

Entwicklung eines Monitoring-Systems zur Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotika und ihrer Umwandlungsprodukte in Honig

Der Fakultät für Naturwissenschaften
Department Chemie
der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Chemie
Dr. rer. nat.

vorgelegte Dissertation

von Dipl.-Chem.-Ing.
Reinhard Michel
aus Salzkotten

Paderborn 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2006 bis Dezember 2008 in Kooperation mit der Faethe Labor GmbH an der Universität Paderborn im Fach Anorganische und Analytische Chemie (Department Chemie, Fakultät für Naturwissenschaften) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Grote angefertigt.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit:

R. Michel, M. Grote, C. Sprenger; *Entwicklung eines Monitoringsystems zur Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotika und ihrer Umwandlungsprodukte in Honig*. Lebensmittelchemie, 62, (2008), 136.

R. Michel, M. Grote, C. Sprenger; *Entwicklung eines Monitoringsystems zur Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotika und ihrer Umwandlungsprodukte in Honig*. 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag 8.-10.09.2008 in Kaiserslautern; Posterpräsentation.

R. Michel, M. Grote, C. Sprenger; *Antibiotic residues in honey - development of a screening method by means of LC-MS/MS*. Third German-Hungarian Workshop, 15.-17. May 2008, Universität Paderborn; Posterpräsentation.

R. Michel, M. Grote, C. Sprenger; *Entwicklung eines Monitoringsystems zur Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotika und ihrer Umwandlungsprodukte in Honig*. Arbeitstagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Wuppertal, 5. März 2008; Vortrag.

Veröffentlichungen aus vorangegangenen Arbeiten:

M. Grote, C. Schwake-Anduschus, R. Michel, H. Stevens, W. Heyser, G. Langenkämper, T. Betsche, M. Freitag; *Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil*. Landbauforschung Völkenrode - FAL Agricultural Research, **57**(1), (2007), 25-32.

M. Grote, C. Schwake-Anduschus, R. Michel, W. Heyser, H. Hayen, G. Langenkämper, T. Betsche, M. Freitag; *Aufnahme und Transport von Tierarzneistoffen in Nutzpflanzen*. In Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie. Band 58, Vorträge der 58. Fachtagung "Tierarzneimittel in der Umwelt", Hrsg. Bayerisches Landesamt für Umwelt, Oldenbourg Industrieverlag GmbH, ISBN 978-3-8356-3135-9, (2007), 161-173.

M. Grote, C. Schwake-Anduschus, H. Stevens, R. Michel, T. Betsche, M. Freitag; *Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden - Ergebnisse eines Modellversuchs*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, **1**, (2006), 38-50,

M. Freitag, H. Stevens, R. Michel, C. Schwake-Anduschus, T. Betsche, M. Grote; *Transfer of Antibiotics Used in Animal Husbandry from Slurry into Food*. Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier, 10. Symposium 28./29. September 2005, Jena, Tagungsband: Seite 174.

M. Grote, C. Schwake-Anduschus, H. Stevens, R. Michel, H. Korste, W. Heyser, T. Betsche, M. Freitag; *Antibiotikaeinträge aus der Tierhaltung in Boden und Nutzpflanzen - Ergebnisse eines Modellversuches*. VDLUFA-Schriftenreihe, Kongressband 2005, VDLUFA-Verlag, LUFA Speyer Kreislaufwirtschaft mit der Landwirtschaft - quo vadis? 27. – 30.09.2005, Bonn, S. 228-232 (ISBN 3-922712-92-4).

1. Referent: Herr Prof. Dr. M. Grote

(Department Chemie; Anorganische und Analytische Chemie)

2. Referent: Herr Prof. Dr. H. Heseke

(Department Sport und Gesundheit; Institut für Ernährung, Konsum und Gesundheit)

Eingereicht am: 19.03.2010

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2010

„Das Glück ist das einzige, das sich verdoppelt, wenn man es teilt.“

Albert Schweitzer

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Grote für die interessante Themenstellung, stete Diskussionsbereitschaft und die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Hesecker danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. C. Sprenger, Geschäftsführer der Faethe Labor GmbH Paderborn, danke ich für die firmeninterne Betreuung im Rahmen eines Forschungsprojektes.

Herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises, insbesondere bei Rodica Knaup, Didem Hanim Meriç, Mareike Busse, Manuel Ewe, Hubertus Korste, Ines dos Santos Vieira und Gülcin Seibert für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft, bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, die mich während meiner Studienzzeit geduldig und nach Kräften unterstützt hat.

Meiner Frau Britta Michel danke ich für ihre Geduld und Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Honig: Produktion, Inhaltsstoffe und Rückstände	5
3 Rechtliche Grundlagen der Honigqualität	8
4 Eintragspfade der Antibiotika und Resistenzproblematik	13
5 Basiseigenschaften der Antibiotika	24
5.1 Tetracycline.....	24
5.2 Sulfonamide und Trimethoprim.....	27
5.3 Chloramphenicol.....	31
5.4 Nitrofurane.....	32
5.5 Aminoglykoside.....	33
5.6 Makrolide.....	35
5.7 Fluorchinolone.....	37
5.8 Lincosamide.....	40
5.9 Zusammenfassung.....	41
6 Stand der Honiganalytik	42
6.1 Wirkstoffgruppen.....	42
6.2 Probenvorbereitung.....	45
6.3 Zusammenfassung.....	47
7 Untersuchungsmethodik	49
8 Ergebnisse und Diskussion	52
8.1 Methodenentwicklung (LCQ).....	52
8.1.1 Entwicklung einer Online-SPE-LC-MS Methode: Sulfonamide.....	52
8.1.2 Online-SPE: Tetracycline.....	60
8.1.3 Online SPE: 10 mL-Aufgabevolumen.....	62
8.2 Methodenentwicklung (LTQ).....	69
8.2.1 Tetracycline.....	69
8.2.2 Sulfonamide und Trimethoprim.....	77
8.2.3 Chloramphenicol.....	86
8.2.4 Nitrofurane.....	92
8.2.5 Aminoglykoside.....	98
8.2.6 Makrolide und Lincosamide.....	103

8.2.7 Fluorchinolone.....	110
8.3 Validierung der entwickelten LC-MS-Verfahren.....	115
8.3.1 Wahl des Arbeitsbereiches	116
8.3.2 Überprüfung der Kalibrierung	117
8.3.2.1 Kalibrierfunktion.....	117
8.3.2.2 Überprüfung der Linearität.....	119
8.3.2.3 Überprüfung der Präzision.....	120
8.3.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	122
8.3.3.1 Spezifität.....	124
8.3.3.2 Selektivität.....	125
8.3.4 Präzision.....	126
8.3.5 Richtigkeit.....	127
8.3.6 Zusammenfassung der Validierungsergebnisse.....	128
8.4 Das Monitoring-System.....	130
8.5 Anwendung des Monitoring-Systems in einer Marktstudie	132
8.6 Chemometrie / Herkunftsbestimmung („Profiling“)	139
9 Zusammenfassung und Ausblick.....	143
10 Experimenteller Teil	146
10.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	146
10.2 Geräte.....	150
10.2.1 LCQ dreidimensionale Iontrap.....	150
10.2.2 LTQ lineare Iontrap	152
10.2.3 Sonstige Laborgeräte.....	154
10.3 Lösungen	154
10.3.1 Mobile Phasen	154
10.3.2 Antibiotika-Stammlösungen.....	156
10.3.3 Pufferlösungen.....	156
10.3.4 Sonstige Chemikalien	157
10.4 Validierung der Analysenmethoden.....	158
11 Literatur.....	159

A Anhang	I
A 1 Online-SPE	I
A 2 Probenvorbereitung (SOP).....	III
A 3 Validierungsdaten.....	VIII
A 3.1 Kalibration: Gleichungen und Bestimmtheitsmaße	VIII
A 3.2 Kalibrierfunktionen	X
A 3.3 Anpassungstest nach Mandel	XXVIII
A 3.4 Residualanalyse	XXX
A 3.5 Verfahrenskennndaten	XLVII
A 3.6 NWG, BG, cc_{α} und cc_{β}	L
A 3.7 Wiederfindung.....	LIII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
ACTC	Anhydrochlortetracyclin
ADI	Acceptable daily intake
AERY	Anhydroerythromycin
AHD	1-Aminohydantoin
ALP	Analytical performance limit
AOZ	3-Amino-2-oxazolidon
AMOZ	3-Amino-5-morpholinomethyl-1,3-oxazolidon-2-on
α -Apo-OTC	Alpha-Apo-Oxytetracyclin
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
β -Apo-OTC	Beta-Alpha-Oxytetracyclin
ATC	Anhydrotetracyclin
BAM	Bundesinstitut für Materialprüfung und -prüfung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze
CAP	Chloramphenicol
Cip	Ciprofloxacin
Cl _a	Clarithromycin
Cl _i	Clindamycin
CTC	Chlortetracyclin
DAD	Dioden-Array-Detektor
DAN	Danofloxacin
DC	Doxycyclin
Dif	Difloxacin
DIN	Deutsche Industrie Norm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMC	Demeclocyclin
DS ²	Differenz der Abweichungsvarianzen
DSTR	Dihydrostreptomycin
DTA	Duldbare tägliche Aufnahmemenge
ECD	Electrochemical Detection
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency

Eno	Enoxacin
Enr	Enrofloxacin
Epi-CTC	Epi-Chlortetracyclin
Epi-DC	Epi-Doxycyclin
Epi-DMC	Epi-Demeclocyclin
Epi-Iso-CTC	Epi-Isochlortetracyclin
Epi-TC	Epi-Tetracyclin
Ery	Erythromycin
ESI	Electrospray Ionisation
EU	Europäische Union
eV	Elektronenvolt
F	Referenzgröße (Anpassungstest nach Mandel)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FEDESA	Fédération Européenne de la Santé Animale
Fle	Fleroxacin
Flu	Flumequin
f	Freiheitsgrad
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HLB	Hydrophilic-Lipophilic-Balanced
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
IS	Interner Standard
Iso-CTC	Isochlortetracyclin
Jos	Josamycin
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
Leu	Leucomycin
Lev	Levofloxacin
Lin	Lincomycin
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
(m/m)	Massenprozent
Mar	Marbofloxacin
MECC	Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography
Min	Minocyclin

MIP	Molecularly Imprinted Polymers
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRL	Maximum Residue Limit
MRPL	Minimum Required Performance Limit
MRSA	Methicillin resistente Staphylococcus aureus
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
n	Anzahl der Wiederholmessungen einer Konzentration (Injektionen)
N	Anzahl der Messungen, d.h. Anzahl der analysierten Konzentrationen
2-NBA	2-Nitrobenzaldehyd
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachweisbar
NFM	Nitrofurantolol
NOEL	No Observed Effect Level
Nor	Norfloxacin
NPLC	Normal Phase Chromatography
NRK	Nationaler Rückstandskontrollplan
NWG	Nachweisgrenze
Oxo	Oxolinsäure
PCA	Principal Component Analysis
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft
PFFA	Pentafluorpropionsäure-Anhydrid
PLE	Pressurized Liquid Extraction
PG	Prüfgröße
PW	Prüfwert
R ²	Bestimmtheitsmaß
Rox	Roxithromycin
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RPLC	Reversed Phase Liquid Chromatography
RT	Raumtemperatur
s _i ²	Varianz einer Datenserie
s _{rel}	Relative Standardabweichung
s _{xo}	Verfahrensstandardabweichung
s _{y1}	Reststandardabweichung der linearen Funktion
s _{y2}	Reststandardabweichung der quadratischen Funktion
Sar	Sarafloxacin
SCPD	Sulfachloropyridazin

SDD	Sulfadimidin
SDM	Sulfadimethoxin
SDX	Sulfadoxin
SEM	Semicarbazid
SF	Sicherheitsfaktor
SFD	Sulfadiazin
SGD	Sulfaguanidin
SM	Sulfameter
SMPD	Sulfamethoxypyridazin
SMOAZ	Sulfamethoxazol
SMTZ	Sulfamethizol
SMZ	Sulfamerazin
S/N	Signal-zu-Rauschverhältnis (Signal to Noise Ratio)
SOP	Standard Operation Procedure
Spa	Sparfloxacin
SPD	Sulfapyridin
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
STR	Streptomycin
STZ	Sulfathiazol
TC	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Total Ion Current
Til	Tilmicosin
TMP	Trimethoprim
TOF	Time of Flight
Tyl-A	Tylosin A
t	Zeit
t_R	Retentionszeit [min]
U/min	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumenanteil
V	Volt
V_{x0}	Relative Verfahrensstandardabweichung, Variationskoeffizient
VELS	Verzehrsstudie zur Ermittlung der Lebensmittelaufnahme von Säuglingen
WHO	World Health Organization
(w/w)	Massenanteil
x	Konzentration
y	Detektorsignal

1 Einleitung und Zielsetzung

Honig enthält neben Zuckern eine Vielzahl von Inhaltsstoffen und partikulären Komponenten (z.B. Pollen). Gemäß Begriffsbestimmung der Honigverordnung vom 16. Januar 2004 ist Honig „der natursüße 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].

Je nach pflanzlichem Ursprung und Herkunft variiert die Zusammensetzung des Honigs. Die Verwendung des Honigs reicht bis in die prähistorische Zeiten zurück. In früheren Zivilisationen wurde dem Honig sogar heilende und magische Wirkungen zugeschrieben. Bis heute wird Honig als naturbelassenes Produkt angesehen und unterliegt strengen Qualitätsrichtlinien. Nach und nach wurde die Bienenhaltung intensiviert und verfeinert, so dass in heutiger Zeit in Ländern wie Mexiko, Argentinien usw. Honig zu einem wichtigen Exportgut geworden ist. Für das Ökosystem und die Landwirtschaft sind Bienen von großer Bedeutung: Sie bestäuben viele Kulturpflanzen wie Obstbäume und Gemüsesorten und tragen so erheblich zum Ernteerfolg bei. 35 % der weltweiten Nahrungsmittelproduktion hängen nach Angaben der Welternährungsorganisation der Vereinten Nationen (FAO) von Bestäubern ab [2].

Der Prokopfverbrauch von Honig in Deutschland liegt bei ca. 1,4 kg. Die Nachfrage wird zu 20% mit inländischem Honig gedeckt, ca. 80% werden aus Asien, Osteuropa, Latein- und Mittelamerika importiert [3]. In Abb. 1 sind die prozentualen Importanteile des Jahres 2005 von Herkunftsländern dargestellt. Mehr als die Hälfte der Importe stammen aus Südamerika, wobei Argentinien der Hauptexporteur ist.

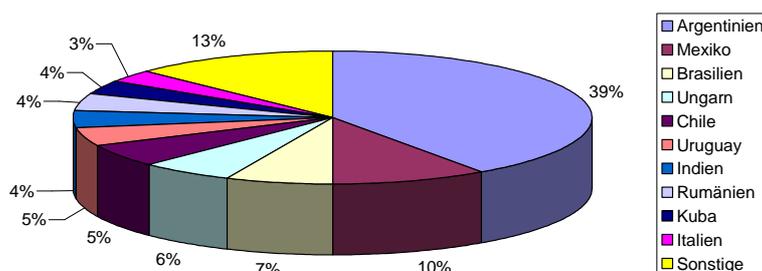


Abb. 1: Importe von Rohhonigen im Jahr 2005 nach Herkunftsländern in Prozent [3]

Die deutsche Gesetzgebung hat den Honig als naturbelassenes Produkt mit einer Reihe von Verordnungen versehen, um die Qualität zu gewährleisten und zu überwachen. Die rechtlichen Grundlagen bilden die Honigverordnung auf nationaler Ebene, die europäische Richtlinie 2001/110/EG und die Verordnung (EWG) Nr. 470/2009 [1,4,5]. In diesen werden die Anforderungen an Honig definiert und Höchstmengen von Rückständen und Kontaminanten festgelegt. Nach Steinhart [6] versteht man unter Rückständen „solche Stoffe, die dem Lebensmittel beabsichtigt aufgrund einer gewünschten Wirkung zugesetzt werden und partiell im Endprodukt enthalten sind bzw. sein können. Kontaminationen dagegen sind Stoffe, die unbeabsichtigt in die Lebensmittel gelangen und partiell in den Lebensmitteln enthalten sind“. Xenobiotika (*griech.: dem Leben fremde Stoffe*) wie zum Beispiel Pestizide, Insektizide, Herbizide, Schwermetalle und Antibiotika können in Bienenprodukten wie Honig, Wachs, Pollen, Gelee Royal und Propolis direkt oder indirekt zu Rückständen führen. Kontaminationen (*lat. contaminatio: Befleckung*) des Honigs können durch Produktionsprozesse (Rohrleitungen), Lagerung (Fässer) oder Vermischung herrühren. Diese Schadstoffe (Rückstände und Kontaminanten) gelangen über die Nahrungskette in den tierischen bzw. menschlichen Organismus [1].

Im Bezug auf Honig gehören in erster Linie die Landwirtschaft und die Imkerei zu den hauptsächlichen Eintragsquellen. Die Landwirtschaft trägt zum Beispiel durch Einsatz von Pestiziden zur Belastung des Honigs bei. Der Einsatz von verschiedenen Antibiotika zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen in der Apikultur (*lat. apis: Biene; Bienenzucht [7]*) birgt die risikoreichste Eintragsquelle. Eine ausführliche Betrachtung des Risikos und ihrer Bewertung erfolgt in Kap. 4. Die Behandlung von bakteriellen Infektionen, zum Beispiel zur Bekämpfung der amerikanischen Faulbrut (*Paenibacillus larvae*), ist in der EU und der Schweiz laut Verordnung (EWG) 470/2009 verboten [5,8]. Wenn die Faulbrut bei einem Bienenvolk auftritt, muss es vernichtet werden, um eine Ausbreitung zu verhindern. Zur Sicherung der Existenzgrundlage werden in vielen Ländern Bienenarzneimittel verwendet, die oftmals in Europa und der Schweiz verboten worden sind. Das BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) hat vor dem Hintergrund einer steigenden Resistenzbildung von Bakterienstämmen gegen Antibiotika in einem Positionspapier „Nulltoleranz“ gefordert [9]. Sogar subinhibitorische Konzentrationen in Umweltkompartimenten (Boden, Wasser) und Lebensmitteln können zur Resistenzbildung beitragen. Brisant ist das insofern, da viele der veterinärmedizinischen Wirkstoffe auch in der Humanmedizin ihre Anwendung finden [8-10]. Der Aspekt der Resistenzbildung und die resultierenden Risiken für den Verbraucher werden in Kap. 4 beschrieben.

In Tab. 1 sind Positivbefunde von Antibiotikarückständen in Honig aufgeführt. Die Untersuchungen werden jährlich im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplanes (NRK) des BVL (Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) in Auftrag gegeben [13, 14].

Tab. 1: Anzahl positiver Befunde an Antibiotika in Honig (NRK) [13,14,15]

Jahr	Proben	Positive Befunde	Substanzen
1998	53	1	k.A.
1999	103	1	k.A.
2000	100	1	k.A.
2001	158	2	k.A.
2002	105	2	k.A.
2003	187	2	k.A.
2004	176	1	Sulfonamid
2005	188	1	Sulfamerazin
2006	164	2	Sulfathiazol, Semicarbazid
2007	173	1	Sulfathiazol
2008	180	2	keine Antibiotika

k.A.: keine Angaben

Die Positivbefunde umfassen den Nitrofurazonmetaboliten Semicarbazid (SEM) und diverse Sulfonamide. Die scheinbar geringen Belastungen von Honig mit Antibiotikarückständen, die anhand von Stichproben im Nationalen Rückstandsplan gemessen worden sind, geben ein unvollständiges Bild der realen Belastung wieder. Weitere Untersuchungen neben dem Nationalen Rückstandsplan, wie z.B. von der Stiftung Warentest im Jahre 2004, konnten in 4 von 38 untersuchten Honigen Antibiotikarückstände nachweisen. Besonders auffällig war der Befund von Antibiotika in Produkten, die als „Bio-Produkte“ deklariert wurden. In einem Biohonig konnten Spurengehalte von Nitrofuranen, in einem anderen Streptomycin nachgewiesen werden [16].

Die Untersuchung der Stiftung Warentest im Vergleich zum NRK zeigt, dass schon bei geringer Probenanzahl Rückstände in Honig nachweisbar sind. Grund für die prozentual höheren Positivbefunde im Stiftung Warentest ist vermutlich die unterschiedliche Leistungsfähigkeit (erfasstes Analytspektrum und Empfindlichkeit der Detektion) der verwendeten Analysenmethoden. Somit ist es erforderlich Analysenmethoden zu entwickeln, die eine möglichst große Anzahl von Antibiotikarückständen in Honig mit geringen Nachweis-

und Bestimmungsgrenzen zu detektieren. Um einen größtmöglichen Verbraucherschutz zu gewährleisten, sollten Rohhonige vor ihrer Weiterverarbeitung (vgl. Kap. 2) auf Antibiotikarückstände untersucht werden. Dies kann durch ein Monitoringsystem (*Monitoring: systematische Erfassung, Überwachung, Beobachtung*) realisiert werden, das routinefähige Analysemethoden beinhaltet, die ein möglichst breites Spektrum der verwendeten Antibiotika abdecken. Neben den Hauptwirkstoffen müssen relevante Umwandlungs- und Abbauprodukte mit einbezogen werden, um Aussagen über den Belastungsgrad der Honige treffen zu können. In Kap. 5 sind die Analyten genannt, für die im Rahmen des Monitoringsystems Screeningmethoden (*Screening: systematische Testverfahren innerhalb eines definierten Prüfbereiches*) entwickelt werden sollen. Nach der Europäischen Richtlinie EWG 470/2009 ist zum Beispiel für die Tetracycline die Summe der Einzelkomponenten und Epimere als Summenparameter zu bestimmen. Andere Umwandlungs- und Abbauprodukte (z.B. Anhydrochlortetracyclin) werden nach EWG 470/2009 bei diesem Summenparameter nicht mit hinzu gerechnet.

