Propolis (siehe 1.5), das ebenfalls sehr lipophil ist, konnte Chloramphenicol nachgewiesen werden.

Propolis						
Herkunft des Propolis (gemäß Kundenangabe)	Anzahl der unbelasteten Proben	Anzahl pos. CAP-Befunde	CAP 0,1 – 0,2 [µg/kg]	CAP- 0,3 – 1,0 [µg/kg]	CAP- > 1,0 [µg/kg]	Höchster CAP-Befund [µg/kg]
<i>allgemein</i>	5	5	1	2	2	7,4

Tab. 3-72. Verteilung der Positiv-Befunde für Chloramphenicol auf Propolis

Stand: Juli 2004

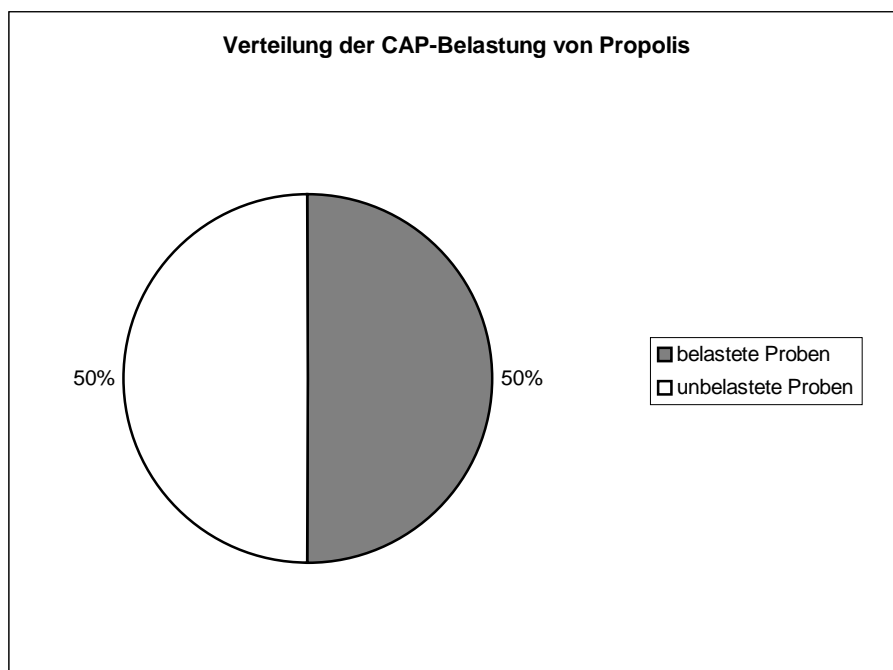


Abb. 3-98. Verteilung der CAP-Belastung von Propolis

50 % der untersuchten Proben weisen eine CAP-Kontamination auf.

Da in sämtlichen Bienenprodukten CAP in signifikanten Mengen nachgewiesen werden kann, ist anzunehmen, dass eine Anwendung von Chloramphenicol zu einer Kontamination im gesamten Bienenstock führt.

3.9.7. Zeitliche Entwicklung der CAP-Kontamination von Bienenprodukten

Um die zeitliche Entwicklung seit Beginn des „Chloramphenicol-Skandals“ im Jahre 2002 (vergl. 1.6.4) deutlich zu machen, wurde die Gesamtzahl der CAP-Positiv- und Negativ-Befunde für jeden Monat des betrachteten Zeitraumes ermittelt.

2002						
Monat	Anzahl der unbelasteten Proben	Anzahl der CAP- Positiv-Befunde	CAP 0,1 – 0,2 [µg/kg]	CAP- 0,3 – 1,0 [µg/kg]	CAP- > 1,0 [µg/kg]	Anteil an CAP-Positiv-Befunden [%]
<i>Januar</i>	9	7	-	2	5	43,8
<i>Februar</i>	132	109	1	25	83	45,2
<i>März</i>	293	144	-	50	94	33,0
<i>April</i>	236	92	-	35	57	28,0
<i>Mai</i>	167	92	-	17	75	35,5
<i>Juni</i>	100	40	-	12	28	28,6
<i>Juli</i>	136	41	14	11	16	23,2
<i>August</i>	75	28	2	10	16	27,2
<i>September</i>	145	36	13	12	11	19,9
<i>Oktober</i>	141	23	3	10	10	14,0
<i>November</i>	134	66	22	19	25	33,0
<i>Dezember</i>	92	35	6	11	18	27,6

Tab. 3-73. Verteilung der Gesamtzahl an Positiv-Befunden für Chloramphenicol im Jahr 2002

2003						
Monat	Anzahl der unbelasteten Proben	Anzahl der CAP- Positiv-Befunde	CAP 0,1 – 0,2 [µg/kg]	CAP- 0,3 – 1,0 [µg/kg]	CAP- > 1,0 [µg/kg]	Anteil an CAP- Positiv-Befunden [%]
<i>Januar</i>	197	34	10	9	15	14,7
<i>Februar</i>	173	57	21	17	19	24,8
<i>März</i>	285	77	25	25	27	21,3
<i>April</i>	289	47	14	25	8	14,0
<i>Mai</i>	294	78	38	19	21	20,9
<i>Juni</i>	375	49	16	28	5	11,6
<i>Juli</i>	430	67	23	21	23	13,5
<i>August</i>	344	52	20	13	19	13,1
<i>September</i>	487	60	17	18	25	10,9
<i>Oktober</i>	605	61	13	23	25	9,2
<i>November</i>	450	79	25	17	37	14,9
<i>Dezember</i>	429	55	11	18	26	11,4

Tab. 3-74. Verteilung der Gesamtzahl an Positiv-Befunden für Chloramphenicol im Jahr 2003

2004						
Monat	Anzahl der unbelasteten Proben	Anzahl der CAP- Positiv-Befunde	CAP 0,1 – 0,2 [µg/kg]	CAP- 0,3 – 1,0 [µg/kg]	CAP- > 1,0 [µg/kg]	Anteil an CAP- Positiv-Befunden [%]
<i>Januar</i>	477	53	18	18	17	10,0
<i>Februar</i>	507	68	20	18	30	11,8
<i>März</i>	626	123	13	31	79	13,4
<i>April</i>	414	82	15	44	23	16,5
<i>Mai</i>	497	42	14	10	18	7,8
<i>Juni</i>	502	29	8	8	13	5,5
<i>Juli</i>	422	39	5	8	26	8,5

Tab. 3-75. Verteilung der Gesamtzahl an Positiv-Befunden für Chloramphenicol im Jahr 2004

Für jeden Monat wurde der prozentuale Anteil an CAP-Positiv-Befunden berechnet und dieser in einer Grafik gegen eine Zeitskala aufgetragen.

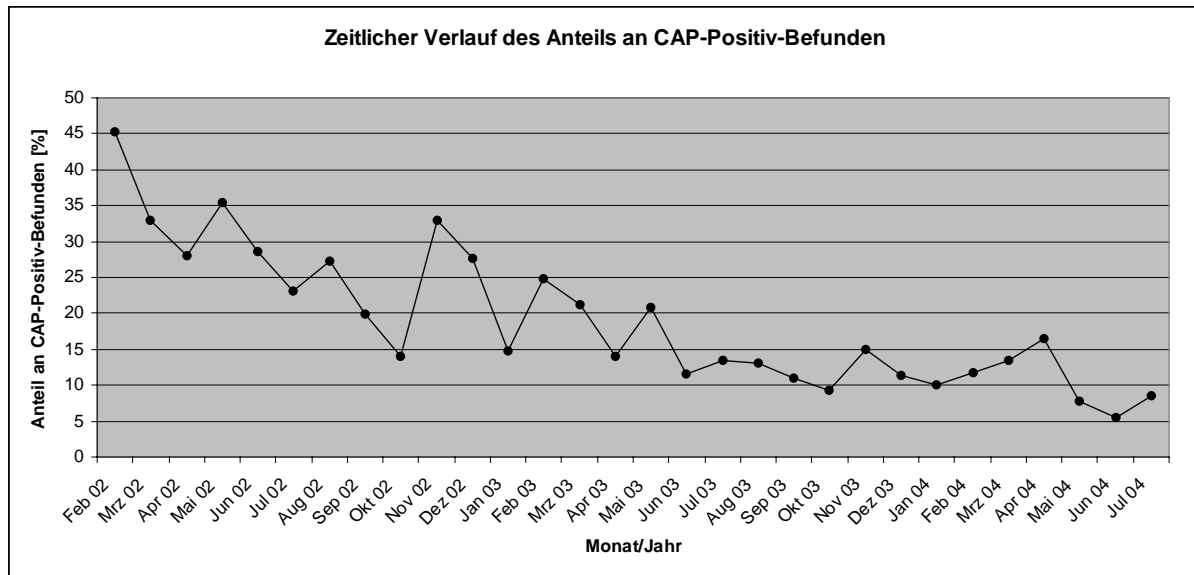


Abb. 3-99. Zeitliche Entwicklung der CAP-Kontamination von Bienenprodukten

Wie die Grafik in Abb. 3-99 zeigt, ist von Januar 2002 bis Juli 2004 eine tendenzielle Abnahme des prozentualen Anteils an CAP-Positiv-Befunden zu beobachten.

