



Daniela Grotewahl (Autor)

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



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2180>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Honig.....</b>	<b>2</b>
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
<b>1.2.</b>	<b>Gelée Royale.....</b>	<b>8</b>
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
<b>1.3.</b>	<b>Pollen.....</b>	<b>10</b>
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
<b>1.4.</b>	<b>Bienenwachs.....</b>	<b>11</b>
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
<b>1.5.</b>	<b>Propolis.....</b>	<b>12</b>
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
<b>1.6.</b>	<b>Chloramphenicol (CAP).....</b>	<b>14</b>
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

<b>1.7.</b>	<b>LC-MS.....</b>	<b>17</b>
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
<b>1.8.</b>	<b>Problemstellung.....</b>	<b>23</b>
1.8.1.	Hintergrund.....	23
1.8.2.	Stand der Forschung.....	25
1.8.2.1.	Begleitende Entwicklungen.....	26
1.8.3.	Ziele.....	26
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
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

<b>2.2.</b>	<b>LC-MS/MS (Flüssigchromatographie gekoppelt mit Triple Quadrupole Massenspektrometrie).....</b>	<b>37</b>
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
<b>2.3.</b>	<b>Online-SPE-LC-MS/MS (Online-Festphasenextraktion gekoppelt mit Flüssigchromatographie und Triple Quadrupole Massenspektrometrie).....</b>	<b>45</b>
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
<b>2.4.</b>	<b>Pollenanalyse.....</b>	<b>48</b>
2.4.1.	Probenvorbereitung.....	48
2.4.2.	Mikroskopie.....	48

<b>2.5.</b>	<b>ELISA.....</b>	<b>49</b>
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
<b>2.6.</b>	<b>Migration von CAP.....</b>	<b>51</b>
2.6.1.	Prinzip.....	51
2.6.2.	Durchführung.....	52
<b>2.7.</b>	<b>Geräte und Software.....</b>	<b>52</b>
<b>2.8.</b>	<b>Chemikalien und Hilfsmittel.....</b>	<b>53</b>
<b>2.9.</b>	<b>Reagenzien.....</b>	<b>54</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1.</b>	<b>Bestimmung von CAP mittels online SPE-LC-MS (Single Quadrupole).....</b>	<b>55</b>
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
<b>3.2.</b>	<b>Bestimmung von CAP mittels LC-MS/MS (Triple Quadrupole).....</b>	<b>72</b>
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
<b>3.3.</b>	<b>Bestimmung von CAP mittels online-SPE-LC-MS/MS...</b>	<b>96</b>
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
<b>3.4.</b>	<b>Abhängigkeit der Chloramphenicol-Analyse von Art und Beschaffenheit des Bienenproduktes.....</b>	<b>105</b>
3.4.1.	Honig.....	105
3.4.2.	Gelée Royale.....	109
3.4.3.	Blütenpollen.....	110
3.4.4.	Propolis.....	110
<b>3.5.</b>	<b>Validierungen.....</b>	<b>110</b>
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 $\alpha$ ) und Nachweisvermögen (CC $\beta$ ) – 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 $\alpha$ ) und Nachweisvermögen (CC $\beta$ ) – 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