Aus dieser Situation ergaben sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Ziele:

- Entwicklung von Extraktions- und Bestimmungsmethoden zum Nachweis von Antibiotika in Honig
- Automatisierung der Probenvorbereitung durch Einsatz einer Online-SPE-Technik (Solid Phase Extraction)
- Implementierung von Abbau- und Umwandlungsprodukte der Antibiotika in die Analysenmethoden
- Archivierung der massenspektrometrischen Messdaten in einer Spektrenbibliothek zur schnellen Identifizierung
- Entwicklung eines Monitoringsystems, basierend auf den Einzelnachweismethoden, zum Nachweis von Antibiotikaspuren unterschiedlicher Wirkstoffgruppen in Honig
- Validierung der Analysemethoden nach nationalen und europäischen Richtlinien und Normen
- Durchführung einer Marktstudie zur Überprüfung der Routinefähigkeit und der Praxistauglichkeit der entwickelten Methoden (Honige unterschiedlicher Herkunft und Sorte)
- Aufbereitung der massenspektrometrischen Daten mit Hilfe einer chemometrischen Software um ein „Profiling“ vornehmen zu können.

2 Honig: Produktion, Inhaltsstoffe und Rückstände

Der Rohstoff eines jeden Honigs ist direkt oder indirekt der Siebröhrensaft höherer Pflanzen. Im Falle von Blütenhonigen wird dieser durch bestimmte Einrichtungen der Pflanze abgesondert oder in Form von Honigtau als Ausscheidungsprodukt pflanzensaugender Insekten von den Bienen gesammelt. Generell unterscheidet man somit Nektar- und Honigtauhonige. Die Zusammensetzung des Honigs variiert je nach Tracht und Herkunft. Die Zuckerzusammensetzung des Phloemsaftes besteht zum großen Anteil aus Saccharose (Rohrzucker). Daneben beinhaltet der Saft auch höhere Zucker (Oligosaccharide) und Zuckeralkohole. Nektar und Honigtau als zuckerhaltige Rohstoffe werden von den Bienen in mehreren Schritten zu Honig verarbeitet. Trachtbienen nehmen den Nektar oder Honigtau auf und fügen ihm enzymreiche Sekrete zu. Der Honigblaseninhalte wird im Bienenstock an Stockbienen abgegeben und in einem Prozess, der als „Lüften des Honigblaseninhaltes“ bezeichnet wird, verarbeitet. In diesem Prozess wird der Wassergehalt reduziert und die enthaltenen Zucker invertiert, d.h. in einfache Zucker wie Glucose und Fructose enzymatisch gespalten. Dieser halbreife Honig wird in Honigzellen eingelagert und der Wassergehalt durch Ventilation weiter reduziert. Der reife Honig wird verdeckelt und kann vom Imker geerntet werden. Neben Zucker und Wasser befinden sich unter den weiteren Inhaltsstoffen: Stickstoffverbindungen, organische Säuren, Fette, Nukleinsäure, Vitamine und Mineralstoffe (vgl. Abb. 2). Durch Beimischen des Sekretes der Biene gelangen zudem noch Enzyme, Inhibine u.a. in den Honig [3].

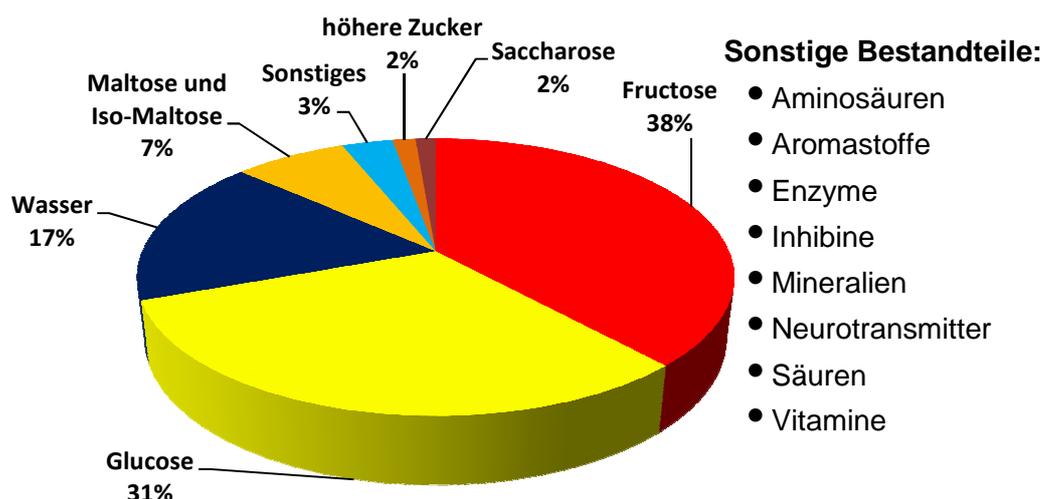


Abb. 2: Bestandteile der Honigmatrix [3]

Der größte Anteil (ca. 80%) des Honigs besteht aus Kohlenhydraten und zu 17% aus Wasser. Um die Qualität eines Honigs beurteilen zu können, wird eine ganze Reihe von Inhaltsstoffen bestimmt und quantifiziert. Die Grundanalytik umfasst die Bestimmung des

HMF-Gehaltes (Hydroxymethylfurfural), der Diastasezahl, des Wassergehaltes, des Säuregrades und des pH-Wertes. Anhand dieser Parameter ist abzuschätzen, inwieweit es sich lohnt, den Honig weiteren spezielleren Analysen zuzuführen. Die Sorte und Tracht (pflanzliche Herkunft) des Honigs wird durch Messung der Leitfähigkeit (Unterscheidung Blüten- oder Honigtauhonig) und eine Pollenanalyse (Herkunft- und Sortenbestimmung) erhalten.

Die spezielleren Analysen umfassen u.a. [3]:

- Mikroskopie
- Sensorik
- Aufklärung von Honigverfälschungen (C3/C4-Verfälschung)
- Rückstände (Pestizide, Antibiotika, Schwermetalle, Bienenarzneimittel: Varroazide (Mittel zur Bekämpfung der Varroamilbe), 1,4-Dichlorbenzol)

Dieses breite Spektrum an Analyten erfordert eine leistungsstarke und lückenlose Überwachung des Honigs. Die Analytik zum Nachweis von Antibiotika in Honig steht im Fokus dieser Arbeit. Rückstände von Antibiotika sollen nach geeigneter Probenvorbereitung durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Ionenfallenmassenspektrometrie (HPLC-Iontrap-MS) in Honig identifiziert und quantifiziert werden. Die Eintragswege der verschiedenen Antibiotikawirkstoffgruppen in Honig sind in Abb. 3 schematisch dargestellt.

Zu den Eintragsquellen von Antibiotika in Honig gehören im Wesentlichen die therapeutische Anwendung in der Apikultur und die Anwendung zur Bekämpfung des Feuerbrandes im Obstanbau. Der Einsatz von Herbiziden wie Asulam (Methylsulfanylcarbamat) zur Bekämpfung von Blacken und Farnen in der Landwirtschaft kann zu Rückständen des antibiotisch wirksamen Abbauproduktes Sulfanilamid im Honig führen [17]. Darüber hinaus werden Antibiotikaeinträge aus Kläranlagenwässern und güllegedüngten Felder als mögliche Quellen in Betracht gezogen. Diese sind jedoch im Vergleich zu den beiden hauptsächlichen Kontaminationsquellen zu vernachlässigen [18-19].

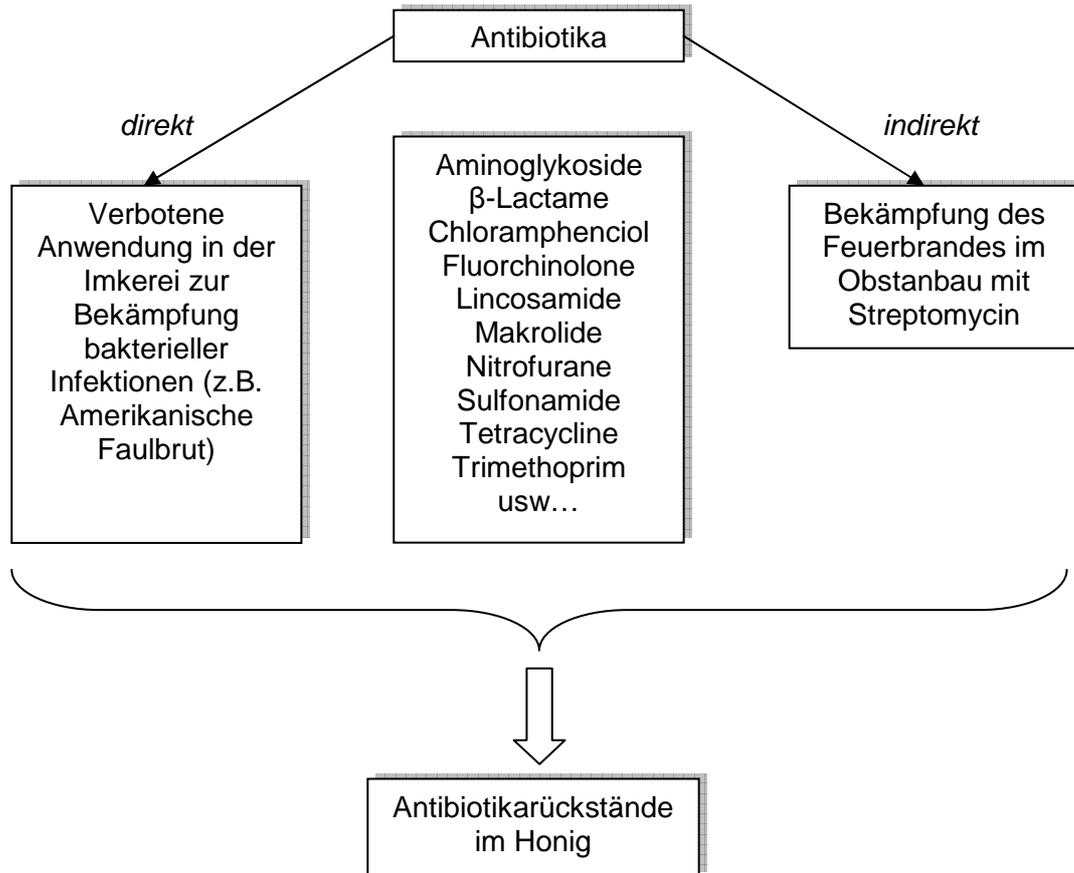


Abb. 3: Mögliche Eintragswege von Antibiotika in Honig [3, 20-22]

Alle aufgeführten Antibiotikasubstanzklassen sind zur Anwendung in der Apikultur verboten. Streptomycin findet Anwendung im Obstanbau zur Bekämpfung des Feuerbrandes (*Erwinia amylovora*), was zu Kontaminationen im Honig (vgl. Abb. 5) führen kann. Der Eintrag von Streptomycin über den Obstanbau wird gesondert rechtlich geregelt (siehe Kap. 3).



Abb. 5: Apfelbaum, der durch das Bakterium *Erwinia amylovora* befallen ist [23]

3 Rechtliche Grundlagen der Honigqualität

Eine ganze Reihe von nationalen und europäischen Verordnungen und Gesetzestexten bilden die rechtlichen Grundlagen für die Qualität des Honigs. In diesen wird neben Richtlinien über Beschaffenheit, Inhaltsstoffe, Deklaration, Sorten usw. die Anwendung von pharmakologisch wirksamen Stoffen als Bienenarzneimittel geregelt. Nach §10 Abschnitt 13.1.1 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) [24] vom 1. September 2005 ist es verboten, vom Tier gewonnene Lebensmittel gewerbsmäßig in den Verkehr zu bringen, wenn in oder auf ihnen Stoffe mit pharmakologischer Wirkung oder deren Umwandlungsprodukte vorhanden sind, die nach Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 [25] des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprunges, bei den dort genannten Tieren nicht angewendet werden dürfen oder festgesetzte Höchstmengen überschreiten. Die Verordnung Nr. 2377/90 wurde am 6. Mai 2009 durch die Verordnung 470/2009 abgelöst [5]. Die Anhänge 1-4 der vorangegangenen Verordnung gelten weiterhin. Stoffe mit pharmakologischer Wirkung werden nach einer wissenschaftlichen Bewertung (Toxikologie, Risikobewertung, usw.) in vier Anhänge eingeteilt:

- Anhang 1: Stoffe, für die Höchstmengen (MRL = *Maximum Residue Limits*) festgelegt werden können.
- Anhang 2: Stoffe, für die keine Höchstmengen festgelegt werden müssen, weil sie entweder nicht zu Rückständen führen oder eventuelle Rückstände unbedenklich sind.
- Anhang 3: Stoffe, für die Höchstmengen vorläufig bis zu einer bestimmten Zeitdauer festgesetzt werden. Innerhalb dieses Zeitrahmens müssen die Werte weiter überprüft werden.
- Anhang 4: Stoffe, für die derzeit keine Höchstmengen festgelegt werden können. Diese Substanzen sind für die Verwendung bei lebensmittelliefernden Tieren verboten.

Die Honigverordnung (HonigV) vom 16. Januar 2004 [1] sieht in §5 Untersuchungen auf verbotene oder nicht zugelassene Stoffe oder Rückstände oder Gehalte von Stoffen vor, welche festgesetzte Höchstmengen überschreiten, die nach wissenschaftlichen Erkenntnissen gesundheitlich unbedenklich sind. Dabei sind Vorgaben des nationalen Rückstandkontrollplanes [13-15] zu berücksichtigen, der nach Maßgabe der Richtlinie

96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 [26] über „Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen jährlich vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit in Abstimmung mit den Ländern aufzustellen ist“. Die WHO (Weltgesundheitsorganisation der Vereinten Nationen) führt in dem Codex Alimentarius (Sammlung von Normen für die Lebensmittelsicherheit und –produktqualität) [27] im Bezug auf Honig Höchstmengen (MRL-Werte) für antimikrobielle Wirkstoffe auf. Die EU-Entscheidung 2002/657/EG [28] definiert Mindestleistungsgrenzen, so genannte MRPL-Werte (*Minimum Required Performance Limits*) oder ALP`s (*Analytical Performance Limits*) für Analysenmethoden, die durch die verwendeten Analysenmethoden erreicht werden müssen. Die ALP`s sollen langfristig gemäß des Entwurfs zur Ablösung der Richtlinie 96/23/EG [26] die MRPL`s ersetzen. Diese Grenzen sind analytisch begründet und können z.B. durch Anwendung leistungsfähigerer Analysemethoden nach unten korrigiert werden. Mit Hilfe der Entscheidung 2005/34/EG [29] wurde die Einfuhrfähigkeit von Lebensmitteln mit Rückständen pharmakologisch wirksamer Stoffe so geregelt, dass sie die Anwendung der MRPL-Werte der Kriterienentscheidung 2002/657/EG [28] als Eingreifwert („*Reference Points For Action*“) vorschreibt. Somit sind Lebensmittel, die Rückstandsgehalte größer oder gleich dem zugehörigen MRPL-Wert aufweisen, bei der Einfuhr zu beanstanden. Die Warensendungen sind zu vernichten oder in die Ursprungsländer zurückzusenden. Durch ein „Gentlemen`s Agreement“ wurde erreicht, dass diese Regelung auch auf den innereuropäischen Markt angewendet wird. Diese Vereinbarung ist jedoch ohne Rechtsgrundlage im europäischen Gemeinschaftsrecht und die MRPL`s wurden als Eingreifwerte keiner Risikobewertung unterzogen.

In Tab. 2 sind die Höchstmengen (MRL) und Mindestleistungsgrenzen (MRPL) der verschiedenen Antibiotikarückstände aufgelistet.

Tab. 2: Höchstmengen (MRL) und Mindestleistungsgrenzen (MRPL) zum Nachweis von Antibiotika in Honig (fett markierte MRPLs sind intern festgelegte Mindestleistungsgrenzen) [3,28,29-32]

Wirkstoffklasse	MRL-Wert [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	MRPL-Wert [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Aminoglykoside (Streptomycin)	10 (20)	-
Chloramphenicol	-	0,3
Fluorchinolone	-	10
Makrolide	-	10
Nitrofurantolone	-	1
Sulfonamide	-	10
Σ Tetracycline	-	10
Trimethoprim	-	10

Gemäß EU-Verordnung 396/2005 ist ab 1. September 2008 der Höchstwert für Streptomycin-Rückstände in Honig nach Anwendung des Antibiotikums als Schädlingsbekämpfungsmittel auf 10 µg/kg festgelegt [30,31]. In Deutschland gilt als Höchstwert für Streptomycin ein MRL-Wert von 20 µg/kg [32].

Wenn keine MRPL's festgelegt werden bzw. diese als nicht rechtsverbindlich anzusehen sind, hängt die Überprüfung der Nulltoleranz und somit die Verkehrsfähigkeit von Lebensmitteln, die Rückstände von verbotenen bzw. nicht zugelassenen Veterinärpharmaka enthalten, allein von der Leistungsfähigkeit des jeweiligen untersuchenden Labors ab [9]. Das BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) hat in einem Positionspapier vom 12. März 2007 Nulltoleranzen für Lebens- und Futtermittel gefordert. Nulltoleranz bedeutet, dass ein Stoff (Antibiotika, Pestizide, Schwermetalle,...) im jeweiligen Lebens- oder Futtermittel nicht vorhanden sein darf.

Der Gesetzgeber setzt Nulltoleranzen [9] fest, wenn

- die Risiken für den Verbraucher noch nicht hinreichend geklärt sind.
- die Risiken für den Verbraucher nicht tolerabel sind.
- nach heutigem Stand der toxikologischen Wissenschaft keine Schwellen- oder Grenzwerte ableitbar sind.
- toxikologische Untersuchungen genotoxische Wirkungen vermuten lassen.
- die toxikologische Datenlage unzureichend ist oder der Verdacht auf weitere gesundheitsschädliche Wirkungen besteht.

Bei prozessbedingten Kontaminanten (z.B. durch Erhitzen des Produktes und Bildung von toxischen Substanzen) kann mitunter die Nulltoleranz nicht eingehalten werden. In diesen Fällen wird das ALARA-Prinzip (*As Low As Reasonable Achievable*) angewendet. Dieses in der EU angewendete Prinzip besagt, dass Höchstmengen so niedrig wie möglich aus (anwendungs-)technischen oder anderen Gründen (z.B. ubiquitäres Vorkommen) festgesetzt werden sollen, um die Gesundheitsrisiken für den Verbraucher im Sinne des präventiven Verbraucherschutzes zu minimieren.

Die Charakterisierung schädlicher Wirkungen von Stoffen, die als Rückstände in Lebensmitteln vorkommen können, wird experimentell hauptsächlich durch Tierversuche ermittelt. Dabei werden in *in vivo* Studien durchgeführt, um die toxischen Effekte der betreffenden Substanz zu charakterisieren. Die Dosis, die in der empfindlichsten Tierspezies, unter Einbeziehung des empfindlichsten toxischen Effektes keine schädigende Wirkung mehr hervorruft, wird als NO(A)EL bezeichnet (*No Observed (Adverse) Effect Level*). Die Extrapolation vom Tier auf den Menschen erfolgt über einen Sicherheitsfaktor, der die zumeist unbekanntem Unterschiede zwischen den Spezies Tier-Mensch berücksichtigen soll [33,34].

Für Stoffe mit antimikrobieller Wirkung wird bei Festlegung von Rückstandshöchstmengen (MRL) ein so genannter mikrobiologischer ADI (*Acceptable Daily Intake*) verwendet, der basierend auf dem Einfluss des Stoffes oder seiner Metaboliten auf die menschliche Darmflora errechnet wird und über Unsicherheitsfaktoren („Uncertainty Factors“) die mögliche Variabilität der beobachteten Effekte abdecken soll (z.B. Intra- und/oder Inter-Spezies Unterschiede). Die niedrigste Konzentration von Stoffen mit antimikrobieller Wirkung, bei der eine Hemmung des Bakterienwachstums beobachtet wird, wird als minimale Hemmkonzentration (MHK) definiert [34]. Sie fließt in Berechnung des ADI's mit ein. Der ADI wird in der Einheit mg pro Kilogramm Körpergewicht [mg/kg KG] angegeben.

Zur Berechnung laut EMEA (*European Medicines Agency*) dienen hierzu [35]:

- Die minimale Hemmkonzentration (MHK) gegenüber der empfindlichsten Bakterienspezies, bei der kein Effekt auftritt,
- der Anteil der Dosis, der das Kolon (Grimmdarm) erreicht,
- der Fäkalbolus (150 g),
- ein Sicherheitsfaktor (SF) zwischen 10 und 100
- das Körpergewicht (KG).