4. Zusammenfassung

Das Breitbandantibiotikum Chloramphenicol (CAP) wird sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch zur Behandlung lebensmittelproduzierender Tiere eingesetzt. Es ist aufgrund seiner toxischen Eigenschaften EU-weit und in vielen anderen Ländern wie z. B. in Kanada und in den USA für die Anwendung bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, verboten. Wiederholte CAP-Funde in Shrimps und Honig chinesischer Herkunft führten am 30. Januar 2002 zu einem Importverbot für Erzeugnisse tierischen Ursprungs aus China (Entscheidung 2002/69/EG). Da Chloramphenicol in Honig ein bis dahin nicht bekanntes Problem darstellte, existierte zu diesem Zeitpunkt noch keine validierte Methode für die Analyse von Honig, mit der Chloramphenicol mit der rechtlich geforderten Selektivität und Sensitivität bestimmt werden konnte. 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 oder niedriger aufweisen müssen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Methoden zur Bestimmung von Chloramphenicol in Honig und in weiteren Bienenprodukten wie Wachs, Gelée Royale, Pollen und Propolis mittels LC-MS entwickelt. Diese Methoden eignen sich für ein großes Probenaufkommen in einem Routinelabor und erreichen die geforderte Mindestleistungsgrenze. Für die Routineanalytik ist die Anzahl der für die Probenvorbereitung notwendigen Arbeitsschritte auf ein Minimum zu reduzieren, da jeder zusätzliche Arbeitsschritt einen weiteren Beitrag zur Messunsicherheit liefert und Personal in Anspruch nimmt. Eine Analyse muss schnell und kostengünstig sein und soll trotzdem maximale Sicherheit im Hinblick auf Identifizierung und Quantifizierung des Analyten erreichen. Diesen Vorteil bieten die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden.

Für die erste Methode wird als Detektor ein Single Quadrupole-Massenspektrometer verwendet. Der HPLC-Trennung ist eine online-Festphasenextraktion unter Verwendung der Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP2000 vorgeschaltet. Diese erstmalig durchgeführte direkte Bestimmung von Chloramphenicol mittels online-SPE-LC-MS führt durch die vorgenommene Miniaturisierung und Automatisierung der einzelnen Probenvorbereitungsschritte, im Gegensatz zu der offline Variante mit manueller Festphasenextraktion, neben einem geringen Lösungsmittelverbrauch vor allem zu einem minimalen Bedarf an Proben- und Festphasenmaterial, einer signifikanten Zeitersparnis und einem zu vernachlässigen Personalaufwand. Zusätzlich wird durch die Automatisierung eine gesteigerte Reproduzierbarkeit des Verfahrens erreicht.

Die zweite Methode arbeitet mit einem Triple Quadrupole-Massenspektrometer als Detektor, das eine Detektion mittels Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht. Bei der Detektion mittels Tandem-Massenspektrometrie werden die Produkt-Ionen der isolierten Quasimoleküle gemessen. Dadurch wird gegenüber der erstgenannten Methode eine erhöhte Selektivität und Sensitivität erzielt, Matrix-Störungen werden reduziert und die resultierenden Chromatogramme enthalten weniger Untergrundrauschen und Störpeaks. Daher kann trotz einer einfachen Aufarbeitung auf eine Festphasenextraktion verzichtet und gleichzeitig die Analysenzeit der HPLC-Trennung verkürzt werden.

Während bei der Detektion mittels MS zur Absicherung der Identität des Chloramphenicols nur die Retentionszeit und die aufgrund der Chlorisotopie

korrespondierenden Massenspuren m/z 321 und 323 zur Verfügung stehen, dient bei der LC-MS/MS das Spektrum der Tochterionen der Quasimolekülonen als zusätzliches Identitätskriterium.

Die Analyse von Chloramphenicol mittels LC-MS/MS kann somit als eine Methode mit einem hohen Sicherheitsfaktor für die Identität des Analyten in Kombination mit einer schnellen und einfachen Aufarbeitung charakterisiert werden.

Die Kopplung der online-SPE mit der chromatographischen Trennung und massenspektrometrischer Detektion führt durch das größere Injektionsvolumen und die Aufkonzentrierung des Analyten auf der Festphasen-Kartusche zusätzlich zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit. 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. Die Analyse ist schnell und kostengünstig aufgrund einer einfachen, effizienten, material- und lösungsmittelsparenden, automatisierten Aufreinigungstechnik. Aufgrund ihrer Sensitivität und Selektivität bietet die Kombination aus online-SPE mit der LC-MS/MS maximale Sicherheit im Hinblick auf die Identifizierung und Quantifizierung des Analyten.

Daher wurde für die dritte Methode eine weitere Vereinfachung der Aufarbeitung angestrebt. Bei der Analyse mittels online-SPE-LC-MS/MS wird die Probe ohne Extraktionsschritt nur noch gelöst, die weitere Aufreinigung erfolgt automatisch durch die online-Festphasenextraktion. Diese Methode kann aufgrund von Wiederfindungen teilweise $< 50\%$ nur semi-quantitativ verwendet werden. Da der MRPL-Wert von $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ als Bestimmungsgrenze jedoch erreicht wird, kann die Methode im Sinne einer Screeningmethode auf CAP-Belastungen $\geq 0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ genutzt werden. So sind sehr schnelle Aussagen über CAP-Kontaminationen möglich, da Aufarbeitung und Analyse zusammen nicht mehr als eine Stunde in Anspruch nehmen. Nur Positiv-Befunde müssen zur genaueren Quantifizierung mit der aufwändigeren Probenaufarbeitung erneut analysiert werden.

Alle Methoden wurden umfassend validiert und erreichen die nach der Entscheidung 2003/181/EG geforderte Mindestleistungsgrenze von $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ als Bestimmungsgrenze. Die LC-MS/MS-Methode wurde zusätzlich durch die Teilnahme an einem internationalen Ringversuch abgesichert.

Je nach Ausstattung des Labors mit einer LC-MS oder LC-MS/MS, eventuell unter zusätzlicher Nutzung einer Möglichkeit zur online-SPE, kann die jeweils entsprechende Methode verwendet werden. Sollte eine online-SPE nicht zur Verfügung stehen, lässt sich dieser Methoden-Teil mit ein paar Modifikationen leicht auf eine manuelle Durchführung übertragen. Jedoch bietet die vollautomatische online-Festphasenextraktion mittels der Probenvorbereitungseinheit APPLICA SP2000 die Möglichkeit einer empfindlichen und selektiven Analyse mit einer hochgradig automatisierten Probenaufarbeitung.

Die Methoden für die Bestimmung von CAP können neben Honig auch auf andere Bienenprodukte angewendet werden. Diese Bienenprodukte wie Gelée Royale, Pollen, Wachs und Propolis stellen sehr komplexe Naturstoffe dar, die sich sowohl untereinander als auch vom Honig chemisch stark unterscheiden. Trotz dieser Schwierigkeiten konnte im Rahmen dieser Arbeit eine vereinfachte Aufarbeitung für die genannten Matrices entwickelt werden. Zusätzlich konnten die Arbeitsschritte für die verschiedenen Bienenprodukte je nach verwendeter Methode unterschiedlich stark vereinheitlicht werden und somit die Handhabung in der Routineanalytik entscheidend vereinfacht werden.

Da für die Analyse von Chloramphenicol in der Routineanalytik der ELISA-Test als Screeningmethode eingesetzt wird und nur Positiv-Ergebnisse mittels LC-MS bestätigt werden, wurde zusätzlich ein Vergleich der mittels ELISA und LC-MS

ermittelten Werte aufgestellt. Für die Matrix Honig zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen den Ergebnissen des ELISA-Tests und denen der LC-MS, während bei der Analyse von Gelée Royale die mittels ELISA erhaltenen Ergebnisse stark von denen der LC-MS abwichen. Daher ist der verwendete ELISA-Test nicht für die Analyse von Gelée Royale geeignet.

Anhand einer anschließend durchgeführten 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 in Ländern des asiatischen Raumes sowie Mittel- und Südamerikas nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der deklarierten Herkunft wurde die geographische Herkunft einzelner Honige mikroskopisch bestimmt. Mittels Pollenanalyse konnte in keiner der untersuchten Proben ein China-Anteil nachgewiesen werden, während sich die angegebene geographische Zuordnung aufgrund des Pollenbildes eindeutig bestätigen ließ. Somit stammten gemäß der Pollenanalyse alle untersuchten Honige aus den angegebenen Ländern. Eine Anwendung chloramphenicolhaltiger Arzneimittel in diesen Ländern ist daher 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.

Summary

Chloramphenicol is a broad spectrum antibiotic which can be used both therapeutically and preventively for the treatment of food-producing animals. Because of its toxicity it is banned for the use in food-producing animals in the European Union as well as in many other countries like the USA or Canada.

Recurrent CAP-findings in shrimps and honey from China lead to an import-prohibition into the EU for products of animal origin on January 30th 2002 (decision 2002/994/EC). As the appearance of chloramphenicol had not been known as a problem hitherto, at this point no validated method for the analysis of Chloramphenicol in honey was available, which could reach the legally required selectivity and sensitivity. In the decision 2003/181/EC concerning the analysis method for the determination of Chloramphenicol a minimum required performance limit (MRPL) of 0.3 µg/kg is set. Therefore, methods for the CAP-analysis in honey have to reach a limit of quantification of 0.3 µg/kg or lower.

In the work presented here three different methods for the analysis of chloramphenicol in honey and other beeproducts like beeswax, royal jelly, pollen and propolis by LC-MS were developed. These methods are suitable for the routine analyses of large quantities of samples in a laboratory and reach the required MRPL. For the routine analytics the amount of necessary steps for the sample preparation should be reduced to the minimum, as every further step delivers a further contribution to the uncertainty of the measurement and requires employees. An analysis must be fast and cost-effective. Nevertheless it has to reach maximum certainty with regard to the identification and quantification of the analyte. This advantage is provided by the developed methods.

For the first method a single quadrupole mass spectrometer is used as detector. An online-solid-phase-extraction by the sample preparation unit APPLICA SP2000 is upstreamed the LC-separation. With this for the very first time used direct determination of chloramphenicol by online-SPE-LC-MS one reaches a miniaturisation of the method. Therefore compared with the offline type of the manuell SPE not only the solvent consumption is lower but especially many samples are prepared simultaneously and fewer sample- and SPE-material is used. The automatisaton, which is reached by the online-SPE leads to a better reproducibility and to a reduction of the personnel expenditure.

The second method works with a triple quadrupole mass spectrometer as detector. Therefore, the detection is carried out by tandem mass spectrometry. With the detection by tandem mass spectrometry the product-ions of the isolated quasimoleculions are measured. Thereby a higher selectivity and sensitivity is achieved, matrix disturbances are reduced and this results in chromatograms with a better signal-to-noise-ratio. Therefore, in spite of a simple sample clean-up the analysis can be done without solid phase extraction. Simultaneously the analysing time of the LC-separation can be reduced.

The LC-MS method uses the retention time and the corresponding masses m/z 321 und 323 due to the chlorine isotopy for the assurance of the identity of CAP. By using the LC-MS/MS method one also gets product-ions in a special ratio to characterize the analyte. This special pattern can be seen in the spectrum.

These aspects characterize the LC-MS/MS method with a high security level for the identity in combination with a very simple and fast clean-up.

By connecting the online-SPE with this method the sensitivity increases because of the larger injection-volume and the concentration of the analyte on the cartridge.

The online-SPE-LC-MS/MS is a method, which meets the demands of modern analytics. The analysis is fast and cost-effective because of an easy, efficient, material and solvent-saving, automatic clean-up. Because of the sensitivity and selectivity the combination of online-SPE with LC-MS/MS gives maximum certainty with regard to the identification and quantification of the analyte.

Therefore, with regard to a third method a further simplification of the sample preparation was aspired. The analysis by online SPE-LC-MS/MS is done by only solving the sample, an extraction is not necessary. The further clean-up is carried out automatically by the online-SPE. Nevertheless this method can only be used half-quantitative, because the recoveries are partly lower than 50 %. As the MRPL of 0.3 µg/kg as limit of quantification is reached, the method can be used as a kind of screening-method for CAP-contaminations of 0.3 µg/kg or higher. This way almost immediate statements about the CAP-contaminations are possible, because sample preparation and analysis do not take longer than one hour. Only positive findings have to be confirmed by the more effort-taking sample preparation.

All methods were validated extensively and achieve the MRPL of 0.3 µg/kg, set in the decision 2003/181/EC. Furthermore the LC-MS/MS-method was secured by a participation in an international ring-trial. Depending on the equipment of the laboratory including LC-MS or LC-MS/MS possibly with additional use of online-SPE the best suitable method can be applied. If an online-SPE is not available this part of the method can be done manually by making a few minor modifications. Nevertheless the online-solid-phase-extraction with the sample preparation unit APPLICA SP2000 offers the possibility of a sensitive and selective analysis with the sample preparation being highly automated.

The methods for the analysis of CAP can also be used for other beeproducts besides honey. These beeproducts like royal jelly, pollen, wax and propolis are very complex matrices and with regard to chemics vary greatly from one another and from honey. Nevertheless within the scope of this elaboration a simple clean-up for these matrices could be developed. In addition the work-steps for the beeproducts could be standardized to a certain degree depending on the method being used, which makes the handling in the routine analytics much more easier.

For the analysis of chloramphenicol the ELISA-test is used as a screening method in the routine analytics and only positive findings are confirmed by LC-MS. The values measured by ELISA and by LC-MS were compared. For the matrix honey a very good correlation between ELISA and LC-MS results could be observed, whereas for the analysis of royal jelly the ELISA results differed significantly from the LC-MS results. Therefore the ELISA-test is not suitable for royal jelly.

A subsequent statistical evaluation of CAP positive findings with regard to the geographical origin of the honeys and beeproducts showed for the very first time, that the "chloramphenicol-problem" is not just limited to China. CAP residues could also be determined in products from Eastern European countries, Asian countries and from countries of Central and South America. In order to verify the on the samples indicated origin, some samples were evaluated microscopically. The pollen analysis showed clearly that the analysed samples were not honeys from China or mixed with such. All analysed honeys originated in the declared countries. Therefore, a use of chloramphenicol containing drugs in these countries is very likely.

Consequently for the very first time the elaboration presented here gives a comprehensive overview regarding the problems of residue analytics using as an example the broad spectrum antibiotic CAP in beeproducts. The methods available for these analytics are reflected on critically and the demands on modern methods

used to determine chloramphenicol are clearly defined. Considering national and international food-law different methods were developed, discussed regarding their pros and cons and finally secured by participating in an official international ring trial. Following extensive surveys of honeys and beeproducts from around the world, a statistical evaluation of the collected data was carried out. Finally the correlation between CAP-contamination of the individual beeproducts and their geographical origin was shown.