Der ADI wird nach folgender Formel berechnet [34,35]:

$$ADI = \frac{MHK \cdot \text{Fäkalbolus}}{\text{Anteil der Dosis, der das Kolon erreicht} \cdot SF \cdot KG} \quad (\text{Gl. 1})$$

Durch Einfügen des NOEL ergibt sich:
$$ADI = \frac{NOEL}{SF \cdot KG} \quad (\text{Gl. 2})$$

In Tab. 3 sind die berechneten ADI-Werte für einige Antibiotika wiedergegeben.

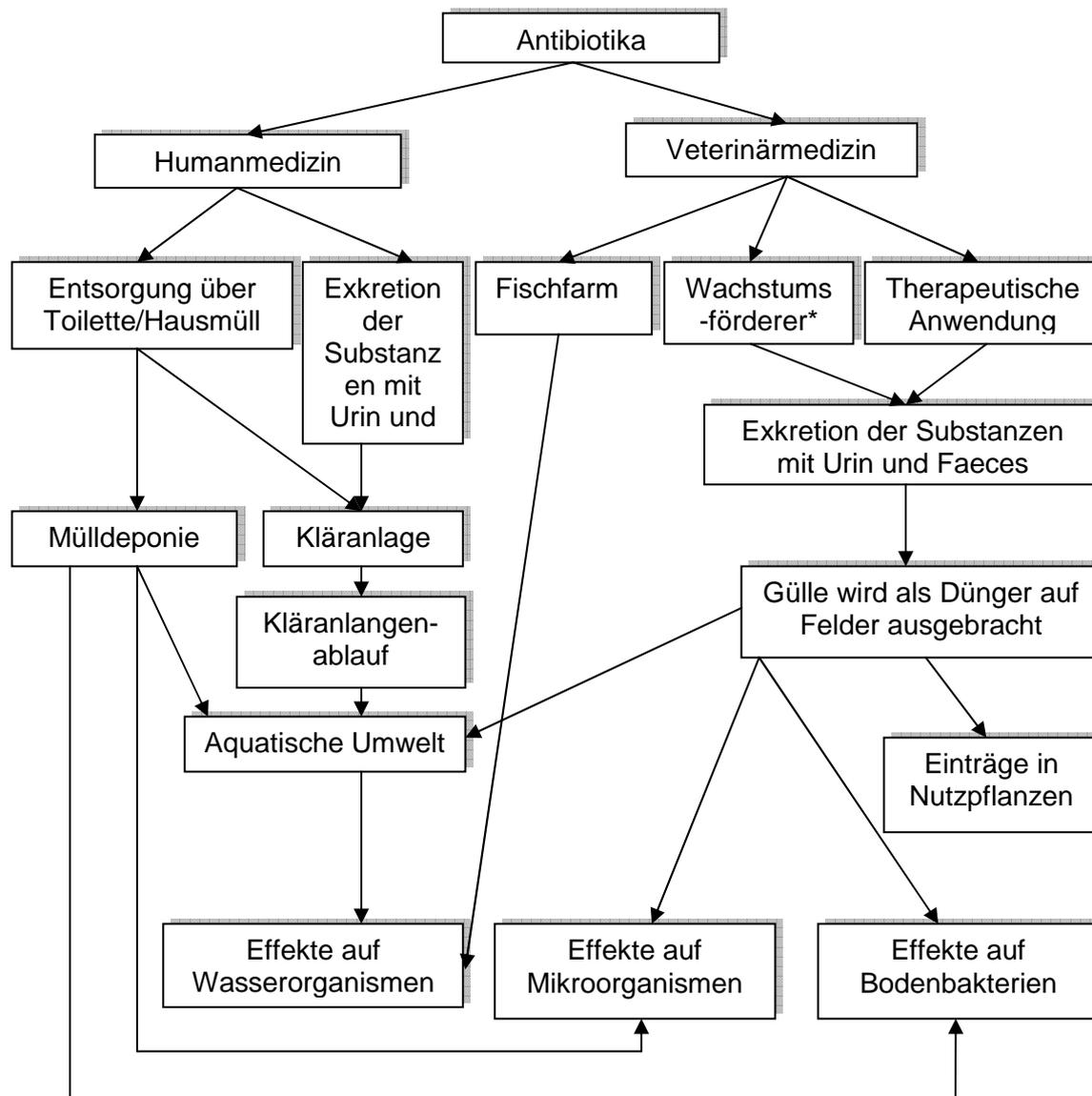
Tab. 3: ADI-Werte für Antibiotika verschiedener Wirkstoffklassen [36]

Antibiotika	ADI (µg/kg KG) pro Tag
Chlortetracyclin	3
Erythromycin	0,7
Lincomycin	30
Oxytetracyclin	3
Streptomycin Dihydrostreptomycin	50
Tylosin	30

Die ADI-Werte werden zum Abschluss der Risikobewertung mit der möglichen realen Aufnahme bzw. Expositionsmenge verglichen. Die Aufnahmemenge kann zum Beispiel auf Basis nationaler Verzehrsdaten (VELS-Modell: Verzehrsstudie zur Ermittlung der Lebensmittelaufnahme von Säuglingen und Kleinkindern für die Abschätzung eines akuten Toxizitätsrisikos durch Rückstände von Pflanzenschutzmitteln) bestimmt werden. In diesem Modell wird die Exposition durch die Aufnahme von Pestizidrückständen über die Nahrung für 2 bis unter 5-jährigen Kindern mit einem Körpergewicht von 16,15 kg vorgenommen [37]. Das Expertengremium der JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives) hat in seinem Bericht [36] die tägliche durchschnittliche Verzehrsmenge von 20 g Honig pro Tag für eine Risikobewertung herangezogen. Unterschieden werden dabei chronische und akute Aufnahmemengen. Zur Ermittlung einer chronischen Aufnahme wird das 97,5 Perzentil der täglichen Aufnahmemenge einer Testgruppe über einen bestimmten Zeitraum gewählt. Eine akute Aufnahme wird durch das 99,95 Perzentil ausgedrückt. Daten einer einwöchigen Untersuchung ergaben als chronische Aufnahmemenge 55 g Honig pro Person pro Tag und für eine akute Aufnahmemenge 144 g Honig pro Person und Tag. Wenn man in diesem Zusammenhang die Verzehrsdaten von Kindern (2 bis unter 5 Jahre) des VELS-Modells zugrunde legt, erhält man für die 97,5 Perzentile - also eine chronische Aufnahmemenge - 22,1 g pro Tag [37]. Zusätzlich zu den in Tab. 3 dargestellten ADI-Werten für Antibiotika wurden im Rahmen der JECFA-Studie Pestizidrückstände und Bienenarzneimittel, wie z.B. Ameisensäure, bewertet.

4 Eintragspfade der Antibiotika und Resistenzproblematik

Antibiotika können auf vielfältigen Wegen in Umweltkompartimente eingetragen werden. Nach Applikation in der Human- und Veterinärmedizin wird ein Großteil der Wirkstoffe unverändert, aber auch als Metabolite ausgeschieden. Zahlreiche Studien [38-45] zum Verteilungsverhalten der Antibiotika in diversen Umweltkompartimenten geben nach heutigem Stand der Wissenschaft ein Bild der Eintragswege wieder.



* EU-Verbot 2006

Abb. 4: Eintragspfade von Antibiotika in die Umwelt nach Halling-Sørensen et al. und Kümmerer et al. [46,47]

Aus dem Schaubild ist ersichtlich, dass Antibiotika nahezu ubiquitär in Umweltkompartimenten vorliegen können. Sie können somit über die Nahrung (Wasser, pflanzliche und tierische Lebensmittel) vom Menschen aufgenommen werden. Das allgegenwärtige Vorkommen der Antibiotika begünstigt zudem die Bildung von Resistenzen. Die Resistenzbildung und die damit verbundenen Risiken werden nachfolgend beschrieben.

Wirkung, Anwendung, Resistenzbildung und Risikobewertung

Antibiotika lassen sich nach ihren Wirktypen und -mechanismen klassifizieren. Generell können die Antibiotika in bakteriostatische und bakteriozide Wirkstoffe unterteilt werden. Die bakteriostatischen Substanzen hemmen das Wachstum der Bakterien, die bakterioziden töten die Bakterien. Zudem lassen sich verschiedene Wirkmechanismen klassifizieren. In Abb. 5 sind eine Bakterienzelle und die verschiedenen Angriffspunkte der Antibiotika schematisch abgebildet. Antibiotika können, wie zum Beispiel die Sulfonamide kombiniert mit Trimethoprim, in den Folsäurestoffwechsel der Zelle eingreifen. Andere Wirkstoffklassen wie die Tetracycline oder Chloramphenicol inhibieren die Proteinsynthese.

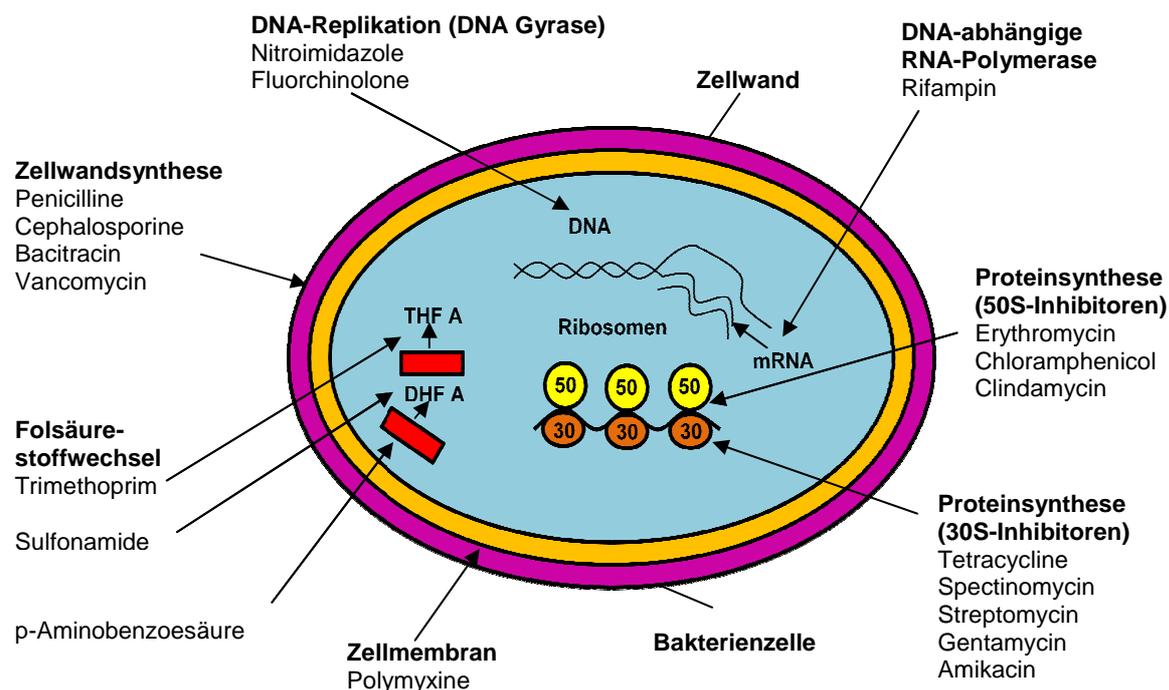


Abb. 5: Wirkung von Antibiotika nach [48]; DNA: Desoxyribonukleinsäure, mRNA: messenger Ribonukleinsäure, THF A: Tetrahydrofolsäure A, DHF A: Dihydrofolsäure A

Bevor auf die einzelnen Wirkstoffe eingegangen wird, werden in den folgenden Kapiteln Ausführungen zur aktuellen Datenlage über Anwendung in der Veterinär- und Humanmedizin, Resistenzbildung und Risikobewertung angegeben.

Anwendung in der Human- und Veterinärmedizin

Antibiotika sind seit der Entdeckung des Penicillins im Jahre 1940 das Mittel der Wahl, um bakterielle Infektionen zu therapieren. Weitere Wirkstoffe (Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, ...) wurden in den letzten Jahrzehnten mit unterschiedlichsten Wirkungsspektren synthetisiert. Neben der humanmedizinischen Anwendung werden Antibiotika auch in der Veterinärmedizin sehr häufig eingesetzt. Nach den Antiparasitika stellen sie die zweithäufigste Wirkstoffgruppe zur Behandlung von landwirtschaftlichen Nutztieren dar [34]. Die Datenlage zur Produktion, Einsatzgebieten und Verbrauch beruht national sowie auf europäischer Ebene oft auf freiwilligen Angaben der Hersteller und Lebensmittelproduzenten. Die FEDESA (European Federation of Animal Health, Europäischer Dachverband der Tierarzneimittelindustrie) hat im Rahmen einer Erhebung die Antibiotikaverbrauchsmengen der Jahre 1997 und 1999 erfasst. In Tab. 4 sind die Verbrauchsmengen aufgeführt [49].

Tab. 4: Verbrauch [t] von Antibiotika in Europa (einschließlich Schweiz) nach Angaben der FEDESA (Fédération Européenne de la Santé Animale) [49]

Verbrauch	1997	1999
Humanmedizin	7659	8528
Veterinärmedizin:	5093	4688
zur Therapie	3494	3902
als Leistungsförderer	1599	786
Gesamt	12752	13216

In den europäischen Staaten wurde der Einsatz von einem Teil der Leistungsförderer (Avoparcin, Zink-Bacitracin, Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox, Olaquinox) in der Veterinärmedizin verboten, was den Rückgang im Jahre 1999 erklärt. Die Schweiz hat schon 1972 den Einsatz von antimikrobiellen Leistungsförderern reglementiert und auf eine beschränkte Anzahl von Substanzen limitiert. Seit 1999 ist die Anwendung von Leistungsförderern in der schweizerischen Tierzucht vollständig verboten. In der europäischen Union wurden in den letzten Jahren weitere zugelassene Leistungsförderer verboten und 2006 [50] europaweit der Einsatz jeglicher Leistungsförderer gesetzlich untersagt.

Tab. 5: Verbote von Leistungsförderern in der Europäischen Union [51]

Jahr	Verbot
1997	Avoparcin*
1998	Zink-Bacitracin, Tylosin*, Spiramycin*, Virginiamycin*
1999	Carbadox, Olaquinox
Ab 2005 in der Diskussion:	Salinomycin, Monensin, Avilamycin, Flavomycin
2006	jeglicher Einsatz verboten

*Bildung von Kreuzresistenzen zu verwendeten Antibiotika in der Humanmedizin möglich

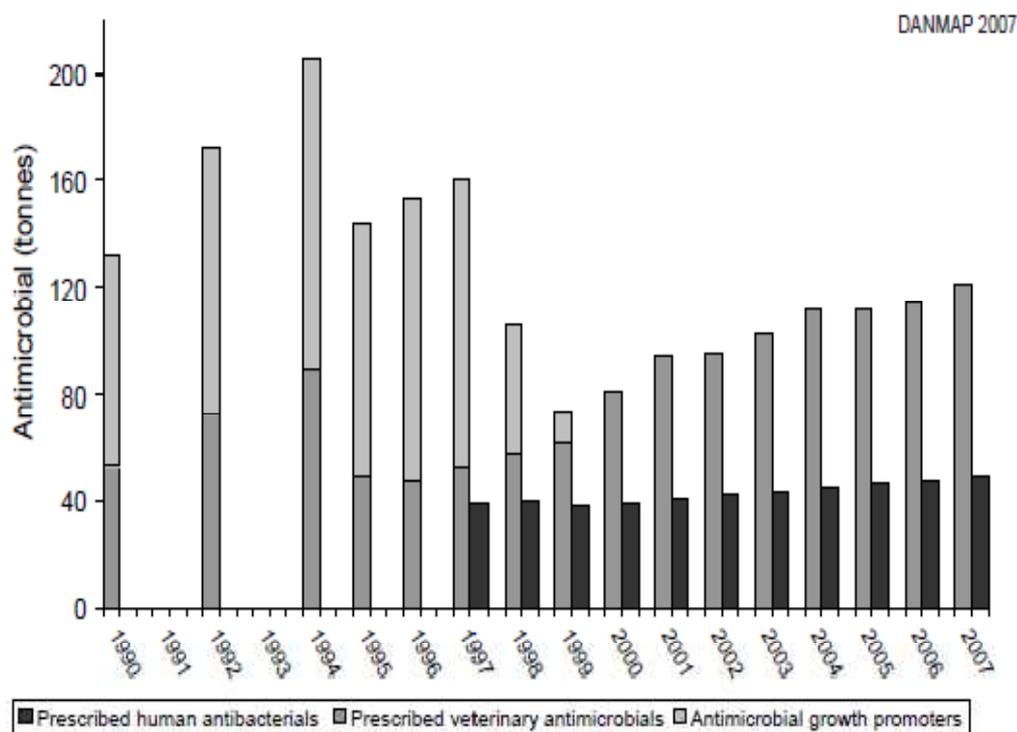
Die zu Mastzwecken zum Futtermittel zugemischten Antibiotika besaßen den nicht unerwünschten Nebeneffekt eines Infektionsschutzes. Die häufig auf sehr engen Raum gehaltenen Tiere in Mastbetrieben erkrankten häufiger, was den Anstieg der therapeutischen Nutzung der Antibiotika mit sich brachte [16].

Auf nationaler Ebene wurden in den Niederlanden, Schweden, Dänemark usw. eigene Erhebungen über den Antibiotikaverbrauch vorgenommen. Sie spiegeln den Trend wieder, dass der Verbrauch der Antibiotika in der Veterinärmedizin insgesamt stetig zunimmt. Neueste Daten zur Lage in Deutschland wurden in einem Bericht des Bundesinstitutes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) herausgegeben. Der Bericht enthält Daten zum Verbrauch der Antibiotika und zur aktuellen Resistenzproblematik. Analog zu der Namensgebung in Dänemark (DANMAP), heißt dieser Bericht GERMAP 2008 [52]. Der Bericht gibt einen Überblick über die Resistenzentwicklungen in der Human- und Veterinärmedizin der letzten Jahre und stellt diese regionenspezifisch dar. Das Datenmaterial zur Bestimmung der Resistenzsituation stammt größtenteils aus der Resistenzstudie der Paul-Ehrlich- Gesellschaft für Chemotherapie, den Erhebungen des German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance (GENARS), dem SARI-Projekt sowie aus dem European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Die Resistenzlage in der Veterinärmedizin variiert je nach Art des eingesetzten Antibiotikums und des Tieres. In Tab. 6 sind die Verbrauchsmengen von Antibiotika in der Veterinärmedizin für die Jahre 2003 und 2005 dargestellt.

Tab 6: Jährlicher Einsatz von Veterinärantibiotika in Deutschland [52]

Antibiotikagruppe	2003 [t]	2005 [t]
Aminoglykoside	27,3	36,3
β -Lactame	155,2	199,2
Chinolone	3,5	3,7
Lincosamide	7,5	12,1
Makrolide	38,6	52,6
Phenicole	4,7	3,8
Pleuromutiline	6,8	6,4
Polypeptide	23,4	21,8
Sulfonamide	71,7	97,5
Tetracycline	385,5	350,0
Gesamt	724,2	784,4

Der Trend, der schon in der europäischen Erhebung von 1999 sichtbar wurde, setzt sich in den Jahren 2003 bis 2005 in Deutschland fort. Die Verbrauchsmengen stiegen fortwährend, wobei neue Substanzklassen (z.B. Tiamulin, Clarithromycin, Tigecyclin,...) die „alten“ Vertreter der Antibiotika nach und nach ersetzen. Der dänische Bericht DANMAP [53] gibt diesen Trend anschaulich wieder (vgl. Abb. 6).

**Abb. 6:** Einsatz von Antibiotika in der Human und - Veterinärmedizin in Dänemark [53]

Viele Bakterienstämme sind im Laufe der letzten 50 Jahre resistent gegen einige Wirkstoffe geworden, was den Einsatz immer neuer Antibiotika erforderlich machte. Diese Entwicklung macht es notwendig, ein genaues Bild der Antibiotikaverbrauchsmengen, der Resistenzbildung und der Belastungssituation in der Umwelt zu gewinnen. Im Bezug auf Honig heißt das konkret, dass analytische Verfahren entwickelt werden müssen, um die Belastungssituation zu erkennen.

Antibiotikaresistenz

Per Definition liegt eine Antibiotikaresistenz vor, wenn die minimale Hemmkonzentration (MHK) *in vitro* höher ist als die *in vivo* erreichbare Serum bzw.- Gewebekonzentration [54]. Das in Human- und Veterinärmedizin zunehmend festzustellende Auftreten bakterieller Resistenzen gegen antibakteriell wirksame Arzneimittel stellt ein Problem bei der Therapie von bakteriellen Infektionen dar. Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO ist jährlich etwa ein Drittel aller Todesfälle auf Infektionen zurückzuführen. Wenn Patienten an einer Infektion, hervorgerufen durch antibiotikaresistente Bakterien erkranken, ist unter Umständen die Therapie äußerst schwierig und sogar im Extremfall unmöglich. Vor diesem Hintergrund sind die zunehmenden Resistenzen (vgl. Abb. 7) als ernst zunehmendes Risiko in der Human- und Veterinärmedizin einzustufen [55]. Die Aufnahme bereits resistenter Bakterien über tierische Lebensmittel oder der Austausch von Resistenzgenen nicht pathogener Bakterien an Krankheitserreger in der menschlichen Darmflora stellen Risiken dar. Krankheiten, die zwischen Tier und Mensch übertragen werden können (Zoonosen), sind wegen ihrer schlechten Therapierbarkeit ein besonderes Risiko, wie zum Beispiel Darminfektionen durch Salmonellen [55].