5. Ausblick

Es ist bekannt, dass bei der Verabreichung von Chloramphenicol an Tiere wie z.B. Schweine, Rinder oder Fische in der Leber Glucuronid-Konjugate des Chloramphenicols gebildet werden. Beim Schwein liegt in der Leber, der Niere und im Plasma mehr als die Hälfte des Chloramphenicols in konjugierter Form vor, während in den Muskeln kein konjugiertes CAP nachweisbar ist. Bis zu sechs Metabolite konnten nach einer oralen Gabe von CAP an Kälber in deren Haut und Plasma beobachtet werden. Metabolite des Chloramphenicols sind z.B. Nitroaminopropandiol, Nitrosoaminopropandiol, Deacetylchloramphenicol und Dehydrochloramphenicol [41-42] [58] [88]. Es wäre daher von Interesse, ob diese oder ähnliche Konjugate auch durch eine Metabolisierung des Chloramphenicols durch die Biene entstehen. Mittels der in dieser Arbeit entwickelten Methoden werden diese Metabolite nicht erfasst, da bei der Detektion nur die Massen des reinen Chloramphenicols herausgefiltert werden. Daher wäre es möglich, dass bei einer eventuellen Bildung von Konjugaten zu niedrige Konzentrationen für CAP gemessen werden oder bei der vollständigen Umwandlung kein Rückstand mehr nachweisbar ist, obwohl ein unerlaubter Einsatz des Antibiotikums erfolgt ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wäre eine weitergehende Untersuchung der Bienenprodukte auf CAP-Konjugate wünschenswert.

Neben Chloramphenicol werden auch zwei weitere chemisch sehr ähnliche Antibiotika in der Veterinärmedizin angewandt: Thiamphenicol und Florphenicol [34]. Da häufig Kombipräparate verwendet werden, wäre es möglich, dass bei einem CAP-Positiv-Befund in einer Probe auch Rückstände von Thiamphenicol und Florphenicol enthalten sind. Darüberhinaus ist es denkbar, dass die Imker für die Behandlung ihrer Bienen auf die anderen beiden Präparate ausweichen, da bekannt ist, dass auf CAP untersucht wird. Außerdem sind Thiamphenicol und Florphenicol nicht im Anhang IV der EU-Verordnung 2377/90 (Tierarzneimittelrückständeverordnung) aufgeführt. Somit besteht für sie im Gegensatz zum CAP kein absolutes Anwendungsverbot für lebensmittelliefernde Tiere. Die Anwendung bei Bienen ist jedoch auch für diese Antibiotika nicht erlaubt.

Es wäre daher sinnvoll, die vorgestellten Methoden um diese beiden Substanzen zu ergänzen. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit der drei Antibiotika könnte dies sehr wahrscheinlich bereits mit leichten Abwandlungen der Analysenparameter geschehen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Honigverordnung (HonigV) vom 16. Januar 2004, Bundesgesetzblatt Jahrgang 2004 Teil I Nr. 4, ausgegeben zu Bonn am 28. Januar 2004
- [2] Helmut Horn, Cord Lüllmann, Das große Honigbuch, Entstehung, Gewinnung, Gesundheit und Vermarktung, 2. Auflage, 2002, Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co., Stuttgart
- [3] H.-D. Belitz, W. Grosch, Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 4. überarbeitete Auflage, korrigierter Nachdruck, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest
- [4] Schweizerisches Lebensmittelbuch 2004, Bundesamt für Gesundheit, Facheinheit Lebensmittelsicherheit, Bern
- [5] Dr. Josef Lipp, Der Honig, Handbuch der Bienenkunde, 3. völlig neubearbeitete Auflage, 1994 Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart
- [6] Dr. Werner von der Ohe, Reife, Naturbelassenheit und Unverfälschtheit von Honig, Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, Celle 1999
- [7] Friedrich Pohl, Jutta Gerecke, Gelée royale aus der Sicht des Amtstierarztes, Der Lebensmittelbrief 3/4 2004, S. 72 - 73
- [8] Dr. Werner von der Ohe, Steckbrief Gelée royale, Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, Celle 2002
- [9] Stefan Bogdanov, Gelée Royale, Schweizerisches Zentrum für Bienenforschung, Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld, CH-3003 Bern
- [10] Dr. Werner von der Ohe, Steckbrief Pollen, Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, Celle 2002
- [11] Anna Maurizio, Ina Grafl, Das Trachtpflanzenbuch, Nektar und Pollen – die wichtigsten Nahrungsquellen der Honigbienen, 3. Auflage, Ehrenwirth Verlag München, 1965
- [12] Bernd Dany, Rund um den Blütenpollen, Ehrenwirth Verlag, München 1989
- [13] Bernd Dany, Pollen-sammeln heute, Anleitung zum wirtschaftlichen Pollensammeln, 3. neubearbeitet und erweiterte Auflage, Ehrenwirth Verlag München
- [14] Geert Staemmler, Wachsgewinnung und –verarbeitung, Die neue Bienenzucht, Norddeutsche Imkerzeitung, Heft 10, Jahrgang 29, 2002
- [15] R.G. Stanley, H.F. Linskens, Pollen, Biology Biochemistry Management, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1974

- [16] B. Talpay, Der Pollen, Versuch einer Standortbestimmung, Institut für Honiganalysen, Bremen, 1984
- [17] Dr. Werner von der Ohe, Steckbrief Wachs, Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, Celle 2002
- [18] Vinzenz Weber, Das Wachsbuch, Erzeugung und Behandlung des Waxes, Geräte, Verarbeitung, Fertigwachs, Das Kittharz, Ehrenwirth Verlag, München, 1975
- [19] A. P. Tulloch, Beeswax-Composition and Analysis, bee world, Vol. 61, No. 2 page 47 - 62, 1980
- [20] Stefan Bogdanov, Propolis, Schweizerisches Zentrum für Bienenforschung, Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld, CH-3003 Bern, 1999
- [21] Dr. Werner von der Ohe, Steckbrief Propolis, Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, Celle 2002
- [22] R.Krell, Value-added products from beekeeping, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1996
- [23] Prof. Dr. Wolfgang Forth, Prof. Dr. Dietrich Henschler, Prof. Dr. Walter Rummel, Prof. Dr. Klaus Starke (Herausgeber), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker; 6., völlig Neubearb. Aufl., Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, BI-Wissenschaftsverlag, 1992
- [24] Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand (Herausgeber), Prof. Dr. Peter Schreier, bearb. von zahlreichen Fachkollegen, Zentralredaktion: Dr. Barbara Frunder, Dr. Elisabeth Hillen, Ute Rohlf; RÖMPP LEXIKON LEBENSMITTELCHEMIE, Stuttgart, New York, Thieme, 1995
- [25] Dr. Wolfgang Ritter, Bienenkrankheiten, Deutscher Imkerbund e.V., Viliper Hauptstraße 3, 53343 Wachtburg
- [26] Stefan Bogdanov, Anton Imdorf, Jean-Daniel Charrière, Peter Fluri und Verena Kilchenmann, Qualität der Bienenprodukte und die Verschmutzungsquellen, Schweizerisches Zentrum für Bienenforschung, Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld, CH-3003 Bern, 1999
- [27] Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs (ABl. Nr. L 224 S. 1), zuletzt geändert durch Art. 1 ÄndVO (EG) 2011/2003 v. 14.11.2003 (ABl. Nr. L 297 S.15)