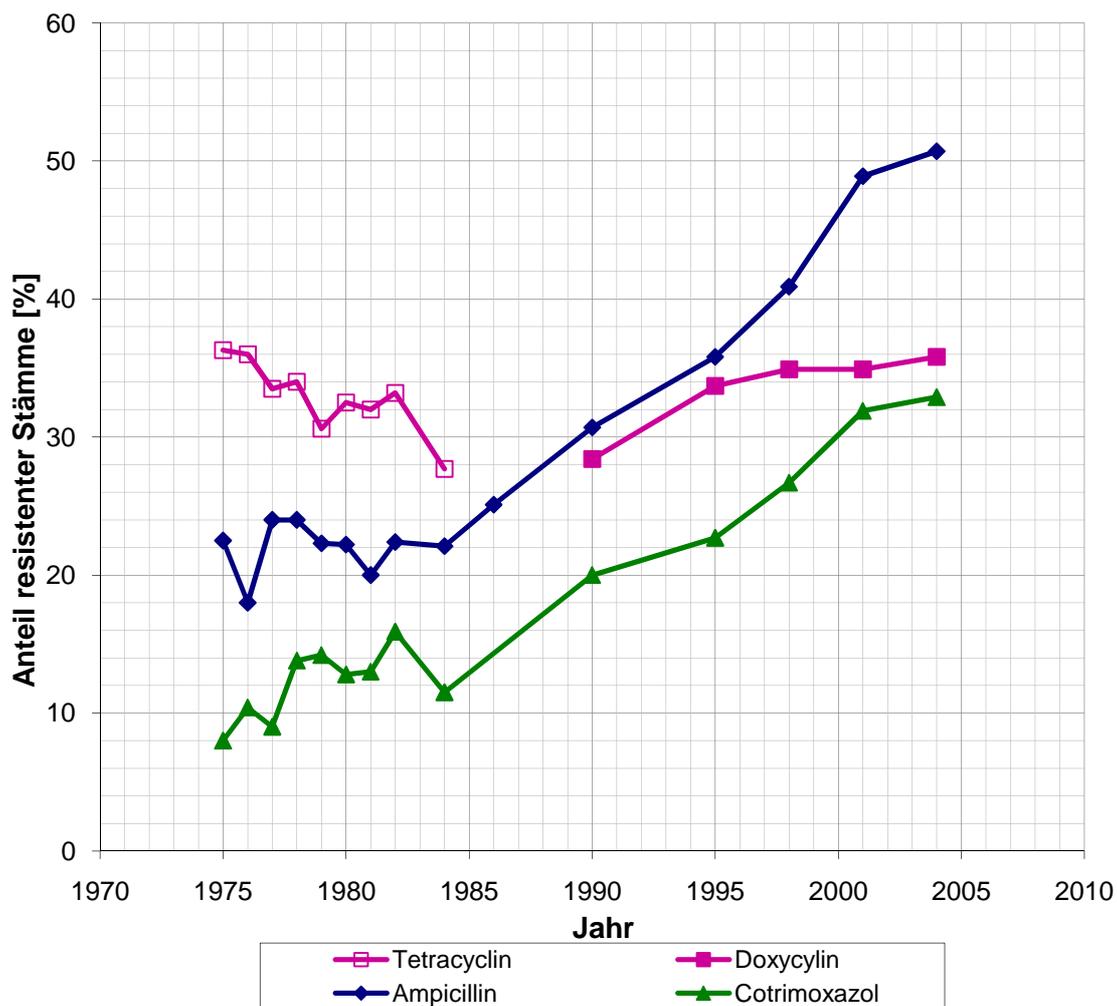


Abb. 7: Verlauf der Resistenzentwicklung von *Escherichia coli* gegenüber Antibiotika unterschiedlicher Wirkstoffklassen [55]

Bakterien können sich zum einen durch rasche Vermehrung und zum anderen mittels einer relativ hohen Mutationsrate schnell auf sich verändernde Umweltbedingungen einstellen. Zum Züchten spezieller Bakterien für den Abbau bestimmter Schadstoffe ist diese Eigenschaft erwünscht und wird bereits in vielen Bereichen eingesetzt [56]. Resistenzen entwickeln sich durch das Wechselspiel von Mutation und Selektion. Neben den natürlichen Resistenzen, bei denen ein Antibiotikum beispielsweise aufgrund seines Wirkungsmechanismus bestimmte Bakterien nicht bekämpfen kann, stehen erworbene Resistenzen. Eine erworbene Resistenz kann durch Mutation, also Anpassung an äußere Einflüsse, oder durch einen Gentransfer zwischen den Bakterien erhalten werden. Die Gene der Bakterien mutieren, und durch den Einsatz von Antibiotika können Bakterien mit Genen, die eine Resistenz bewirken, selektiert werden. Mit der Selektion dieser Bakterien durch die Gabe eines Antibiotikums kommt es zur gleichzeitigen Resistenzentwicklung zu anderen Antibiotika, gegen die Resistenzgene vorhanden sind (Ko-Selektion). Diese, unter äußeren Einflüssen geschaffene Beeinflussung der Mutation wird Selektionsdruck genannt. Ständige

Exposition gegen über einem Antibiotikum erzeugt einen hohen Selektionsdruck [57]. Neueste Studien zeigen, dass auch subinhibitorische Konzentrationen eine Resistenzbildung forcieren können [58].

Bakterien haben verschiedene Resistenz-Mechanismen entwickelt. Zu diesen Mechanismen gehören:

- Abbau oder Umwandlung der Antibiotika zu Metaboliten, die für das Bakterium unschädlich sind,
- Verhinderung der Aufnahme der Antibiotika in die Bakterienzelle oder der schnelle Transport nach außen,
- Veränderung der Zielstrukturen in der Bakterienzelle oder Aufbau alternativer Transportwege, so dass trotz Anwesenheit der Antibiotika der essentielle Stoffwechsel nicht beeinträchtigt wird.

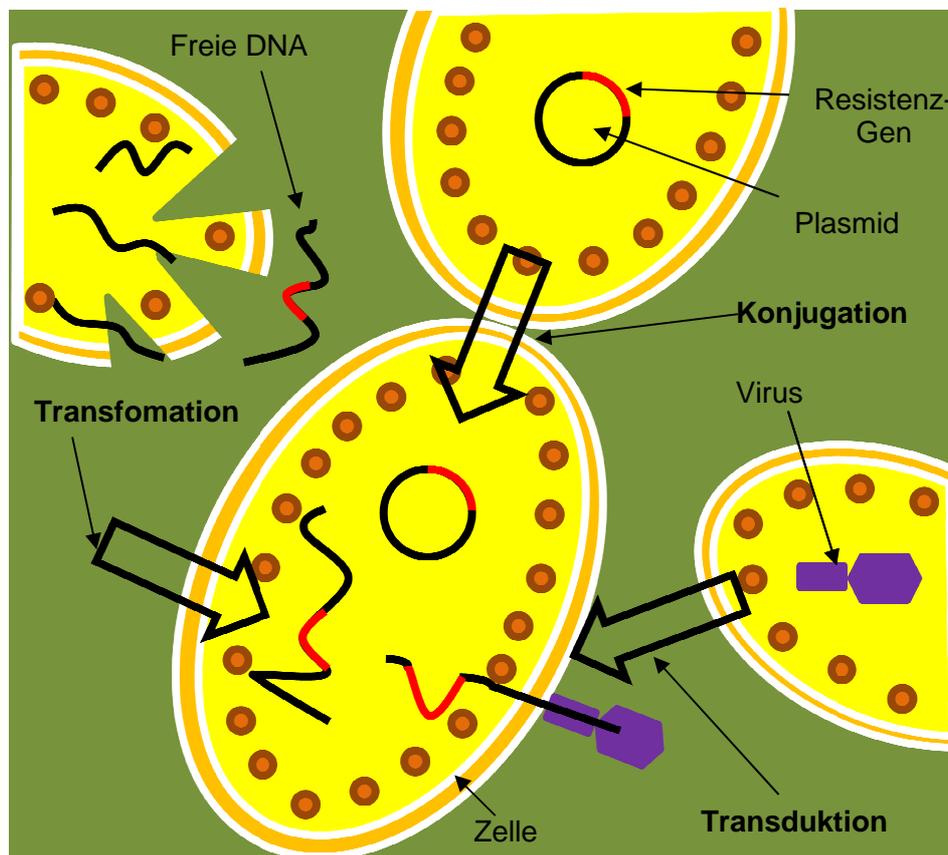


Abb. 8: Schematische Darstellung der Resistenzmechanismen nach [59]

Abb. 8 stellt Resistenzmechanismen grafisch dar. Die Informationen für die Abwehrmechanismen haben Bakterien in ihrer Erbinformation (DNA) auf dem Bakterienchromosom oder auf extrachromosomalen Erbinformationsträgern (Plasmiden) in Form von Genen gespeichert und geben diese an ihre Nachkommen weiter. Diesen Prozess bezeichnet man als „vertikalen Gentransfer“. Plasmide können auch zwischen verschiedenen nicht verwandten Bakterien ausgetauscht werden. Dieser Vorgang, bei dem

Plasmide von Bakterien unterschiedlicher taxonomischer Zugehörigkeit ausgetauscht werden, wird „horizontaler Gentransfer“ genannt. Der Prozess wird als **Konjugation** bezeichnet. Der Gentransfer birgt das Risiko, dass bestehende, auf Plasmiden gespeicherte Antibiotikaresistenzen von nicht krankheitserregenden auf krankheitserregende Bakterien übertragen werden. Patienten, die sich mit diesen resistenten Keimen infiziert haben, können mit diesem Antibiotikum nicht mehr erfolgreich therapiert werden. Eine weitere Eigenschaft der Plasmide ist, dass auf ihnen Informationen für die Resistenz gegenüber verschiedene Antibiotika gespeichert sein können. Dadurch kann ein Bakterium gegen eine große Anzahl mehrerer Antibiotika oder verschiedene Antibiotikagruppen (Kreuzresistenz) gleichzeitig resistent, also multiresistent, werden.

Neben der Konjugation ist die **Transduktion** eine weitere Möglichkeit für horizontalen Gentransfer. Dabei werden Gene durch Phagen (Viren, die Bakterien befallen) von einer Bakterienzelle auf die andere übertragen. Eine dritte Möglichkeit des horizontalen Gentransfers ist die **Transformation**. Bei diesem Transfer wird DNA mit der Information für Antibiotikaresistenz direkt von den Bakterien aufgenommen [57, 60].

Humanmedizinisch bedeutend ist ein Austausch von Resistenzgenen zwischen harmlosen Bakterien (Kommensalen), wie z.B. Enterokokken und pathogenen Bakterien. Die Behandlung von Infektionen wird damit durch die erworbene Antibiotikaresistenz erschwert [55]. Abb. 9 zeigt die Prävalenz (Krankheitshäufigkeit) durch *Methicillin resistente Staphylococcus aureus* (MRSA) Bakterien von 1976 bis 2004. Ab 1995 ist eine sprunghafte prozentuale Zunahme an resistenten Bakterien zu verzeichnen. Die Daten wurden innerhalb einer PEG-Studie (Paul-Ehrlich-Gesellschaft) ermittelt und im GERMAP veröffentlicht [52].

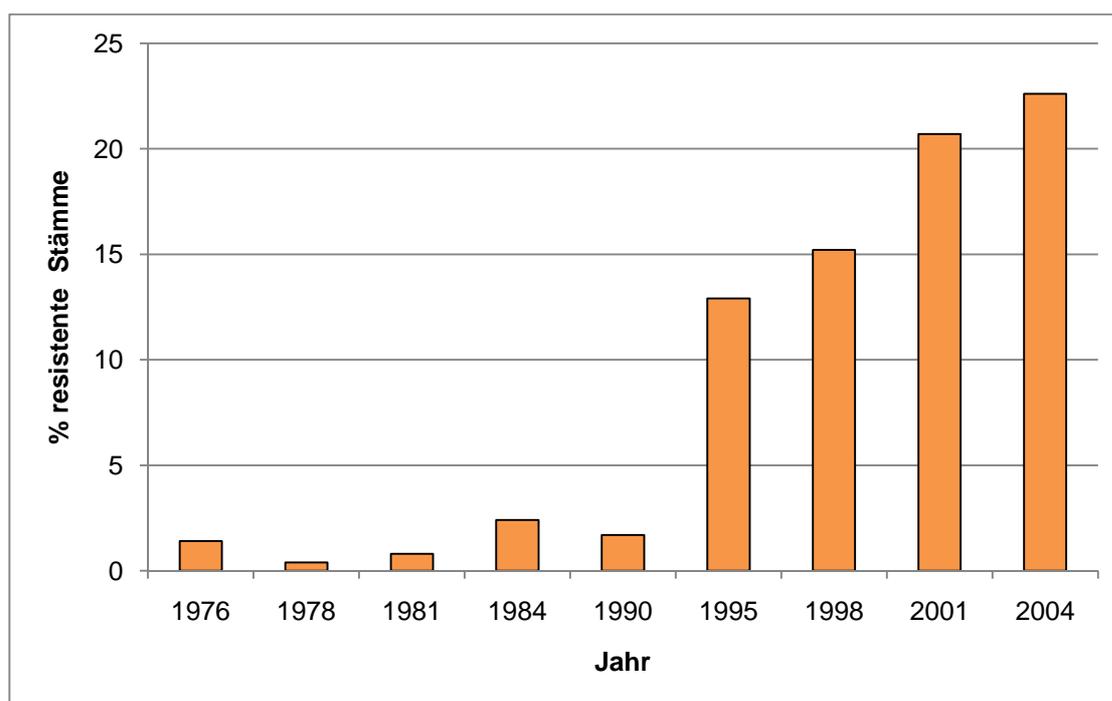


Abb. 9: Prävalenz (Krankheitshäufigkeit) durch MRSA Bakterien im Zeitraum von 1976 bis 2004 [52]

Risikobewertung der Antibiotikarückstände in Honig

Das Risiko für den Verbraucher durch die Aufnahme von Antibiotikarückständen in Honig wird zurzeit durch das Bundesinstitut für Risikobewertung als gering eingestuft [13,14]. Allerdings werden für Lebensmittel (Fleisch, Fisch, Eier, Honig) die mit Chloramphenicol, Nitrofuranen oder Malachitgrün belastet sind, mögliche Gesundheitsrisiken generell nicht ausgeschlossen. Die Mehrheit der detektierten Gehalte von Antibiotikarückständen liegt deutlich unterhalb der berechneten ADI-Werten. Doch geringe Konzentrationen können unter anderem für allergische Reaktionen verantwortlich sein. Das eigentliche Problem ist und bleibt hingegen die fortschreitende Bildung von Antibiotikaresistenzen.

Die Resistenzbildung kann in der Apikultur dazu führen, dass die eingesetzten Antibiotika ihre Wirkung verlieren und somit ganze Tierbestände an bakteriellen Infektionen sterben. Eine resistente Form der Amerikanischen Faulbrut (*Paenibacillus larvae*) kann den Imkern erheblichen wirtschaftlichen Schaden zufügen.

Zwischenfazit

Zu den Haupteintragungswegen von Antibiotikarückständen in Honig zählen die Landwirtschaft und vor allem der therapeutische Einsatz in der Imkerei. Jeglicher Einsatz von Antibiotika, sei es in der Human- oder Veterinärmedizin kann zur Entwicklung von Antibiotikaresistenzen führen. Das Risiko steigt besonders durch ungezielten Wirkstoffeinsatz, zu niedriger (subtherapeutischer) Dosierung und zu langer Applikation von Antibiotika. Zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen gibt es aber neben dem Antibiotikaeinsatz keine weiteren effektiven Therapien. Um eine Resistenzbildung zu minimieren, muss in jedem Einzelfall geklärt werden, welches Antibiotikum der Wirkstoff der Wahl ist. Bei nachgewiesenen Erregern gilt die Regel: „so schmal wie möglich und so breit wie möglich“. Das heißt, man sollte möglichst von der Vielfalt der vorhandenen antibiotisch wirksamen Pharmaka Gebrauch machen und diese individuell auswählen [61,62].

Um die Risiken für den Verbraucher so gering wie möglich zu halten, hat die deutsche und europäische Gesetzgebung Richtlinien verabschiedet, die die Qualität der Lebensmittel gewährleisten sollen. Unter anderem ist in diesen Richtlinien die Rückstandsanalytik von Antibiotika in Honig aufgeführt. Der Hersteller von Honig ist verpflichtet, die Rohwaren auf mögliche Rückstände hin zu untersuchen. Viele der Wirkstoffe sind zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen der Bienen in der EU und der Schweiz verboten. In Latein- und Mittelamerika, Osteuropa sowie Asien werden einige der Substanzen weiterhin verwendet, was zu Rückständen im Rohhonig führen kann [63].

In den folgenden Kapiteln werden Eigenschaften, Strukturen und Einsatzgebiete wichtiger Antibiotikastanzklassen beschrieben. Die Kriterien für die Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit (sowie ihre Reihenfolge) bilden die Anwendungsmengen der eingesetzten Mengen in der Veterinärmedizin und die Anzahl der Positivbefunde im Rahmen des NRK (siehe Tab. 1 und 6):

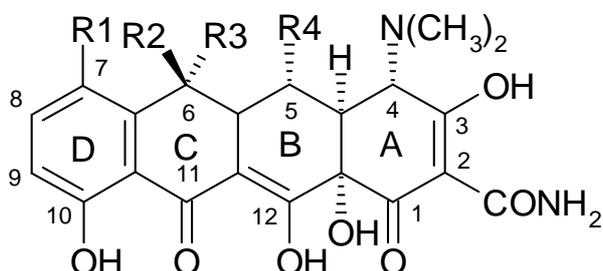
- Tetracycline
- Sulfonamide und Trimethoprim
- Chloramphenicol
- Nitrofurane
- Aminoglykoside
- Makrolide
- Fluorchinolone
- Lincosamide

Diese Auflistung bildet die Basis für die Analyt-Auswahl bei der Entwicklung des Screening-Programmes zur Ermittlung von Antibiotikarückständen in Honig.

5 Basiseigenschaften der Antibiotika

5.1 Tetracycline

Die aus *Streptomyces*-Arten isolierten Tetracycline leiteten wegen ihres breiten antibakteriellen Wirkungsspektrums nach ihrer ersten Entdeckung ab 1948 eine neue Ära der antibiotischen Therapie ein. Die Tetracycline leiten sich von einem partiell oxidierten und hydrierten Naphthacen-Grundgerüst ab. Der Wirkmechanismus der Tetracycline umfasst die Hemmung der ribosomalen Proteinsynthese der Bakterien. Indem sie an der Untereinheit die Anlagerung des Aminoacyl-t-RNA-Komplexes blockieren, hemmen sie die Ketten-Elongation und wirken somit bakteriostatisch. Das Wirkungsspektrum umfasst Infektionen, hervorgerufen von zahlreichen Gram-positiven und Gram-negativen Keimen. Die Tetracycline unterscheiden sich durch Substituenten an den C-Atomen 5,6 und 7, während die übrige Struktur unverändert bleibt (vgl. Abb. 10). Tetracycline sind amphotere Verbindungen. Durch die funktionellen Gruppen an C(10) bis C(12) und C(1) bis C(3) wird die Bildung von Chelaten mit zweiwertigen Kationen bestimmt; hinzu kommt die sekundäre Amino-Gruppe am C(4) [64].



Name	R1	R2	R3	R4
Chlortetracyclin	-Cl	-CH ₃	-OH	-H
*Demeclocyclin	-Cl	-H	-OH	-H
Doxycyclin	-H	-CH ₃	-OH	-OH
Methacyclin	-H	=CH ₂	-	-OH
Oxytetracyclin	-H	-CH ₃	-OH	-OH
Tetracyclin	-H	-CH ₃	-OH	-H

Abb. 10: Allgemeine Molekülstruktur der Tetracycline und Beispiele von Wirkstoffen (*Demeclocyclin ist als Wirkstoff nicht zugelassen) [65,66]

Die Säure-Base-Eigenschaften der Tetracycline resultieren aus der Struktur einer vinylogenen Carbonsäure mit einem pK_a -Wert von 3,3 bis 3,4 für C(3)-OH, der enolischen OH-Gruppe an

C(12), die einer „Phenoldiketon“-Struktur angehört mit einem pK_a -Wert von 7,5 bis 7,7 und aus der Dimethylaminostruktur an C(4) mit einem pK_a -Wert von 9,3 [64,67,68].

Die ausgeprägten komplexierenden Eigenschaften der Tetracycline führen mit 2- und 3-wertigen Metallionen zur Bildung schwer löslicher und weitgehend antibiotisch unwirksamer Chelate [69,70]. In Abb. 11 ist ein Chelatkomplex mit Calcium dargestellt.