- [28] Dr. Hauke Hey, Rechtssicherheit und Vertrauensschutz im Widerstreit, zur Analytik bei verbotenen pharmakologisch wirksamen Stoffen, Zeitschrift für das gesamte Lebensmittelrecht 5/2003, S. 658 - 665
- [29] Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2002) 3044
- [30] Entscheidung 2003/181/EG der Kommission vom 13. März 2003 zur Änderung der Entscheidung 2002/657/EG hinsichtlich der Festlegung von Mindestleistungsgrenzen (MRPL) für bestimmte Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, ABl. vom 15. März 2003, Nr. L 71 S. 17
- [31] Entscheidung 2005/34/EG der Kommission vom 11. Januar 2005 zur Festlegung einheitlicher Normen für die Untersuchung von aus Drittländern eingeführten Erzeugnissen tierischen Ursprungs auf bestimmte Rückstände ABl. vom 20. Januar 2005, Nr. L 16 S. 61
- [32] Suchverfahren auf das Vorhandensein von Chloramphenicol-Rückständen in Milch, Screeningverfahren mit ELISA im Mikrotitersystem, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Verfahren zur Probennahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen, Herausgeber und Redaktion: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Band I/1c, Lebensmittel (L), Teil 1c, 01.00-68
- [33] Bestimmung von Chloramphenicol in Milch, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Verfahren zur Probennahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen, Herausgeber und Redaktion: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Band I/1c, Lebensmittel (L), Teil 1c, 01.00-55,
- [34] Nikolaos A. Botsoglou, Dimitrios J. Fletouris, Drug Residues in Foods, Pharmacology, Food Safety, and Analysis, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 2001
- [35] Wolf D. Lehmann, Massenspektrometrie in der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996
- [36] Manfred Hesse, Herbert Meier, Bernd Zeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 5., überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1995
- [37] Finnigan TSQ Quantum Discovery Hardware Manual, published by Technical Publications, Thermo Electron Corporation, San Jose, California, Copyright© 2003 Thermo Electron Corporation

- [38] Ross Willoughby, Ed Sheehan, Sam Mitrovich, *A Global View of LC/MS: How to Solve Your Most Challenging Analytical Problems*, Second Edition, Global View Pub, 2002
- [39] LCQ Advantage, Hardware Manual, Revision A, published by Technical Publications, Thermo Finnigan, LC and LC/MS Division, San Jose, California, Copyright© 2001 Thermo Finnigan, a Thermo Electron Corporation
- [40] Hans-Joachim Hübschmann, *Handbuch der GC/MS, Grundlagen und Anwendung*, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1996
- [41] J.P. Abjean, Planar chromatography for the multiclass, multiresidue screening of chloramphenicol, nitrofurans, and sulfonamide residues in pork and beef, *Journal of AOAC International*, Volume 80, 1997, Pages 737-740
- [42] J.P. Abjean, Screening of chloramphenicol residues in pork muscle by planar chromatography, *Journal of AOAC International*, Volume 77, 1994, Pages: 1101-1104
- [43] C.D.C. Salisbury, C.E. Rigby, and W. Chan, Determination of antibiotic residues in Canadian slaughter animals by thin-layer chromatography-bioautography, *J. Agric. Food Chem.*, Volume 37, 1989, Pages: 105-108
- [44] G. Scortichini, L. Annunziata, M.N. Haouet, F. Benedetti, I. Krusteva, R. Galarini, ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria, *Analytica Chimica Acta*, Volume 535, 2005, Pages: 43-48
- [45] Robert K. Munns, David C. Holland, José E. Roybal, Joseph M. Storey, and Austin R. Long, Gas Chromatographic Determination of Chloramphenicol Residues in Shrimp: Interlaboratory Study, *Journal of AOAC International*, Volume 77, 1994, Pages: 596-601
- [46] R.L. Eppstein, C. Henry, K.P. Holland, and J. Dreas, International validation study for the determination of chloramphenicol in bovine muscle, *Journal of AOAC International*, Volume 77, No. 3, 1994, Pages: 570-576
- [47] J.M. Wal, J.C. Peleran, and G. Bories, Electron-capture detection of chloramphenicol using a heptafluorobutyrate derivative. Application to residues in milk, *Journal of Chromatography*, Volume 168, 1979, Pages: 179-185
- [48] R. Malisch, Multimethod for the determination of residues of chemotherapeutic drugs, antiparasitic agents and growth promoters in foodstuffs of animal origin. 1. General procedure and determination of sulfonamides, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, Volume 182, 1986, Pages: 385-399

- [49] Th. Gude, A. Preiss, and K. Rubach, Determination of chloramphenicol in muscle, liver, kidney and urine of pigs by means of immunoaffinity chromatography and gas chromatography with electron-capture detection, *Journal of Chromatography B Biomed Applications*, Volume 673, 1995, Pages: 197-204
- [50] S. Fabiansson, T. Nilsson, and J. Backstrom, Tissue concentrations of chloramphenicol after intramuscular injection in pigs, *Journal of Science Food and Agriculture*, Volume 27, 1976, Pages: 1156-1162
- [51] A.P. Pfenning, J.E. Roybal, H.S. Rupp, S.B. Turnipseed, S.A. Gonzales, J.A. Hurlbut, Simultaneous Determination of Residues of Chloramphenicol, Florfenicol, Florfenicol Amine, and Thiamphenicol in Shrimp Tissue by Gas Chromatography with Electron Capture Detection, *Journal of AOAC International* Volume 83, 2000, Pages: 26-30
- [52] H.Y. Shen, H.L. Jiang, Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods, *Analytica Chimica Acta* Volume 535, 2005, Pages: 33-41
- [53] L.A. van Ginkel, H.J. van Rossum, P.W. Zoontjes, H. van Blitterswijk, G. Ellen, E. van der Heeft, A.P.J.M. de Jong, G. Zomer, Development and validation of a GC-MS procedure for the identification and quantification of residues of chloramphenicol, *Analytica Chimica Acta*, Volume 237, 1990, Pages: 61-69
- [54] P.J. Kijak, Confirmation of Chloramphenicol Residues in Bovine Milk using Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Journal of AOAC International*, Volume 77, 1994, Pages: 34-40
- [55] M.X. Xie, Y. Liu, Y.M. Qiu, J. Han, Y.Z. Liu, Determination of chloramphenicol residue in animal tissues by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, Volume 33, 2005, Pages: 1-4
- [56] S. Impens, W. Reybroeck, J. Vercammen, D. Courtheyn, S. Ooghe, K. DeWash, W. Smedts, H. DeBrabander, Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS2 and LC-MS2, *Analytica Chimica Acta* Volume 483, 2003, Pages: 153-163
- [57] A.R. Long, L.C. Hsieh, A.C. Bello, M.S. Malbrough, C. R. Short, S.A. Barker, Method for the isolation and liquid-chromatographic determination of chloramphenicol in milk, *Journal of Agriculture and Food-Chemistry*; Volume 38, 1990, Pages: 427-429

- [58] H.J. Keukens, W.M.J. Beek, and M.M.L. Aerts, High-performance liquid chromatographic screening and confirmation methods for chloramphenicol residues in meat with off-line cartridge sample clean-up and on-line diode array UV-VIS detection, *Journal of Chromatography*, Volume 352, 1986, Pages: 445-453
- [59] G.S. Bories, J.C. Peleran, J.M. Wal, Liquid chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of chloramphenicol residues in animal tissues, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Volume 66, 1983, Pages: 1521-1526.
- [60] B. Roudaut, High performance liquid chromatography with UV detection and scanning UV confirmation of chloramphenicol in fatty liver, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Volume 19, 1996, Pages: 1097-1105
- [61] M. Ramos, Th. Reuvers, A. Aranda, and J. Gomez, Determination of chloramphenicol in chicken muscle by high performance liquid chromatography and UV-diode array detection, *Journal of Liquid Chromatography*, Volume 17, 1994, Pages: 385-401
- [62] M.M.L. Aerts, H.J. Keukens, and G.A. Werdmuller, Liquid chromatographic determination of chloramphenicol residues in meat: interlaboratory study, *Journal – Association of Official Analytical Chemists*, Volume 72, 1989, Pages: 570-576
- [63] U. R. Tjaden, D. S. Stegehuis, B.J.E.M. Reeuwijk, H. Lingeman, and J. van der Greef, Liquid chromatographic determination of chloramphenicol in kidney tissue homogenates using valve-switching techniques, *Analyst*, Volume 113, 1988, Pages: 171-174
- [64] S. Le Boulaire, J.-C. Bauduret, and F. Andre, Veterinary Drug Residues Survey in Meat: An HPLC Method with a Matrix Solid Phase Dispersion Extraction, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 45, 1997, Pages: 2134-2142
- [65] W.M.A. Niessen, Analysis of antibiotics by liquid chromatography mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 812, 1998, Pages: 53-75
- [66] V. Hormazabal, M. Yndestad, Simultaneous determination of chloramphenicol and ketoprofen in meat and milk and chloramphenicol in egg, honey, and urine using liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Volume 24, 2001, Pages: 2477-2486
- [67] S.B. Turnipseed, J.E. Roybal, A.P. Pfenning, P.J. Kijak, Use of ion-trap liquid chromatography-mass spectrometry to screen and confirm drug residues in aquacultured products, *Analytica Chimica Acta*, Volume 483, 2003 Pages: 373-386