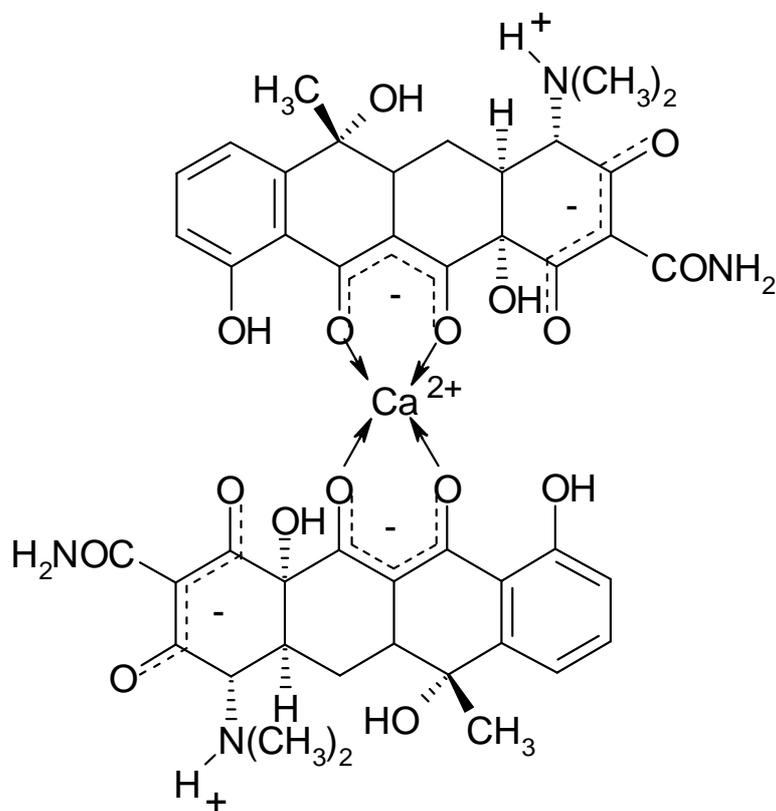


Abb. 11: Tetracyclinkomplex mit Ca^{2+} [70]

Die Eigenschaft der Tetracycline, mit Erdalkaliionen fluoreszenzaktive Chelatkomplexe zu bilden, wird auch analytisch genutzt. Es wurden eine Reihe von chromatographischen Verfahren mit Fluoreszenzdetektion entwickelt [71,72].

Neben der erwähnten Eigenschaft der Chelatisierung können die Tetracycline in gelöstem Zustand abhängig von äußeren Einflüssen, wie zum Beispiel Lösungsmittel, Temperatur, pH-Wert, Lichteinwirkung u.a., Isomere, Epimere, Tautomere und zahlreiche Abbauprodukte bilden. In Abb. 12 sind einige der möglichen Umwandlungs- und Abbauprodukte am Beispiel des Chlortetracyclins aufgeführt [73-80]. Entsprechend der Isomerisierung von Chlortetracyclin zu Iso-CTC wandelt sich das Oxytetracyclin in α -Apo- bzw. β -Apo-Oxytetracyclin um (vgl. Abb. 13). Die Umwandlung bzw. der Abbau der Tetracycline hat einen Einfluss auf die antibiotische Wirksamkeit. Die Isomere (z.B. Isochlortetracyclin) und Epimere (z.B. epi-Tetracyclin) besitzen keine oder nur geringe Aktivitäten und die Anhydroformen (z.B. Anhydrochlortetracyclin) wirken zudem toxisch.

5.2 Sulfonamide und Trimethoprim

Im Jahr 1932 entdeckte Domagk die antibakterielle Aktivität von Sulfachrysoidin (Prontosil). Die Wirksamkeit beruht auf der durch Biotransformation entstehenden Sulfanilamidstruktur. In Abb. 14 ist die Spaltung des Prodrugs (inaktiver oder wenig aktiver Stoff, der nach Metabolisierung zum aktiven Wirkstoff überführt wird) Sulfachrysoidin durch Azoreduktasen dargestellt.

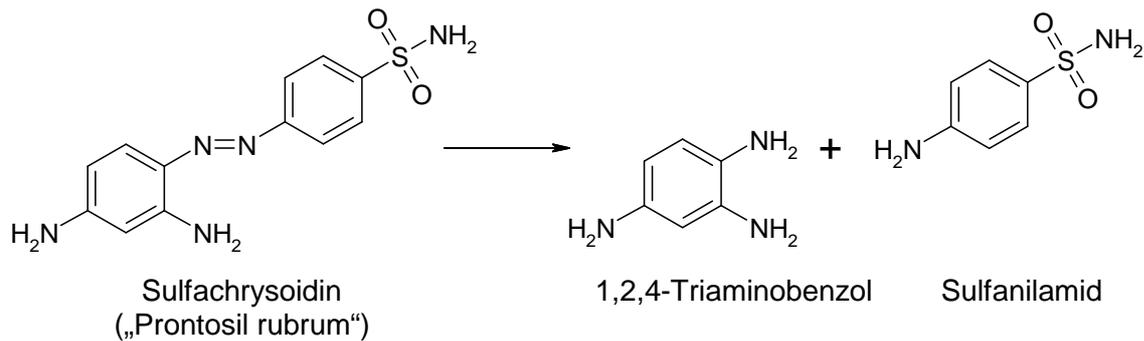


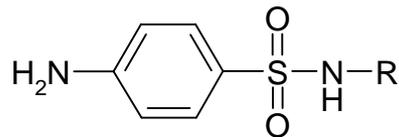
Abb. 14: Enzymatischer Abbau von Sulfachrysoidin [64]

Seit der Entdeckung wurde eine große Anzahl an Sulfonamidderivaten mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften hergestellt und in die Therapie eingeführt. Man unterscheidet drei strukturell unterschiedliche Wirkstoffklassen:

- Sulfanilamid-Derivate mit nicht cyclischen Strukturkomponenten
- Sulfanilamid-Derivate mit Fünfring-Heterocyclen
- Sulfanilamid-Derivate mit Sechsring-Heterocyclen

Die Sulfonamide stellen Antagonisten der p-Aminobenzoessäure dar, die bei der bakteriellen Folsäure-Synthese mit Hydroxymethyl-dihydropteridin zur Dihydropteroinsäure verknüpft wird. In Tab. 7 sind für unterschiedliche Sulfonamide Molekülstrukturen abgebildet.

Tab. 7: Molekülstrukturen der Sulfonamide



Sulfonamid	R	Sulfonamid	R
Sulfanilamid	-H	Sulfamethizol	
Sulfaguanidin	*	Sulfadimidin (Sulfamethazin)	
Sulfadiazin		Sulfamethoxypyridazin	
Sulfamethoxazol		Sulfachloropyridazin	
Sulfathiazol		Sulfadimethoxin	
Sulfamerazin		Sulfadoxin	
Sulfapyridin		Sulfameter	

(* ersetzt den Rest -NH-R)

Häufig werden Sulfonamide in Kombination mit Trimethoprim angewendet (vgl. Abb. 15). Der Einsatz der Sulfonamide als Monosubstanz hat u.a. dazu geführt, dass Bakterien Resistenzen ausgebildet haben. Der duale Einsatz von Kombinationspräparaten wie Cotrimoxazol – eine Kombination von Sulfamethoxazol und Trimethoprim im Verhältnis 5:1 – senkt das Risiko der Resistenzbildung und hat zudem noch einen höheren therapeutischen Effekt. Im Gegensatz zur jeweiligen Monotherapie kommt es zu einem bakteriziden Effekt. Durch die inhibitorische Wirkung des Trimethoprim auf die bakterielle Dihydrofolat-Reduktase und die zusätzliche Hemmung der Dihydropteroinsäure-Synthese durch die Sulfonamid-Komponente wird ein „Sequentiell-Effekt“ erreicht [64,67,68].

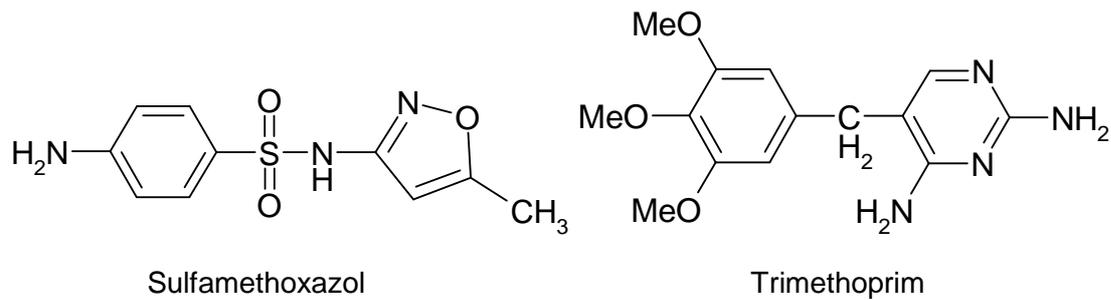


Abb. 15: Cotrimoxazol: Sulfamethoxazol und Trimethoprim (5:1)

Trimethoprim ist ein Diaminopyrimidin-Derivat aus der Reihe der Dihydrofolatreduktase-Inhibitoren. Es besitzt eine hydrophobe aromatische Partialstruktur und zusätzlich eine cyclische Guanidin-Struktur im 2,4-Diaminopyrimidin-Teil des Moleküls. Trimethoprim greift ebenfalls in den Mechanismus der bakteriellen Folsäuresynthese ein, jedoch an einem anderen Wirkort wie die Sulfonamide (vgl. Abb. 17). Die Dihydrofolsäure (3) muss, bevor sie zu einem aktiven Coenzym des C1-Stoffwechsels werden kann, weiter zur Tetrahydrofolsäure (4) reduziert werden. Dazu ist ein Enzym notwendig, welches durch Trimethoprim gehemmt wird. Die Sulfonamide hemmen die Synthese der Ausgangsverbindung für die Folsäuresynthese, also bevor Trimethoprim als Inhibitor wirkt. Die Reaktionsabfolge bei der inhibitorischen Wirkung der Sulfonamide und des Trimethoprim ist in Abb. 16 schematisch dargestellt.

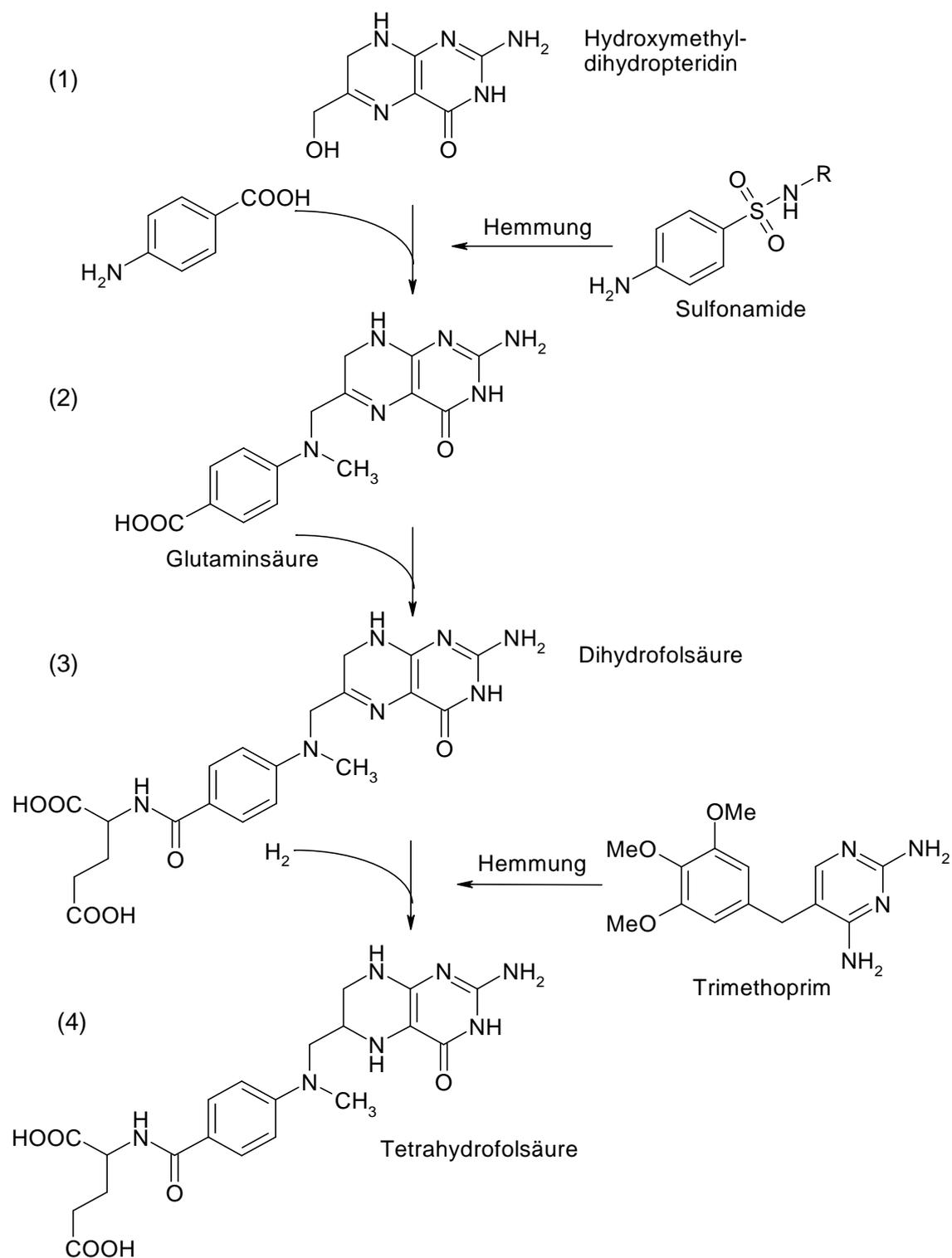


Abb. 16: Reaktionsabfolge bei der Hemmung des Folsäurestoffwechsels durch Sulfonamide und Trimethoprim [64]

5.3 Chloramphenicol

1947 wurde Chloramphenicol erstmals aus Kulturen von *Streptomyces venezuelae* gewonnen. Das heutzutage erhältliche Chloramphenicol wird dagegen synthetisch hergestellt und spielt nur noch im veterinärmedizinischen Bereich eine Rolle nachdem festgestellt wurde, dass es ein vergleichsweise hohes Risiko für schwerwiegende Blutbildveränderungen wie aplastische Anämie in der humanmedizinischen Therapie von bakteriellen Infektionen mit sich bringt [64,67,68]

Als Phenylpropan-Derivat enthält es die Grundstruktur von Phenylalanin, allerdings substituiert durch zwei funktionelle Gruppen, die in Naturstoffen nur selten vorkommen. Es enthält eine aromatische Nitro-Gruppe und einen Dichloracetyl-Rest (vgl. Abb. 17).

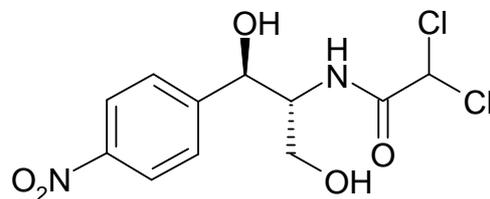


Abb. 17: Molekülstruktur des Chloramphenicol

Chloramphenicol besitzt das gleiche Kohlenstoff-Gerüst wie das Alkaloid Ephedrin und die Aminosäure Phenylalanin, die als spezifischer Antagonist für die wachstumshemmende Wirkung auf einige Bakterienstämme erkannt wurde. Chloramphenicol verfügt wie Ephedrin über zwei benachbarte Chiralitätszentren. Von den möglichen Diastereomeren ist nur die D-threo-Form antibakteriell wirksam. Die Konfiguration von Chloramphenicol ist 1R, 2R (vgl. Abb. 18).

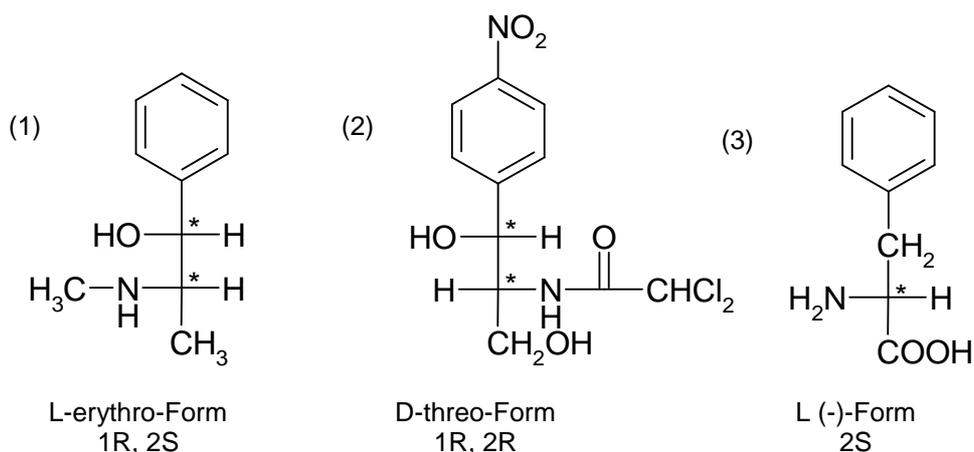


Abb. 18: Fischer-Projektionen von Ephedrin (1), Chloramphenicol (2) und Phenylalanin (3)

Chloramphenicol wirkt bakteriostatisch über eine Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese bei der Translation. Angriffsort ist die ribosomale 50 S-Untereinheit [64,67,68].

5.4 Nitrofurane

Nitrofurane gehören zu den synthetisch hergestellten Chemotherapeutika. Sie sind seit 1995 in der Europäischen Union zur veterinärmedizinischen Applikation verboten, da sie unter Verdacht stehen, ein erhöhtes Krebsrisiko bei Langzeitanwendung hervorzurufen. Die Nitrofurane metabolisieren *in vivo* sehr rasch zu Protein gebundenen Reaktionsprodukten, die auch mehrere Wochen nach Verabreichung persistieren [81-84]. Aus diesem Grund werden zur analytischen Bestimmung die Nitrofurane unter milden sauren Bedingungen in die freien Produkte überführt, mit 2-Nitrobenzaldehyd derivatisiert und dann chromatographiert. In Abb. 19 sind die Molekülstrukturen der Nitrofurane und der freien Komponenten aufgeführt.

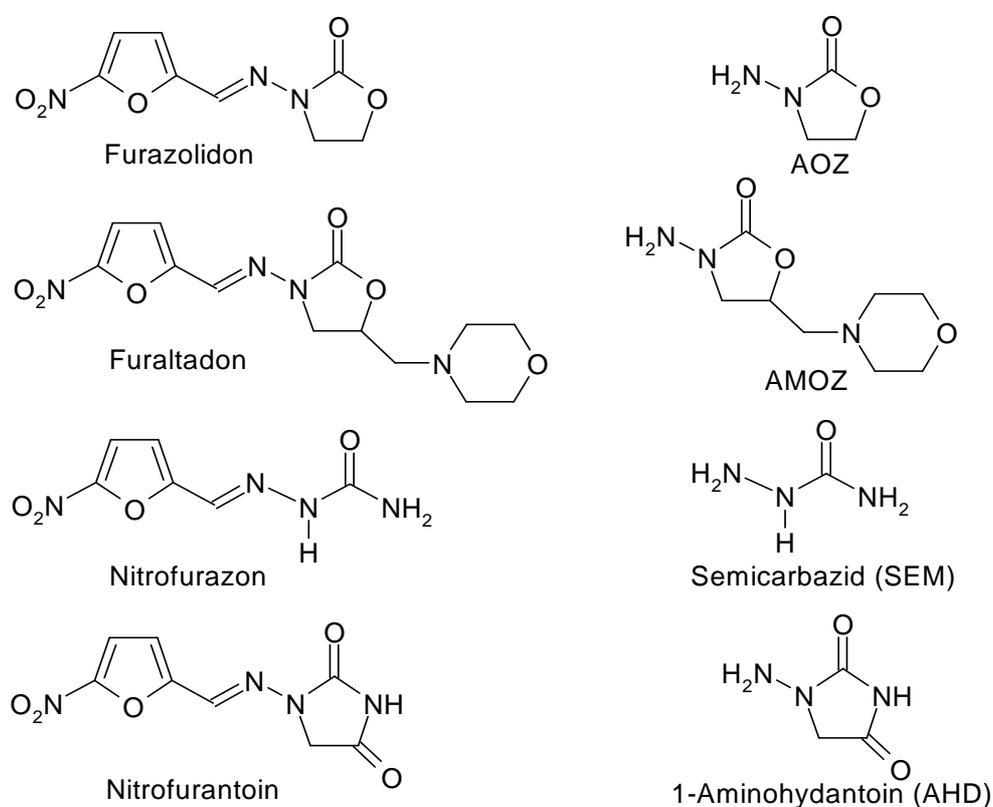
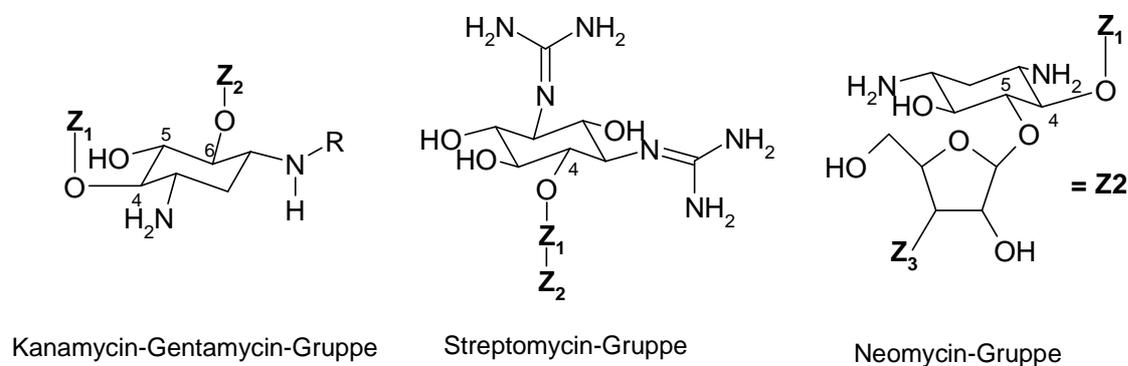


Abb. 19: Molekülstrukturen der Nitrofurane und der freien Metabolite

Die Nitrofuranmetabolite besitzen alle eine niedrige relative Molekülmasse zwischen 75 g/mol (SEM) und 201 g/mol (AMOZ). Die LC-MS Analyse dieser niedermolekularen Spezies führt zu einer relativ geringen Empfindlichkeit aufgrund ihrer schlechten Ionisierbarkeit und ihrem unspezifischen Fragmentierungsverhalten im Massenspektrometer (siehe Kap. 8.2.4).