- [68] A. Gantverg, I. Shishani, M. Hoffman, Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine - Liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, Volume 483, 2003 Pages: 125-135
- [69] P. Mottier, V. Parisod, E. Gremaud, P.A. Guy, R. H. Stadler, Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography -electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 994, 2003 Pages: 75-84
- [70] J.M. Van De Riet, R.A. Potter, M. Christie-Fougere, B.G. Burns, Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid, chromatography/mass spectrometry, *Journal of AOAC International*, Volume 86, 2003, Pages: 510-514
- [71] M. Ramos, P. Munoz, A. Aranda, I. Rodriguez, R. Diaz, J. Blanca, Determination of chloramphenicol residues in shrimps by liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B-Analytical technologies in the biomedical and life science*, Volume 791, 2003, Pages: 31-38
- [72] L.K. Sorensen, T.H. Elbaek, H. Hansen, Determination of chloramphenicol in bovine milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of AOAC International*, Volume 86, 2003, Pages: 703-706
- [73] M. Takino, S. Daishima, T. Nakahara, Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 1011, 2003, Pages: 67-75
- [74] W. Hammack, M.C. Carson, B.K. Neuhaus, J.A. Hurlbut, C. Nohetto, J.S. Stuart, A. Brown, D. Kilpatrick, K. Youngs, K. Ferbos, D.N. Heller, Multilaboratory validation of a method to confirm chloramphenicol in shrimp and crabmeat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of AOAC International*, Volume 86, 2003, Pages: 1135-1143
- [75] A.A.M. Stolker, W. Niesing, E.A. Hogendoorn, J.F.M. Versteegh, R. Fuchs, U.A.T. Brinkman, Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water, *Analytical and bioanalytical chemistry*, Volume 378, 2004, Pages: 955-963
- [76] E. Gikas, P. Kormali, D. Tsipi, A. Tsarbopoulos, Development of a rapid and sensitive SPE-LC-ESI MS/MS method for the determination of chloramphenicol in seafood, *Journal of agricultural and food chemistry*, Volume 52, 2004, Pages: 1025-1030

- [77] M.J. Bogusz, H. Hassan, E. Al-Enazi, Z. Ibrahim, M. Al-Tufail, Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography electrospray negative ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B-Analytical technologies in the biomedical and life science*, Volume 807, 2004, Pages: 343-356
- [78] P.A. Guy, D. Royer, P. Mottier, E. Gremaud, A. Perisset, R.H. Stadler, Quantitative determination of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 1054, 2004, Pages: 365-371
- [79] P. Munoz, J. Blanca, A. Ramos, M. Bartolome, E. Garcia, N. Mendez, J. Gomez, M.M. de Pozuelo, A versatile liquid chromatography- tandem mass spectrometry system for the analysis of different groups of veterinary drugs, *Analytica Chimica Acta*, Volume 529, 2005, Pages: 137-144
- [80] P. Gallo, A. Nasi, F. Vinci, G. Guadagnuolo, G. Brambilla, M. Fiori, L. Serpe, Development of a liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method for confirmation of chloramphenicol residues in milk after alfa-1-acid glycoprotein affinity chromatography, *Rapid communications in mass spectrometry*, Volume 19, 2005, Pages: 574-579
- [81] L. Penney, A. Smith, B. Coates, A. Wijewickreme, Determination of chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues by liquid chromatography/mass spectrometry, *Journal of AOAC International*, Volume 88, 2005, Pages: 645-653
- [82] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products, Volume 24, 2005, Pages: 704-733
- [83] D. Ortelli, P. Edder, C. Corvi, Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography - Tandem mass spectrometry, *Chromatographia*, Volume 59, 2004 Pages: 61-64
- [84] A.F. Forti, G. Campana, A. Simonella, M. Multari, G. Scortichini, Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, Volume 529, 2005, Pages: 257-263
- [85] Untersuchung von Lebensmitteln, Nachweis und Bestimmung von Chloramphenicol-Rückständen in Muskelfleisch, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen, Herausgeber und Redaktion: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Band I/2, Lebensmittel (L), Teil 2, 06.00-38

- [86] Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung von Chloramphenicol in Milch, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen, Herausgeber und Redaktion: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Band I/1c, Lebensmittel (L), Teil 1c, 01.00-55
- [87] M.H. Akhtar, C. Danis, A. Sauve, and C. Barry, Gas chromatographic determination of incurred chloramphenicol residues in eggs following optimal extraction, *Journal of Chromatography*, Volume 696, 1995, Pages: 123 -130
- [88] J.R. Nelson, K.F.T. Copeland, J.R. Forster, DJ. Campbell and W.D. Black, Sensitive gas-liquid chromatographic method for chloramphenicol in animal tissues using electron-capture detection, *Journal of Chromatography*, Volume 276, 1983, Pages: 438-444
- [89] J.M. Degroodt, B. Wyhowski de Bukanski, J. de Groof, H. Beernaert, and S. Srebrnik, Chloramphenicol and nitrofurantoin residue analysis by HPLC and photodiode array detection in meat and fish, *Journal of Liquid Chromatography*, Volume 15, 1992, Pages: 2355 - 2371
- [90] H.-D. Winkeler, S. Oepkemeier, Bestimmung von Chloramphenicol-Rückständen in Honig mittels Mikrobore-LC, *GIT Labor-Fachzeitschrift* 9/9002
- [91] S. Turnipseed, C. Burns, J. Storey, R. Lee, A. Pfennig, Confirmation of multiple phenolic residues in honey by electrospray LC/MS, Animal Drugs Research Center and Denver District Laboratory Food and Drug Administration, P.O. Box 25087, Denver CO 80225-0087
- [92] Gerd Vanhoenacker, Frank David, Pat Sandra, Detection, confirmation, and quantification of chloramphenicol in honey and shrimp at regulatory levels using Quadrupole and Ion Trap LC/MS, Research Institute for Chromatography, Katrijk, Belgium, Agilent Technologies Application
- [93] L. Verzegnassi, D. Royer, P. Mottier and R. H. Stadler, Analysis of chloramphenicol in honeys of different geographical origin by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Food Additives and Contaminants*, Volume 20, 2003, Pages: 335 - 342
- [94] Untersuchung von Honig, Bestimmung der relativen Pollenhäufigkeit (Übernahme der gleichnamigen Deutschen Norm DIN 10760, Ausgabe Mai 2002), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen, Herausgeber und Redaktion: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Band I/4, Lebensmittel (L), Teil 1c, 40.00-11