5.5 Aminoglykoside

Alle Aminoglykosid-Antibiotika verfügen über ein basisch substituiertes vom Cyclohexan abgeleitetes Mesoinosit-verwandtes Aglykon, ein so genanntes Cyclit. Ein Aglykon bezeichnet eine von einem Glykosid abgeleitete Verbindung ohne den entsprechenden Zuckerrest. Mit diesem Cyclit sind an unterschiedlichen Positionen Monosaccharide und Disaccharide glykosidisch verknüpft. Die Grundstrukturen der Aminoglykoside sind in Abb. 21 dargestellt. Je nach Aglykon (Cyclit), den glykosidierten Positionen und den beteiligten Aminozuckern unterscheidet man drei Gruppen von Aminoglykosid-Antibiotika (vgl. Abb. 20) [64].



Name	Aglykon	Position der Aglykon-Zucker-Bindung	Zucker (Monosaccharide)
Kanamycin-Gentamycin-Gruppe	Desoxy-streptamin	4 6	Z1
Streptomycin-Gruppe	Streptidin	4	Z2
Neomycin-Gruppe	Desoxy-streptamin	4 5	Z1 und Z2 Z2 und Z3

Abb. 20: Grundstruktur der Aminoglykoside: Gentamycin- Kanamycin-, Neomycin- und Streptomycin-Gruppe [64]

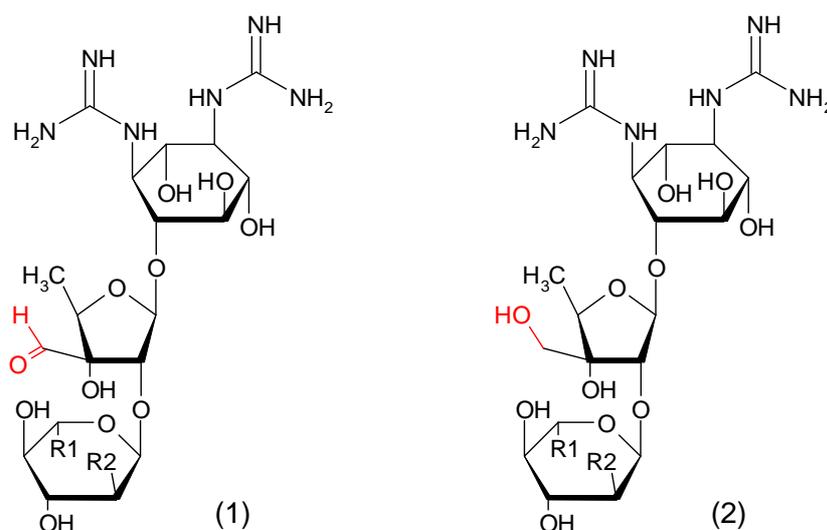
Aus den Suffixen mycin und micin lassen sich Rückschlüsse auf die Herkunft ziehen. Die von *Streptomyces*-Arten gewonnenen Verbindungen werden mit einem **y**, die aus Kulturlösungen von *Micromonospora*-Arten oder anderen Bodenbakterien isolierten und halbsynthetischen Verbindungen mit einem **i** gekennzeichnet bzw. Enden mit cin ohne y (z.B. Amikacin). Die strukturelle Verwandtschaft der Aglyka untereinander und mit Mesoinosit ist aus der Tab. 8 zu ersehen.

Tab. 8: Übersicht der Aglyka und struktureller Vergleich mit Mesoinosit

	<i>Mesoinosit</i>	Anzahl OH-Gruppen: 6 Axial: 1 Äquatorial: 5
	Streptidin	Anzahl OH-Gruppen: 4 Guanidino-Gruppen: 2 alle äquatorial
	Desoxy -streptamin	Position 2: OH-Gruppe fehlt
	N,N'-Dimethyl-2- epistreptamin	Position 2: OH-Gruppe axial, alle anderen äquatorial

In der Streptomycin-Gruppe ist die äquatoriale OH-Gruppe in Position 4 des Streptidins mit einem furanoiden Zucker verknüpft, der seinerseits α -glykosidisch einen pyranoiden Aminozucker trägt. Abb. 21 zeigt die Strukturen Streptomycins und des Dihydrostreptomycins. Beide werden als Wirkstoffe eingesetzt.

Durch die mehrfache Substitution mit Amino-Funktionen und durch die Häufung von Hydroxy-Funktionen erhalten die Aminoglykoside ihre charakteristischen Eigenschaften. Sie liegen als Salze, meist als Sulfate vor und sind sehr gut wasserlöslich. Der pK_a -Wert liegt bei 7,5 bis 8 [64].

**Abb. 21:** Molekülstrukturen von Streptomycin (1) und Dihydrostreptomycin (2) (R1 = CH₂OH, R2 = NHCH₃)

Als Hemmstoff der Proteinsynthese mit Angriffspunkt an der 30S-Untereinheit bakterieller Ribosomen gehören Aminoglykoside zum Wirkungstyp der bakteriziden Wirkstoffe. Die Anlagerung an ribosomale Bindungsstellen führt u.a. zu einer Störung der Translationsreaktion, so dass Proteine mit „falscher“ Aminosäure-Sequenz gebildet werden. Eine Störung der bakteriellen Membranfunktion ist die Folge, was zum Austreten von Cytoplasma-Bestandteilen und schließlich zum Absterben der Keime führt. Aminoglykoside besitzen ein breites Wirkungsspektrum. Sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Keime sind empfindlich, wobei ihr Anwendungsschwerpunkt bei Infektionen mit problematischen Gram-negativen Erregern liegt [67,68,85,86].

5.6 Makrolide

Makrolidantibiotika wurden nach ihrem zentralen Strukturelement, einem Lactonmakrocyclus (Abb. 22), an dem ein bis zwei Zuckermoleküle addiert sind, benannt. Es handelt sich um basische Verbindungen, die in drei Klassen – nach ihrer Lacton-Ringgröße - unterteilt werden. Seit 1952 werden Makrolide mit 14, 15 und 16 Atomen im Ring mit unterschiedlich glykosidisch verknüpften Zuckern aus *Streptomyces*-Arten gewonnen. Am Beispiel des Erythromycins, dem bekanntesten Vertreter der Makrolide, werden im Folgenden die Strukturelemente genauer betrachtet. In Abbildung 22 ist die allgemeine Struktur dargestellt. Erythromycin besteht aus einem 14-gliedrigen Lacton-Ring (Erythronolid) mit einer Keto-Funktion an C(10), zwei glykosidisch über C(4) bzw. C(6) mit dem Erythronolid verknüpften Zucker, OH-Gruppen an C(7), C(12), C(13) und den aus dem Biosynthese-Baustein Propionsäure resultierenden Methylgruppen. Bei den Zuckern handelt es sich im Falle des Erythromycins um eine α -glykosidisch verknüpfte Cladinose an C(4) und einen β -glykosidisch an C(6) verknüpften Aminozucker Desosamin [64,67,68].

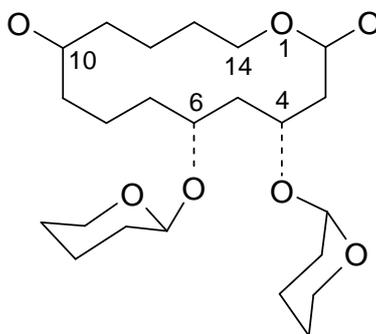


Abb. 22: Molekülgrundstruktur von Erythromycin [64]

Tab. 9 gibt Informationen über die Ringgröße der Makrolide sowie die gebundenen Amino- und Neutralzuckermoleküle am Grundgerüst des jeweiligen Lactonringes.

Tab. 9: Makrolide: Charakteristische Strukturmerkmale

Makrolid-Antibiotikum	Ringgröße (Anzahl der Ringglieder)	Aminozucker (Position am Lacton-Ring vgl. Abb. 22)	Neutralzucker (Position am Lacton bzw. Aminozucker*)
Erythromycin	14	Desosamin (6)	Cladinose (4)
Oleandomycin	14	Desosamin (6)	L-Oleandrose (4)
Rosaramicin	16	Desosamin (6)	-
Carbomycin	16	Mycamimose (6)	Mycarose (4')
Leucomycin	16	Mycamimose (6)	Mycarose (4')
Spiramycin	16	Mycamimose (6) Forosamin (10)	Mycarose (4')

* Positionskennzeichnung: ohne Strich: am Lacton-Ring
mit Strich: am Aminozucker

Beispielhaft sind die Molekülstrukturen für Tylosin A und Erythromycin A in Abb. 23 a und b dargestellt.

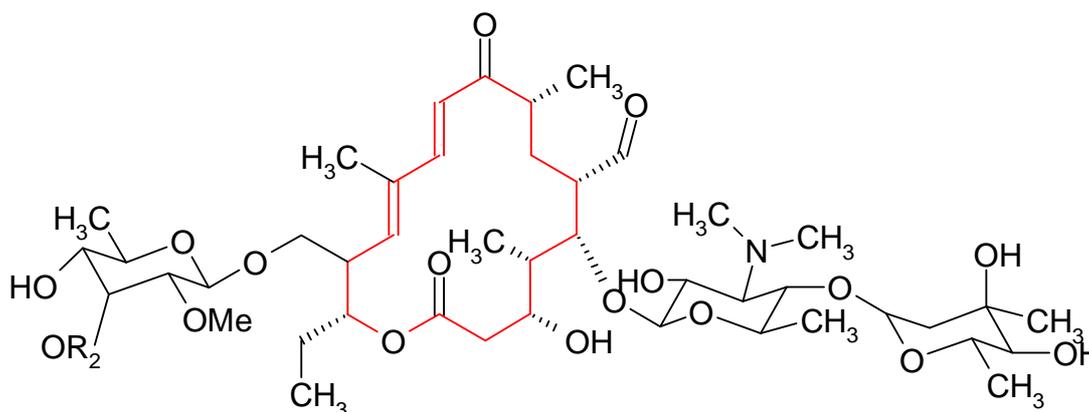


Abb. 23 a: Molekülstruktur von Tylosin A (16-gliedriger Lacton-Ring; rot markiert)

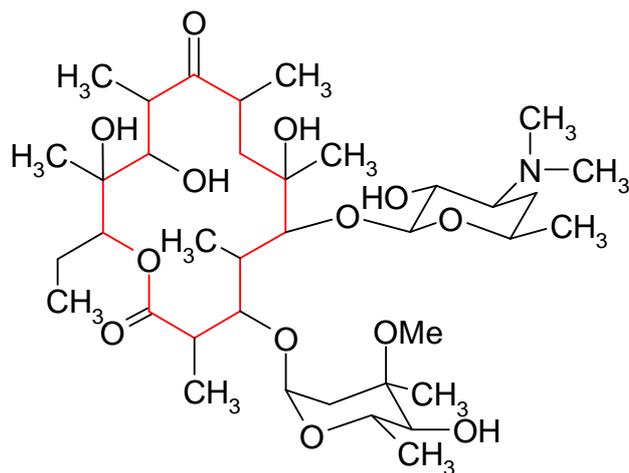


Abb. 23 b: Molekülstruktur von Erythromycin A (14-gliedriger Lacton-Ring; rot markiert)

5.7 Fluorchinolone

Die Fluorchinolone bilden eine Untergruppe der Chinolone, die zu den gyrasehemmenden Antibiotika gehören. Seit 1962 wird die 4-Naphthyridoncarbonsäure Nalidixinsäure (Abb. 24) sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin therapeutisch angewendet. Durch Strukturmodifikationen, vor allem durch Einführung cyclischer basischer und Fluor-haltiger Ringsysteme, wurde eine breitere antibakterielle Wirksamkeit erreicht. Man spricht in diesem Zusammenhang von Chinolonen der ersten und der zweiten Generation. Bedingt durch eine Carbonsäurefunktion ($pK_s \approx 5$) und eine oder mehrere funktionelle Aminogruppen ($pK_s \approx 8-9$) besitzen die Fluorchinolone amphotere bzw. zwitterionische Eigenschaften [64,67,68]. In der Veterinärmedizin werden Fluorchinolone bereits seit Ende der 80er-Jahre verwendet. Der Einsatz zur Prophylaxe ist jedoch verboten. Vor allem in der Geflügelzucht ist das Antibiotikum weit verbreitet. Laut BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) sind 40 Prozent der in Geflügel und Geflügelprodukten gefundenen *Camphylobacter*-Keime resistent gegen Fluorchinolone [87].

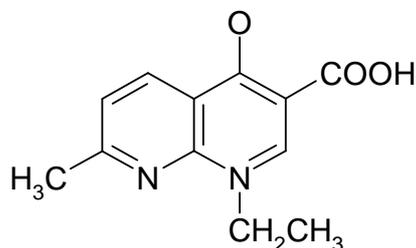


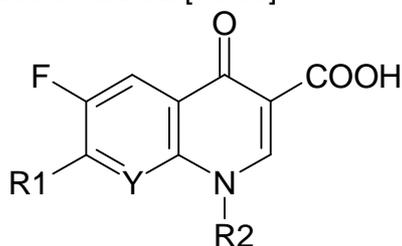
Abb. 24: Molekülstruktur der Nalidixinsäure

In der folgenden Tabelle sind einige Vertreter der Fluorchinolone dargestellt. In der Imkerei ist jeglicher Einsatz der Fluorchinolone verboten. In der Humanmedizin und in der Veterinärmedizin werden die Fluorchinolone bei verschiedenen Indikationen eingesetzt. Von der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie wurden die Fluorchinolone nach

Anwendungsmöglichkeit und Wirksamkeit (Gruppe IV > Gruppe I) in vier verschiedene Gruppen (in Klammern ist jeweils ein Beispiel genannt) unterteilt [88-90].

- Gruppe I: Orale Fluorchinolone mit Indikation Harnwegsinfektion (Norfloxacin)
- Gruppe II: Systemisch anwendbare Fluorchinolone mit breiter Indikation (Ciprofloxacin)
- Gruppe III: Fluorchinolone mit verbesserter Wirksamkeit gegen Gram-positive und atypische Erreger (Sparfloxacin)
- Gruppe IV: Fluorchinolone mit verbesserter Wirksamkeit gegen Gram-positive und atypische Erreger sowie gegen Anaerobier (Moxifloxacin)

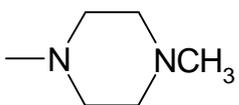
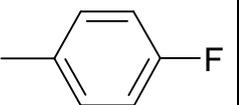
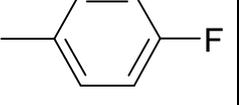
Tab. 10: Molekülstrukturen ausgewählter Fluorchinolone (Bi- (a) und Tricyclen (b)); Gruppeneinteilung basierend auf [88-90]

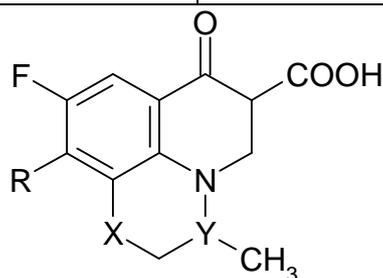


a)

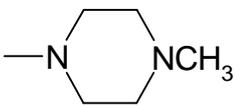
Name (Gruppe)	R1	R2	Y
Norfloxacin (I)		-CH ₂ CH ₃	-CH-
Enoxacin (II)		-CH ₂ CH ₃	-N-
Danofloxacin			-CH-
Enrofloxacin			-CH-
Ciprofloxacin (II)			-CH-

Fortsetzung der Tab. 10

Dilfoxacin			-CH-
Sarafloxacin			-CH-



b)

Name (Gruppe)	R	X	Y
Flumequin	-H	-CH-	-CH-
Marbofloxacin		-O-	-N-
Ofloxacin (II)		-O-	-CH-

Der Angriffspunkt dieses Wirkstofftyps ist die bakterielle DNA-Synthese, deren Hemmung durch eine Interferenz der Fluorchinolone mit der DNA-Gyrase erfolgt. Diese Topoisomerase ist verantwortlich für die Superspiralisierung („supercoiling“) der DNA-Doppelhelix, ohne die das Makromolekül in der Bakterienzelle keinen Platz finden würde. Die Gyrase ist außerdem in der Lage, zwei verflochtene ringförmige DNA-Stränge zu öffnen und wieder zu schließen. Sie ist essentiell für die Replikation und Transkription der DNA [64,67,68].

5.8 Lincosamide

Zu den Lincosamiden gehören die Acylaminopyranoside Lincomycin und Clindamycin. Das Antibiotikum Lincomycin wird aus Kulturen von *Streptomyces lincolnensis* gewonnen. Lincomycin (Abb. 25) basiert auf der Struktur von Lincosamin (Struktureinheit in Abb. 25 markiert), einem C8-Aminozucker mit einer Thioacetal-Struktur, der peptidartig mit einem Prolin-Derivat verknüpft ist, welches in 4'-Position eine trans-ständige Propyl-Gruppe trägt. Durch partialsynthetische Abwandlung erhält man bei der Chlorierung von Lincomycin unter Konfigurationsumkehr an C(7) Clindamycin. Beim Austausch der OH-Gruppe in Position 7 gegen Chlor unter Erhalt der Konfiguration im Falle des Lincomycin kann die antibiotische Wirkung um das Zweifache gesteigert werden. Beim Austausch unter Inversion der Konfiguration, wie beim Clindamycin auftritt, kann eine fünffache Wirkungssteigerung erzielt werden. In Abb. 25 sind die Molekülstrukturen dieser Lincosamide wiedergegeben.

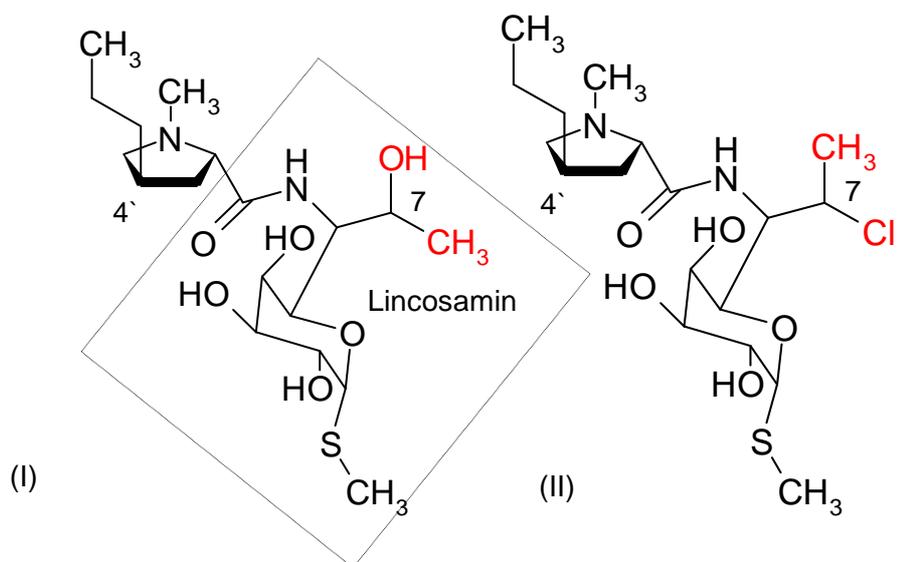


Abb. 25: Molekülstrukturen von Lincomycin (I, 7R) und Clindamycin (II, 7S)

Durch die Chlor-Substitution ist Clindamycin lipophiler als Lincomycin. Dadurch lässt sich die erhöhte in vitro-Aktivität erklären, da Clindamycin über ein besseres Penetrationsvermögen für bakterielle Membranen verfügt. Lincomycin und Clindamycin interferieren bei der bakteriellen Proteinsynthese und greifen an den 50 S-Ribosomen an. Beide Verbindungen werden vorwiegend gegen Gram-positive Keime wirksam [64,67,68].

5.9 Zusammenfassung

Antibiotika werden sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin zur Bekämpfung bakterieller Infektionen verwendet. Der übermäßige und z.B. unsachgemäße Einsatz hat zu einer Forcierung der Resistenzproblematik in den letzten Jahren geführt. Die nationale und europäische Gesetzgebung hat für einen Teil der Wirkstoffe Mindestleistungs- bzw. Höchstgrenzen in Lebensmitteln tierischer Herkunft festgesetzt. Um das breite Spektrum der unterschiedlichen Antibiotikawirkstoffklassen, die ihre Anwendung in der Veterinärmedizin finden, routineanalytisch in der Matrix „Honig“ sicher detektieren und quantifizieren zu können, müssen geeignete Methoden der Probenvorbereitung und Bestimmung entwickelt werden, damit Lebensmittelproduzenten die gesetzlich geforderten Mindestleistungsgrenzen einhalten können. Die methodischen Bedingungen der Probenvorbereitung und die massenspektrometrischen Parameter müssen jeweils auf die chemischen Eigenschaften der nachzuweisenden Analyten optimal abgestimmt werden.

Speziell für Honig ist der Bedarf an leistungsstarken Methoden besonders relevant. Als naturbelassenes Produkt muss Honig frei von jeglichen Antibiotikarückständen sein (vgl. Nulltoleranz Kap. 3) Im Unterschied zu Lebensmitteln tierischer Herkunft sind, vergleichbare Mindestleistungsgrenzen oder maximalen Rückstandshöchstmengen für Honig (z.B. Chloramphenicol 0,3 µg/kg) sehr niedrig. Zudem sind nach jetzigem Stand der Analytik nur wenige Arbeiten - zwei LC-MS Methoden und ein Charmtest - [91-93] bekannt, die das breite Spektrum der Analyten in einem Monitoringsystems erfassen. In den nächsten beiden Kapiteln werden der Stand der Analytik und die Untersuchungsmethodik beschrieben. Es folgen Erläuterungen zu den einzelnen Stufen der Methodenentwicklung (siehe Kap. 8).

6 Stand der Honiganalytik

Nachfolgend werden Methoden der Probenvorbereitung, HPLC- und Detektionstechniken vorgestellt, mit denen Antibiotikarückstände in Honig nachgewiesen werden können. Je nach Analyt müssen verschiedene Extraktionstechniken wie zum Beispiel Fest-Flüssig- oder Festphasenextraktion angewendet werden. Zudem wird der Einsatz von gekoppelten Systemen, Online-SPE-Techniken und Multimethoden diskutiert.

6.1 Wirkstoffgruppen

Tetracycline

LC-MS-Methoden [94-106] und HPLC-UV-Methoden [107-113] sind die gängigsten Analyseverfahren zur Bestimmung von Tetracyclinen in Lebensmitteln und Umweltkompartimenten. Viele Arbeiten in dem Bereich der Tetracyclinanalytik beschäftigen sich analog zu den Sulfonamiden mit dem Nachweis der Rückstände in Lebensmitteln und im landwirtschaftlichen Sektor. Tetracycline können *in vivo* Metabolite und *in vitro* Umwandlungs- und Abbauprodukte bilden. Die Eigenschaft, mit Erdalkalitionen Komplexe einzugehen, wird mit der Fluoreszenzspektrometrie zum Nachweis genutzt [71,72,114-116]. Elektrochemische Methoden [117,118] und die HPLC-UV-MS-Analytik verwendet man, um das Umwandlungs- und Abbauverhalten der Tetracycline näher bestimmen zu können. Die Komplexbildung der Tetracycline wurde in einer Reihe von wissenschaftlichen Arbeiten genauer untersucht [69,70,119-124].

Als Screening-Verfahren wurden für die Bestimmung von Tetracyclinen in Eiern und Honig ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)-Schnelltests [95,125] entwickelt. Bis zu acht verschiedene Tetracycline in Honig wurden hauptsächlich mit LC-MS Verfahren bestimmt [71,95,96,99,123]. Die Extraktion erfolgt mit Festphasenkartuschen nach Lösen des Honigs in Pufferlösungen.

Sulfonamide und Trimethoprim

Für ein breites Spektrum an unterschiedlichsten Matrices (Fleisch, Wasser, Honig,...) wurde allen voran die LC-MS-Kopplung als Analyseverfahren der Wahl für den Nachweis von Sulfonamiden und Trimethoprim verwendet [126-142]. Daneben wurde eine Vielzahl anderer Detektionstechniken und Analyseverfahren zum Nachweis von Sulfonamid- und Trimethoprimrückständen entwickelt. Dazu zählen HPLC-UV [143-146], GC-MS [147], elektrochemische Methoden [148,149], die Dünnschichtchromatographie [150], HPLC mit

Fluoreszenzdetektion [151], ELISA [152] und die Isotopenverdünnungsanalyse [153]. Je nach Probenart unterscheidet sich die Extraktionstechnik. Bei Fleischproben wird eine Proteinfällung vor der eigentlichen Extraktion vorgenommen.

Die Analyten in Honigproben werden durch Festphasenextraktion extrahiert, wobei häufig die Oasis-HLB-Phase (Hydrophilic-Lipophilic-Balanced) zum Einsatz kommt [130-132,137,138]. Die Analyseverfahren sind in der Lage, sieben [137] bis zu siebzehn [130] Sulfonamide und Trimethoprim parallel in Honig quantitativ nachzuweisen.

Chloramphenicol

Zum Nachweis von Chloramphenicol werden hauptsächlich HPLC-MS Analysemethoden eingesetzt [63,154-163]. Zusätzlich existieren Methoden, die einen Biosensor [156] zum Nachweis einsetzen, ELISA [164] verwenden oder Molecularly Imprinted Polymers (MIP, Funktionelle Polymere durch Molekulares Prägen) [165,166] benutzen. Eine ganze Reihe von Probenmaterialien wie Eier, Fisch, Schrimps, Honig, Bienenprodukte, Milch, Fleisch usw. werden auf Rückstände von Chloramphenicol hin untersucht. Der Metabolit Chloramphenicol-Glukuronid wird nach enzymatischem Verdau durch Zugabe von β -Glukuronidase zu freiem Chloramphenicol umgesetzt und mittels LC-MS nachgewiesen [161].

Die Extraktion der Analyten aus der Matrix Honig erfolgt häufig durch eine Fest-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat oder Acetonitril. Eine weitere Aufkonzentrierung und Matrixabtrennung kann durch Hinzuschalten eines Online-SPE-Moduls [167] erreicht werden. Die Detektion erfolgt im negativen ESI (Electro Spray Ionization) Modus. Zur Qualitätssicherung wird ein interner Standard verwendet, z.B. ein fünffach deuteriertes Chloramphenicol.

Nitrofuranmetabolite

Die Nitrofurane werden nach Umsetzung mit 2-Nitrobenzaldehyd bevorzugt mit LC-MS-Verfahren nachgewiesen [81,83,168-172]. Eine spezielle Anwendung der LC-MS stellt die Isotopenverdünnungsanalyse dar [173]. Der Nachweis von Nitrofuranmetaboliten kann aber auch durch einen elektrochemischen Detektor [174] oder durch einen ELISA-Schnelltest erfolgen [175]. Einige Analysenverfahren beinhalten zur Detektion einen UV-Detektor [82,83,168,176]. Die untersuchten Matrices umfassen Fleisch, Eier, Geflügel, Milch, Honig usw. Häufig werden die Analyten nach Derivatisierung mit Ethylacetat extrahiert und weiter zur Analyse vorbereitet. Interne Standards, wie deuteriertes AOZ (3-Amino-2-oxazolidon), AMOZ (3-Amino-5-morpholinomethyl-1,3-oxazolidon-2-on) oder isotopenmarkiertes Semicarbazid 1,2-[$^{15}\text{N}_2$, ^{13}C] SEM werden vor der Extraktion zu den Proben dotiert.

Aminoglykoside

Die in der Literatur beschriebenen HPLC-Methoden umfassen die Detektion mit einem Fluoreszenzdetektor nach Derivatisierung der Aminoglykoside [177-180], die Detektion der Lichtstreuung [181,182], die Kapillarelektrophorese [183], den Immunoassay [184] und die massenspektrometrische Detektion [185-192]. Die Analysemethoden zur Detektion von Streptomycin und Dihydrostreptomycin in Honig umfassen Festphasenextraktionen sowie Flüssig-Flüssig-Extraktionen. Die Ionenaenchromatographie und HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) mit anschließender MS-Detektion gehören zu den neuesten Entwicklungen um Rückstände von Aminoglykosiden in Honig nachweisen zu können [192].

Makrolide und Lincosamide

Makrolidantibiotika und Lincosamide werden in unterschiedlichem Probenmaterial durch Kopplungstechniken wie HPLC-MS [193-212] oder HPLC-ECD (Electrochemical Detection) [213,214] detektiert. Zur Trennung von Tylosin, Erythromycin und einiger Abbauprodukte benutzte Tobback et al. [215] die „Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography“ (MECC, micellare elektrokinetische Chromatographie). Zur Identifizierung der Umwandlungs- und Abbauprodukte der Makrolide wurden die HPLC-UV Kopplungstechniken eingesetzt [210-212,216-218]. Zur Vorbereitung der Proben (Eier, Honig, Blutplasma, Milch, Wasser, Urin, usw.) wird die Fest-Flüssig- sowie eine Festphasen-Extraktion benutzt. Speziell zum Nachweis von Makroliden und Lincosamiden in Honig wird oft die Oasis-HLB-Kartusche der Firma Waters verwendet.

Fluorchinolone

Auch im Falle der Substanzgruppe der Fluorchinolone werden die meisten chromatographischen Trennmethoden mit massenspektrometrischen Detektionsmethoden gekoppelt [219-226]. In einigen HPLC-Analysemethoden wird ein UV- [220,227] oder ein Fluoreszenzdetektor [228] zur Rückstandskontrolle verwendet. Weitere Methoden sind die Kapillarelektrophorese [229] oder automatisierte Verfahren zur Detektion [230]. Die Analyten werden über SPE-Kartuschen, durch Fest-Flüssig-Extraktion oder durch PLE (Pressurized Liquid Extraction) extrahiert. Analysiert werden Eier und Geflügelfleisch, aber auch Honig.

6.2 Probenvorbereitung

Online-SPE und Matrixeinfluss

Die Extraktion der Analyten, und damit die Wiederfindung, ist u.a. von den Wechselwirkungen der Antibiotikamoleküle mit der Festphase abhängig. Um zu gewährleisten, dass ein Optimum an Sorption mit der Phase entsteht, ist die Auswahl des pH-Wertes entscheidend, die sich nach den pK_s -Werten der Antibiotikawirkstoffe richtet. Somit wird durch Einstellen eines bestimmten pH-Wertes in Abhängigkeit vom pK_a -Wert des Analyten, dessen Wechselwirkungseigenschaft mit dem Extraktionsmedium gesteuert [231]. Zum Beispiel kann die Flüssig-Flüssig-Extraktion von ionisierbaren Substanzen mit organischen Lösungsmitteln durch die „pH 2 Regel“ optimiert werden [232]. Die Regel besagt, dass ca. 99% der Substanz im ungeladenen Zustand vorliegt, wenn der pH-Wert der wässrigen Lösung um 2 Werte unterhalb des pK_s -Wertes der Substanz liegt.

Um die Analytik der Antibiotikarückstände in Honig effizienter zu gestalten, also Zeit- und Kosten zu minimieren, können Online-SPE-Module in das bestehende System integriert werden. Durch diese kann eine weitere Anreicherung des Analyten in der Messprobe erreicht oder eine komplette Extraktion vollautomatisch durchgeführt werden [167,233-242]. Einzug gehalten hat diese Technik vor allem in der Wasseranalytik. So können Antibiotika [235,236,242], Pestizide [242] und Hormone [241] in Wasser schnell und zuverlässig nachgewiesen werden. Für Honigproben haben Raezke et al. [167] ein Online-SPE-Verfahren entwickelt, um Antibiotikarückstände zu extrahieren und mit LC-MS zu quantifizieren.

Die komplexe Matrix erfordert eine leistungsstarke Probenvorbereitung und robuste Analysetechnik. Die Herausforderung besteht darin, dass man die Analyten (Antibiotikarückstände) möglichst vollständig extrahiert, von Begleitkomponenten abtrennt und zur Analyse anreichert. Durch aufwendige Techniken, wie z. B. SPE (Solid Phase Extraction), können die Matrixeinflüsse zwar minimiert werden, jedoch gelangen Komponenten des Honigs mit in den Probenextrakt. Je nach Sorte und Herkunft variiert die Zusammensetzung des Honigs und somit auch des Extraktes. Die Matrix hat einen entscheidenden Einfluss auf die Wiederfindung der Antibiotikarückstände. Die mit extrahierten Matrixkomponenten können Störungen im Detektor verursachen. Diese Matrixbestandteile können die Analytsignale überlagern und zu einer Verringerung der Wiederfindung führen oder diese scheinbar vergrößern. In Abb. 26 sind ein UV-Chromatogramm und zwei Massenchromatogramme eines Sulfapyridin und Sulfamethazin dotierten Honigs (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) zu sehen.

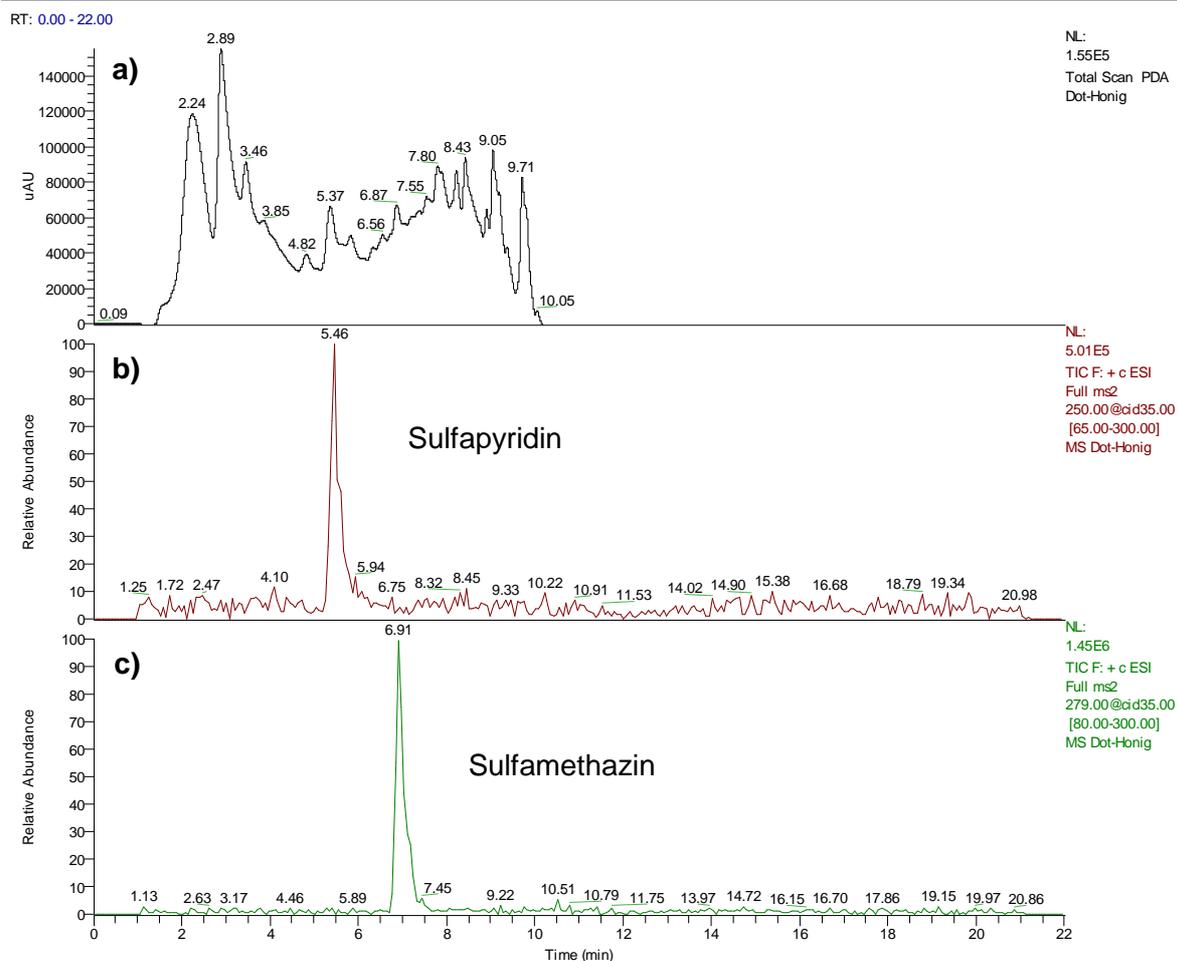


Abb. 26: UV-Chromatogramm (PDA Total Scan) **a)** und MS-Chromatogramme (ESI positiv MS²-Fullscan) **b) & c)** eines mit Sulfapyridin und Sulfamethazin dotierten Honigs (500 µg/kg); LCQ; Gradient um 2 min verlängert, vgl. Tab. 20

Der Einsatz eines chromatographischen Trennsystems gekoppelt mit UV-Detektion ist nur dann möglich, wenn die Anreicherung der Antibiotikarückstände und Abtrennung von Begleitstoffen hinreichend gut ist. Durch das Verwenden eines massenselektiven Detektors können diese Effekte minimiert werden (vgl. Abb. 26). Die Kopplung von HPLC mit Massenspektrometrie über ein ESI-Interface (Electro Spray Ionization) kann zu Ionensuppression führen, hervorgerufen durch koeluiierende Matrixkomponenten [243-248]. Die Ionensuppression führt zu einer Verringerung der Signalintensität und der Empfindlichkeit des Massenspektrometers. Derartige Effekte können von Bestandteilen der Probenmatrix, aber auch durch die Probenvorbereitung eingetragene Substanzen wie Phthalate, Ionenpaarreagenzien, Pufferlösungen und Materialien der Festphasenextraktion verursacht werden [249,250]. Um diese nachteiligen Effekte nachzuweisen, kann auf zwei verschiedene Techniken zurückgegriffen werden: die Vorsäuleninjektionsmethode und die Standardadditionsmethode [251-256].

Durch den Einsatz von internen Standards (z. B. deuterierte Substanzen) können Effekte der Matrix wie Retentionszeitverschiebung durch Angabe der relativen, auf den internen Standard bezogene Parameter verringert werden [257,258].

6.3 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden Analysemethoden entwickelt, die Antibiotika aus verschiedenen Wirkstoffklassen mit nur einer Extraktion und Messung erfassen können. Solche Verfahren kombiniert mit Online-SPE-Systemen gehören zu leistungsstärksten Methoden um Antibiotikarückstände in unterschiedlichsten Matrices nachzuweisen [91-93,259-279]. Die meisten Verfahren zur Detektion von verschiedenen Antibiotikarückständen wurden für die Matrices Wasser, Fleisch, Eier, Fisch usw. entwickelt.

Es existieren nach heutigem Stand der Forschung nur wenige Applikationen für den Bereich der Honiganalytik [91-93,267], in denen ein breites Spektrum von Rückständen und deren Umwandlungs- und Abbauprodukte erfasst werden. Es handelt sich dabei um zwei LC-MS-Methoden [91,93], ein ELISA-Verfahren [267] und einen CHARM-Test [92]. Die beiden letztgenannten Analysemethoden sind sogenannte Screeningverfahren. Mittels ELISA werden Honigproben enzymatisch und immunochemisch auf Antibiotikarückstände hin untersucht. Der CHARM-Test ist ein Rezeptortest der für verschiedene Substanzklassen der Antibiotika entwickelt worden ist. Beide Verfahren können nur Aussagen über die An- oder Abwesenheit (größer oder kleiner der Bestimmungsgrenze) der Antibiotikarückständen geben. Es aber keine genaue Quantifizierung der Konzentrationen und Unterscheidung zwischen einzelnen Umwandlungsprodukten der Analyten (z.B. Isomere und Epimere der Tetracycline) möglich. Im Falle von Positivbefunden sind die Ergebnisse des Screenings dann mit GC-MS oder LC-MS Verfahren zu bestätigen. Einzelmethoden zum Nachweis einer Substanzklasse von Antibiotika in Honig dominieren das Feld der LC-MS-Analysen (vgl. Kap. 9.6 Tab.40). Umwandlungsprodukte, wie Isomere und Tautomere der Tetracycline und Antibiotika wie die Apo-Oxytetracycline werden überhaupt nicht in den bestehenden Methoden erfasst [71,95,96,99,109,110,115,123]. Im Falle des Nachweises von Erythromycins in Honig wird dessen Metabolit nicht in der Analysemethoden mit bestimmt [194,207].

Es existieren nach heutigem Stand der Literatur lediglich zwei LC-MS Methoden [91,93], die eine Vielzahl von Antibiotikarückständen in Honig nachweisen können. Die bestehenden Screeningverfahren [92,267] liefern keine Aussagen über die Konzentrationen der einzelnen Antibiotika und bedürfen einer Bestätigung mittels GC-MS/LC-MS.