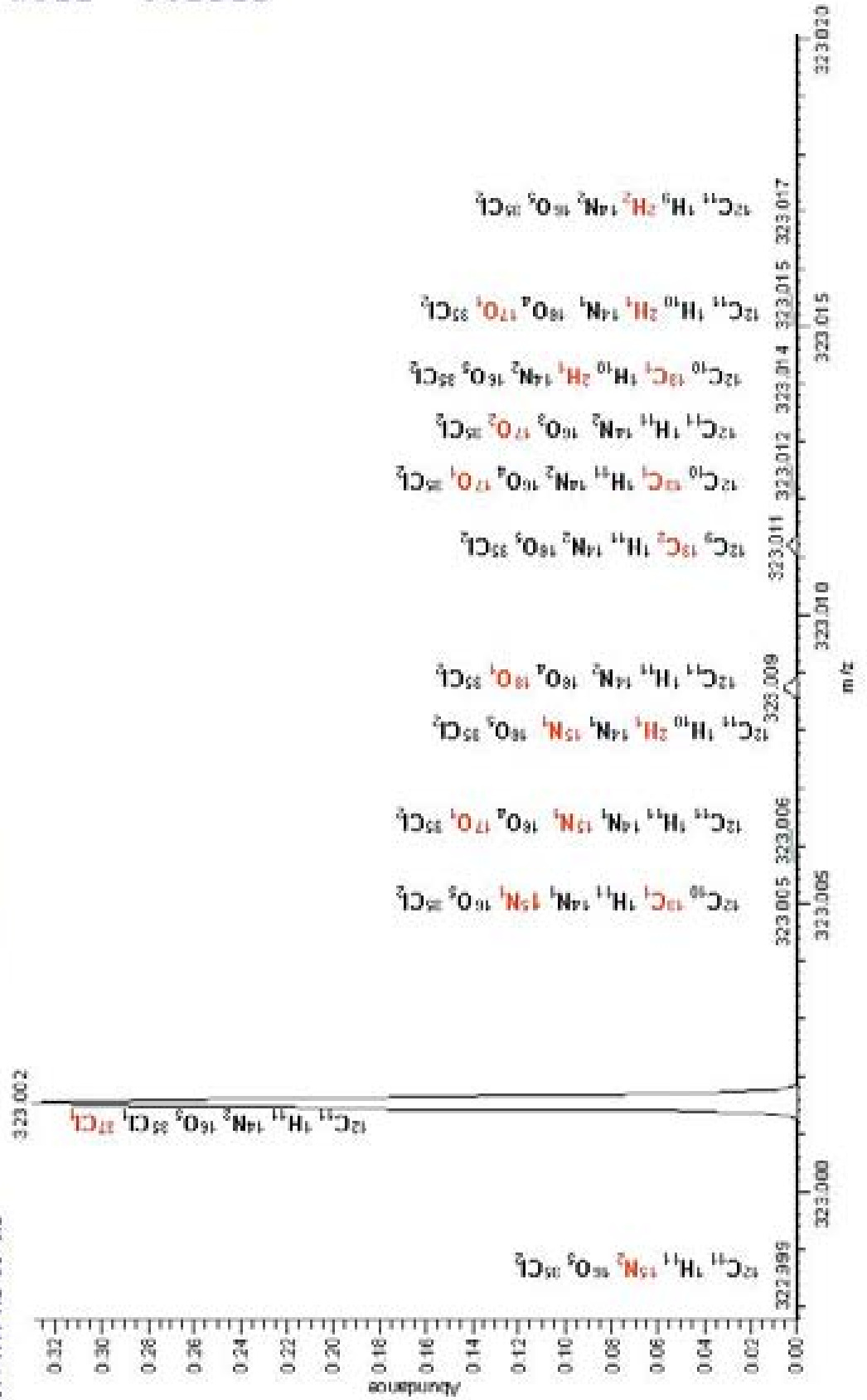
- [95] RIDASCREEN® Chloramphenicol, Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Chloramphenicol, R-Biopharm AG, Darmstadt, Begleitheft zum Kit
- [96] Peter Karlson, Detlef Doenecke, Jan Koolman, Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 14. neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1994
- [97] Armand Blaschette, Allgemeine Chemie I, Atome, Moleküle, Kristalle, 2., durchgesehene Auflage, Quelle und Meyer, UTB für Wissenschaft, Heidelberg, Wiesbaden, 1993
- [98] Armand Blaschette, Allgemeine Chemie II, Chemische Reaktionen, 3., durchgesehene Auflage, Quelle und Meyer, UTB für Wissenschaft, Heidelberg, Wiesbaden, 1993
- [99] Martha Windholz, Susan Budavari, Rosemary F. Blumetti, Elizabeth S. Otterbein, The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, tenth edition, published by Merck & Co., Inc., 1983
- [100] DIN 32645, Chemische Analytik, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung, DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin
- [101] Heinz G. O. Becker, et al., Organikum, Organisch-chemisches Grundpraktikum, 20., bearbeitete und erweiterte Auflage, Johann Ambrosius Barth Verlag, Hüftig GmbH, Heidelberg, Leipzig, 1996
- [102] Veronika Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Reihe: Laborbücher Chemie, 7., durchgesehene Auflage 1992, Otto Salle Verlag GmbH & Co., Frankfurt am Main, Verlag Sauerländer AG, Aarau
- [103] Stavros Kromidas, HPLC-Tipps, Die schnelle Hilfe für jeden Anwender, Band 2, Hoppenstedt Bonnier Zeitschriften GmbH, 2003
- [104] Hans Gerhard Maier, Lebensmittel-und Umweltanalytik, Methoden und Anwendungen, Steinkopff Verlag Darmstadt, 1990
- [105] EN ISO/IEC 17025: 1999, Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien
- [106] Stavros Kromidas, Validierung in der Analytik, 1999 Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto
- [107] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 1992

Anhang 1

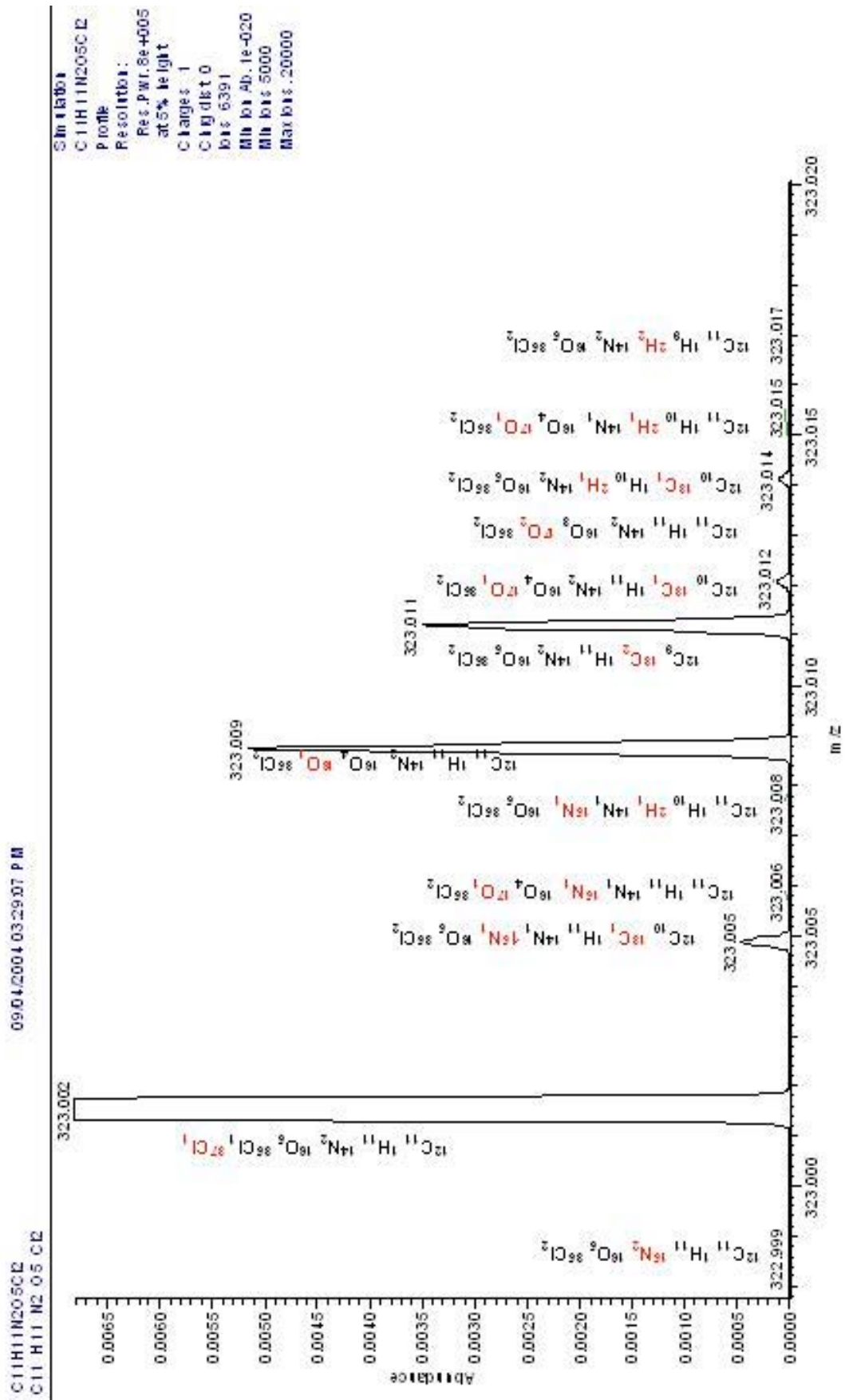
C11H11N2O5CID
C11 H11 N2 O5 CID

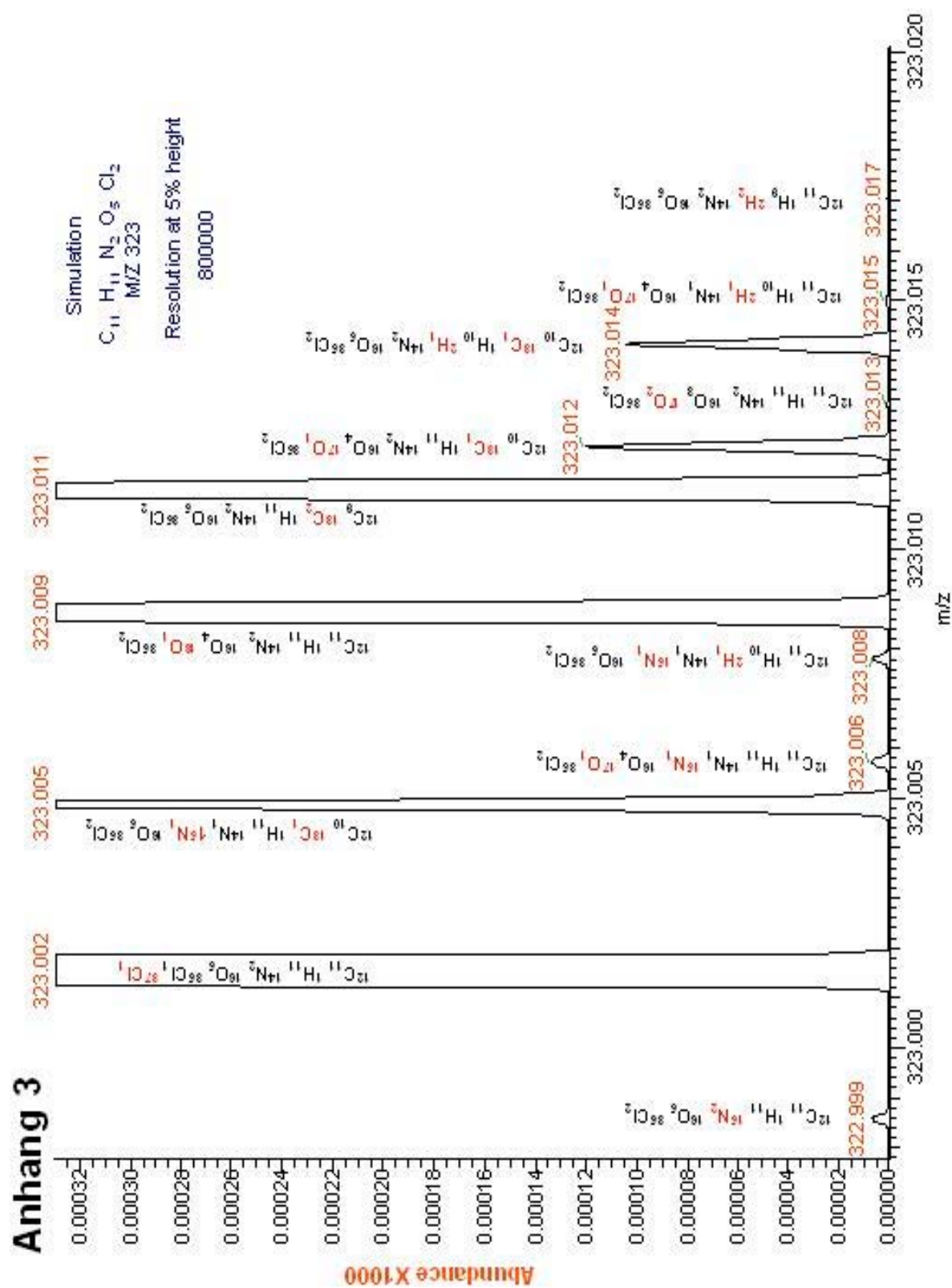
09.04.2004 03:28:54 PM

Simulation
C11H11N2O5CID
Profile
Resolution:
Res Pwr. 36=0.05
at 5% height
Charges 1
Chrg dist 0
Ions 5391
Min Ion Ab. 1e-020
Min Ions 5000
Max Ions 20000



Anhang 2





Anhang 4

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Daniela Grotewahl
Geburtsdatum	06. Februar 1976
Geburtsort	Bad Harzburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

seit Februar 2002 Lebensmittelchemikerin bei der APPLICA GmbH - Bremen

PRAKTISCHE AUSBILDUNG

April 2001 Zweite Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker,
Staatliches Lebensmitteluntersuchungsamt Braunschweig
ab März 2000 Abschluss: Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin
Praktisches Jahr am Staatlichen
Lebensmitteluntersuchungsamt Braunschweig und
Bedarfsgegenständeuntersuchungsamt Lüneburg

STUDIUM

seit April 2002 Anfertigung der Dissertation
*Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von
Chloramphenicol in Bienenprodukten mittels LC-MS,*
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Dez. 1999 – März 2000 Anfertigung der Wissenschaftliche Abschlussarbeit
*Quantifizierung und Bildungskinetik von Diketopiperazinen
in Röstkaffee,*
Technische Universität Braunschweig
Nov. 1999 praktische und mündliche Prüfungen zur Ersten
Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker,
Technische Universität Braunschweig
Okt. 1997 Vorprüfung für Lebensmittelchemiker,
Technische Universität Braunschweig
ab Okt. 1995 Studium der Lebensmittelchemie,
Technische Universität Braunschweig

SCHULAUSBILDUNG

Mai 1995 Abitur am Werner-von-Siemens-Gymnasium,
Bad Harzburg
1982 - 1995 Grundschule, Orientierungsstufe, Gymnasium,
Bad Harzburg

Veröffentlichungen

Direkte Bestimmung von Chloramphenicol in Honig und honighaltigen Produkten
mittels online-SPE-LC-MS

D.Grotewahl¹, K.-P. Raezke¹, H. Meisel²

¹ APPLICA GmbH, Bremen

² Bundesforschungsanstalt für Milchforschung, Kiel
Lebensmittelchemie 57, 73 – 104 (2003), S. 90 - 91

Analyse von Chloramphenicol-Rückständen in Bienenprodukten unterschiedlicher
geographischer Herkunft mittels LC-MS/MS

D.Grotewahl¹, K.-P. Raezke¹, H. Meisel²

¹ APPLICA GmbH, Bremen

² Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel – Standort Kiel, Institut
für Chemie und Technologie der Milch
Lebensmittelchemie 59, 1 – 24 (2005), S. 8

Poster

Chloramphenicol in honey - Development of the spreading in honey and comparison
of the methods used for the analysis of this parameter

Daniela Grotewahl, APPLICA GmbH-Applied Analytical Chemistry, D-28755 Bremen,
Am Becketal 14, Germany

Apimondia-Symposium 2004, Prevention of Residues in Honey 2

Analyse von Chloramphenicol-Rückständen in Bienenprodukten unterschiedlicher
geographischer Herkunft mittels LC-MS/MS

D.Grotewahl¹, K.-P. Raezke¹, H. Meisel²

¹ APPLICA GmbH, Bremen

² Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel – Standort Kiel, Institut
für Chemie und Technologie der Milch
33. Lebensmittelchemikertag 2004 in Bonn

Vorträge

Direkte Bestimmung von Chloramphenicol in Honig und honighaltigen Produkten
mittels online-SPE-LC-MS

D.Grotewahl, K.-P. Raezke, Bremen

Lebensmittelchemische Gesellschaft, Regionalverband Nord, 38. Arbeitstagung,
Hamburg 2003