Es besteht somit Entwicklungsbedarf, um mehr Antibiotikarückstände in Honig pro Messung zu detektieren und Einzelmethoden in einem Monitoringsystem zusammen zu fassen. Ziel dieser Arbeit ist es, ein routinefähiges Monitoring zu etablieren, das eine größtmögliche Anzahl von Antibiotikarückständen und deren Metabolite in Honig simultan erfasst. Die Probenvorbereitung und LC-MS-Bestimmung der Honigproben soll gegebenenfalls optimiert werden, um die geforderten Mindestleistungsgrenzen (vgl. Tab. 2, Kap. 3) sicher erreichen zu können. In den Kapiteln 8.2.1-8.2.7 werden die Ergebnisse der eigenen Arbeiten mit bereits veröffentlichten Analysemethoden verglichen. Anhand des Vergleichs kann die Leistungsfähigkeit des Monitoringsystems bewertet werden.

Um ein Verfahren zum Nachweis von Antibiotika in Honig zu entwickeln, müssen zunächst Informationen über die Zusammensetzung der Matrix ermittelt werden. Die Zusammensetzung des Honigs und die daraus resultierenden Schwierigkeiten für die Extraktion und MS-Detektion wurden bereits in Kapitel 2 erläutert. Die chemische Zusammensetzung und andere (partikuläre) Komponenten/Inhaltsstoffe haben einen entscheidenden Einfluss auf die Probenvorbereitung der Analyten. Es galt zunächst, die Antibiotika durch eine optimale Probenvorbereitung von den Matrixkomponenten zu trennen und anzureichern. In Kapitel 7 werden die in dieser Arbeit gewählte Untersuchungsmethodik und die Entwicklung des Monitoringsystems beschrieben.

7 Untersuchungsmethodik

In vorangegangenen Projekten der Universität Paderborn, an denen der Autor mitgearbeitet hat, wurden Analysenverfahren entwickelt, um Sulfonamide und Tetracycline in Boden und Pflanzen nachzuweisen [41,42,66]. Dabei wurde ein LC-MS-System mit niedrigauflösender Ionenfalle (LCQ-Advantage) verwendet. Die Entwicklung eines Online-SPE-LC-MS (LCQ-Advantage) Verfahrens am Beispiel von Sulfonamidrückständen in Honig wurde an der Universität Paderborn entwickelt, das Monitoringsystem im Faethe-Labor an einer linearen Ionenfalle (LTQ-MS-System).

Zunächst wird auf die Entwicklung der Online-SPE-LC-MS Methode (LCQ) eingegangen. Mit Hilfe einer bestehenden LC-MS-„Arbeitsmethode“ [80] wird am Beispiel der Sulfonamide die Methodenentwicklung beschrieben. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Methodenentwicklung an der linearen Ionenfalle (LTQ) vorgestellt. Die Summe der Einzelmethoden zum Nachweis verschiedener Antibiotikarückständen in der Matrix Honig ergibt schließlich das Monitoringsystem (siehe Kap. 8.3). Nachfolgend wird die unterschiedliche Meßmethodik und die Leistungsfähigkeit der verwendeten Massenspektrometer erklärt.

Das *LTQ*-Massenspektrometer ist eine Weiterentwicklung des *LCQ*-Massenspektrometers. Das *LTQ* besitzt eine lineare, das *LCQ* eine dreidimensionale Ionenfalle. Durch Weiterentwicklung des geometrischen Aufbaus und Implementieren eines weiteren Elektromultipliers ist es gelungen, eine Empfindlichkeitssteigerung von ca. 1: 100 (*LCQ/LTQ*) zu erreichen. Ionenfallen-Massenspektrometer haben im Vergleich zu Triplequad-Massenspektrometern eine geringere Empfindlichkeit, bieten aber die Möglichkeit, MS^n -Stossexperimente durchführen zu können [249]. Ionenfallen-MS sind somit sehr gut geeignet zur Strukturaufklärung komplexer organischer Makromoleküle anhand spezifischer Fragmentierungsmuster. In Abb. 27 und 28 sind die beiden verwendeten MS-Systeme abgebildet.



Abb. 27: Frontansicht des LCQ-Advantage Massenspektrometers mit ESI-Interface (Fa. Thermo Finnigan)



Abb. 28: Frontansicht des LTQ-Massenspektrometers mit ESI-Interface (Fa. Thermo Fisher)

Zur Entwicklung der einzelnen Analysenmethoden ausgehend von der „Arbeitsmethode“ wurden schrittweise die Probenvorbereitung, die chromatographischen und die massenspektrometrischen Bedingungen für die jeweiligen Antibiotikasubstanzklassen optimiert. Für jede Substanzklasse wurde anhand von Referenzsubstanzen in Lösung zuerst eine Arbeitsmethode entwickelt. Diese wurde während der Methodenentwicklung angepasst (Wahl der Fließmittel in der HPLC, Anpassen des Gradienten), um gegebenenfalls störende Matrixbestandteile, die durch die Probenvorbereitung nicht vollständig entfernt worden sind, chromatographisch vom Analyt-Signal zu trennen.

Die Untersuchungsmethodik der Entwicklungsarbeiten in dieser Arbeit lässt sich generell in folgende Abschnitte unterteilen:

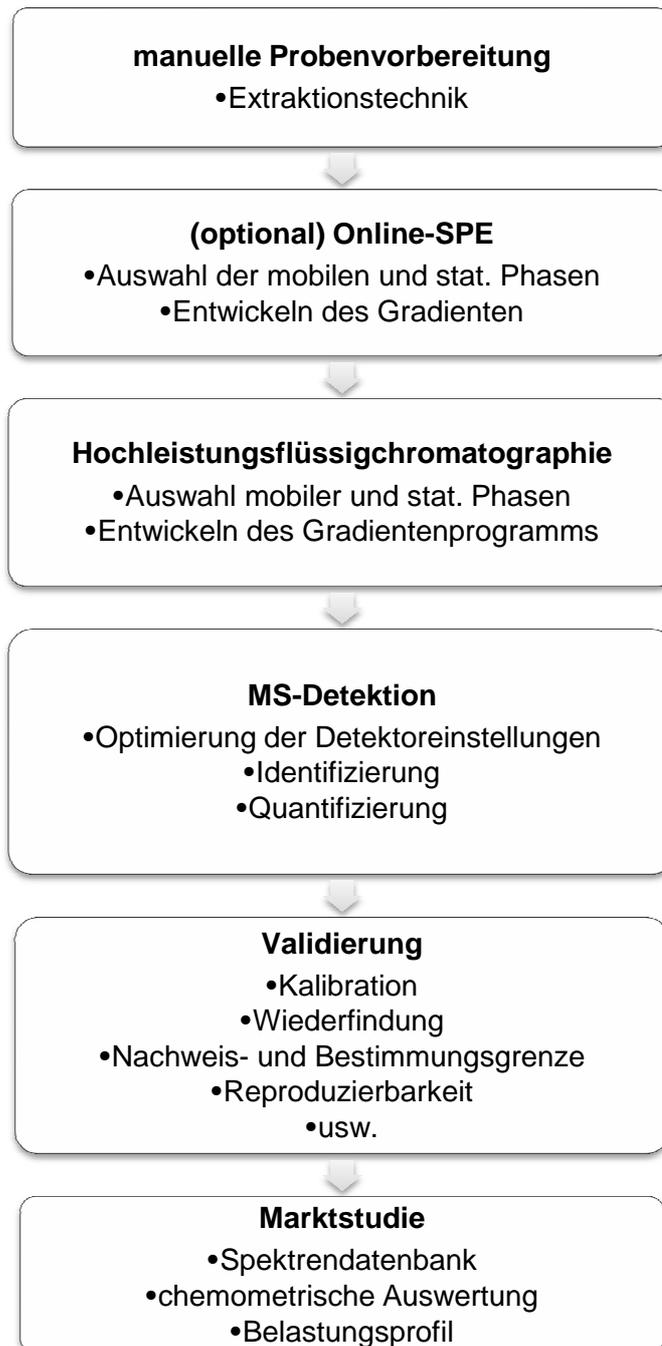


Abb. 29: Fließschema der Untersuchungsmethodik zur Methodenentwicklung und routineanalytische Bestimmung von Antibiotikarückständen in Honig

Optional kann die manuelle Probenvorbereitung durch Implementierung eines Online-SPE Verfahrens automatisiert werden (vgl. Kap. 8.1). Nach Abschluss der Methodenentwicklung wurde das Analysenverfahren validiert und im letzten Schritt anhand einer Marktstudie die Belastungssituation von Antibiotikarückständen in Honig untersucht. Die erhaltenen Daten fließen zudem in eine chemometrische Auswertung sowie in eine Spektrenbibliothek mit ein.

8 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse sind unterteilt in zwei Kapitel. Das erste Kapitel (Kap. 8.1) befasst sich mit der Entwicklung eines Online-SPE-Systems gekoppelt mit HPLC-MS. Das folgende Kapitel (Kap. 8.2) umfasst die Entwicklung von Routinemethoden zum Nachweis von Antibiotikarückständen in Honig. Die Validierungsdaten werden mit denen aus der Literatur bekannten verglichen und bewertet. Abschließend werden die Daten einer Marktstudie und die Einbindung der Massenscans in eine chemometrische Software diskutiert.

8.1 Methodenentwicklung (LCQ)

8.1.1 Entwicklung einer Online-SPE-LC-MS Methode: Sulfonamide

Der Ablauf der Methodenentwicklung gestaltete sich wie folgt:

- Etablieren einer LC-MS Methode (Sulfonamide in Honig) ausgehend von einer bestehenden Methode zum Nachweis von Veterinärarzneimitteln in Boden und Pflanzen
- Einbindung des Online-SPE-Moduls in das bestehende Messsystem
- Testen von SPE-Kartuschenmaterial (Dimension, Partikeldurchmesser)
- Optimierung des Laufmittelgradienten
- Vergleich von Online-SPE-LC-MS mit der manuellen SPE und anschließender LC-MS Messung (offline) anhand von Wiederfindungsstudien dotierter Honige
- Übertragung der Online-SPE Technik auf die Analyse von Tetracyclinen
- Implementierung eines zweiten Schaltventils und einer 10 mL Probenschleife zur direkten Probenaufgabe
- Optimierung des/der Laufmittelgradienten
- Vergleich von Online-SPE-LC-MS (10 mL Probenschleife) mit der manuellen SPE und anschließender LC-MS Messung (offline) anhand von Wiederfindungsstudien dotierter Honige

Zur Einbindung des Online-SPE-Moduls (vgl. Abb. 32) in das LC-MS-Messsystem müssen Datenverbindungen zum Autosampler (AS1), zu den beiden HPLC-Pumpen (Pumpe 1 und 2) und den beiden Schaltventilen (SV1 und SV2) geschaffen werden. In der Xcalibur-Software wurde unter der Menüführung des Autosamplers (AS1) ein Zeitprogramm programmiert, um die Gerätesteuerung und Schaltung der Schaltventile zu koordinieren. Nach Abschluss der Implementierung der Gerätekomponenten wurden verschieden stationäre und mobile Phasen getestet. Sobald geeignete chromatographische Bedingungen geschaffen sind,

wurden dotierte Honige mit dem neu entwickelten Online-SPE-Verfahren analysiert. Die Wiederfindung wurde abschließend mit den Daten der herkömmlichen manuellen SPE verglichen.

Ausgehend von einer bereits etablierten Analytik zum Nachweis von Antibiotikarückständen in Boden und Nutzpflanzen [41], wurde eine LC-MS Methode entwickelt, um 11 Sulfonamide in Honig nachzuweisen. Die Sulfonamide bilden im Gegensatz zu anderen Wirkstoffen, wie z. B. die Tetracycline, in-vitro keine Umwandlungsprodukte und vereinfachen somit die Methodenentwicklung.

Die Extraktion erfolgte mit Festphasenkartuschen (SPE: Solid Phase Extraction). Zum Einsatz kamen Oasis-HLB Kartuschen und als Puffersystem Citratpuffer. Zu der analysierenden Probe (Pflanzen, Boden, Honig) wurde ein definiertes Volumen des Puffers gegeben und homogenisiert. Die SPE-Kartuschen wurden auf einen SPE-Vakuumblock gesteckt und mit Methanol konditioniert und anschließend mit Wasser equilibriert. Durch Anlegen eines geringen Unterdrucks wurden die entsprechenden Lösungen durch die Kartusche gesaugt. Es folgte die Probenaufgabe. Dabei ist darauf zu achten, dass das Sorbens in der Festphasenkartusche bei diesen Schritten nicht trocken gesaugt wird. Nach erfolgter Probenaufgabe wurden die Kartuschen mit MeOH/ H₂O (5/95 % v/v) und bidest. Wasser gewaschen. Die Kartuschen wurden trocken gesaugt, das Eluat verworfen und abschließend mit Methanol eluiert. Die organische Phase wurde bis zur Trockene eingedampft und mit Laumittel A ((Acetonitril / Wasser / Ameisensäure 10/89,9/0,1 (v/v/v)) wieder aufgenommen und in ein Autosamplervial abgefüllt. Diese aufwändige manuelle Probenvorbereitung soll durch Implementieren eines Online-SPE-Moduls in die bestehende LC-MS Kopplung vereinfacht werden. Dadurch können langfristig Kosten und Lösungsmittelverbrauch stark verringert werden.

Die Analysenbedingungen zum Nachweis von Antibiotika in Pflanzen und Boden wurde konsekutiv geändert, um eine Online-SPE-LC-MS Methode zum Nachweis von Sulfonamiden in Honig zu erstellen. Im ersten Schritt wurden die Messparameter auf die Bestimmung von den Analyten in Honig übertragen. In Abb. 30 ist ein MS-Chromatogramm (TIC: Total Ion Current) einer Antibiotika-Mischstandardlösung (Sulfadiazin und 5 Tetracycline) zu sehen. Dieses Chromatogramm diente als Ausgangsbedingung für die weitere Optimierung und Entwicklung der Methode. Um eine Online-SPE vor der LC-MS-Analyse durchführen zu können, mussten zunächst die nötigen Komponenten kombiniert bzw. in das LC-MS-System integriert werden. Wie in Abb. 31 und 32 gezeigt wurde das LC-MS-System bestehend aus den Modulen Autosampler (AS 1), HPLC-Pumpe (Pumpe 1), Entgaser, Schaltventil (SV 1), UV- und MS-Detektor durch ein Zusatzmodul, bestehend aus einem Autosampler AS4000 (AS 2), einer Pumpe L7100 (Pumpe 2), einer Online-SPE-Kartusche und ein Schaltventil (SV 1), erweitert.

RT: 0.00 - 35.02

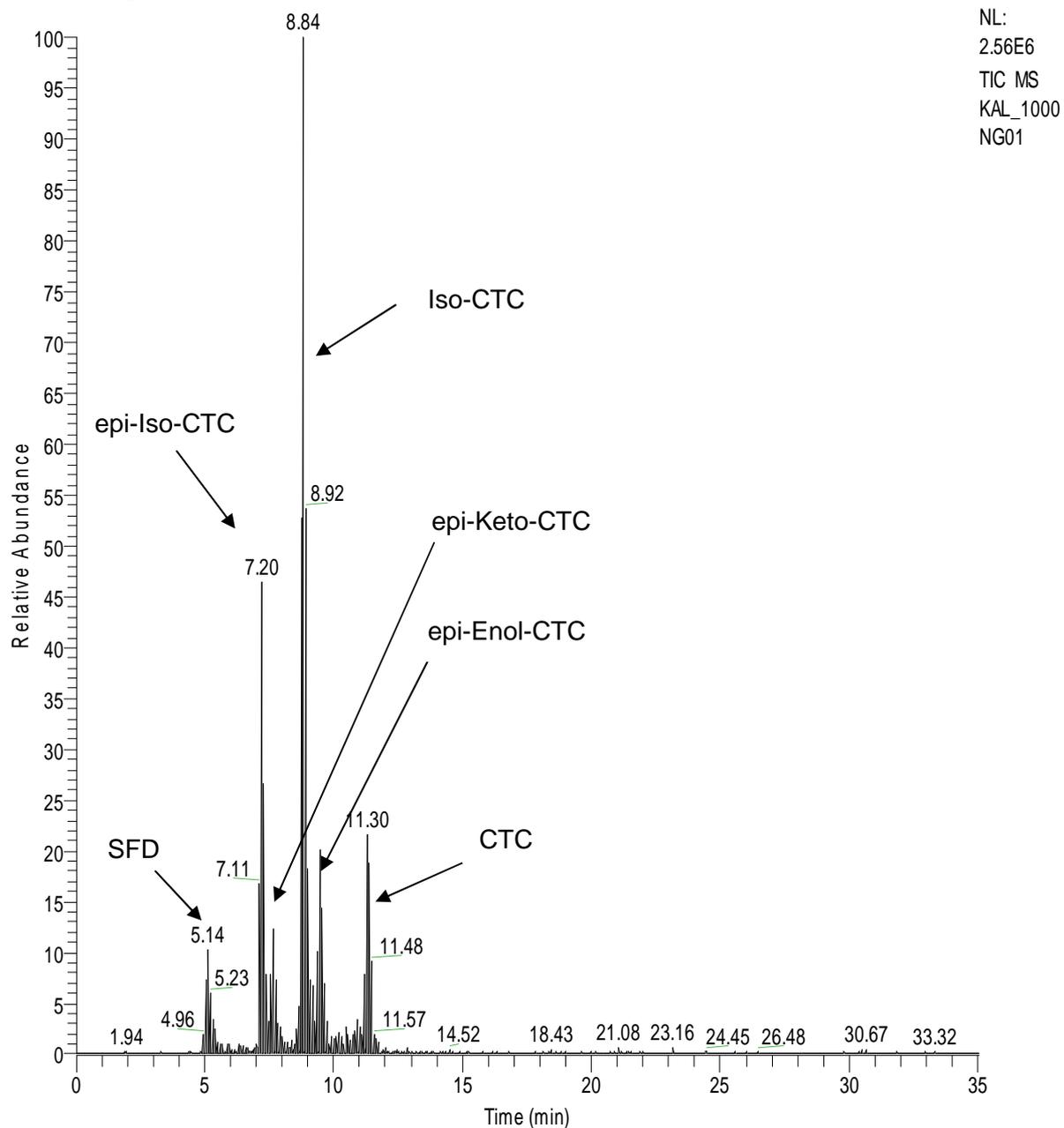


Abb. 30: MS-Chromatogramm (TIC) einer 1 mg/L Mischstandardlösung (Sulfadiazin und 5 Tetracycline); ESI-positiv, LCQ-Advantage ohne Online-SPE-Modul [66]; Abk. siehe Tab. 19, Kap. 8.2.1

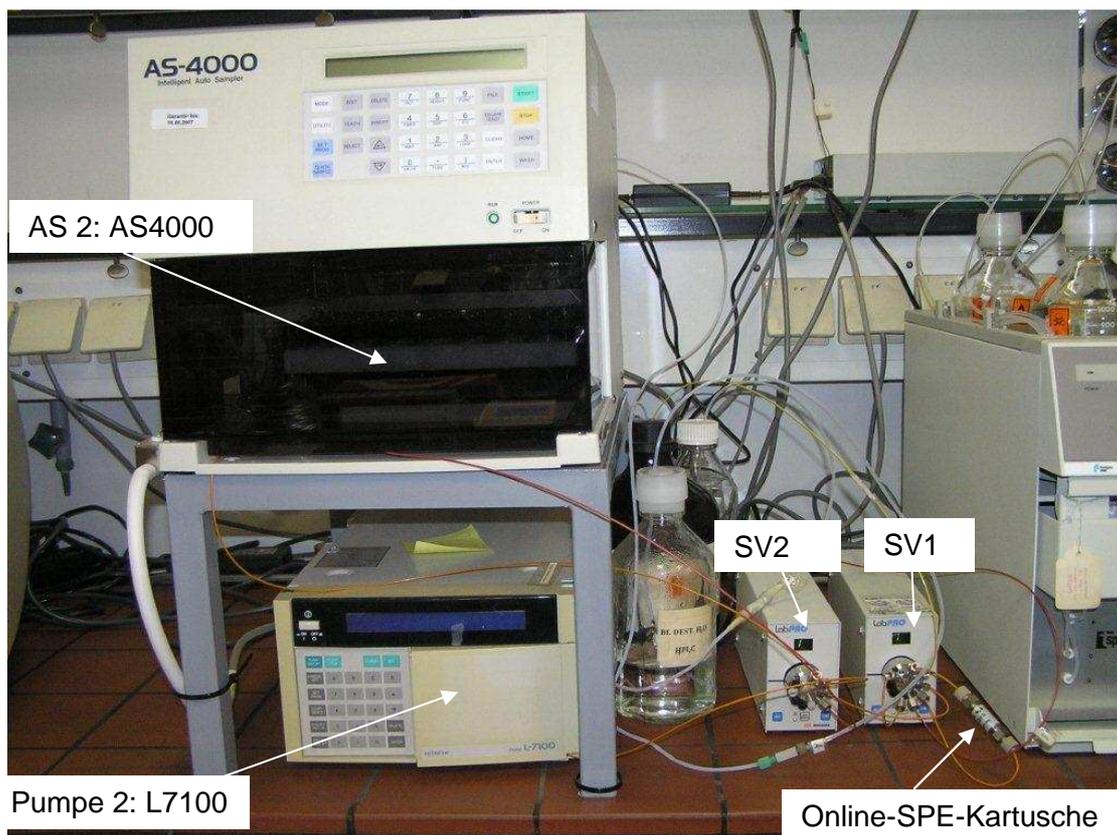
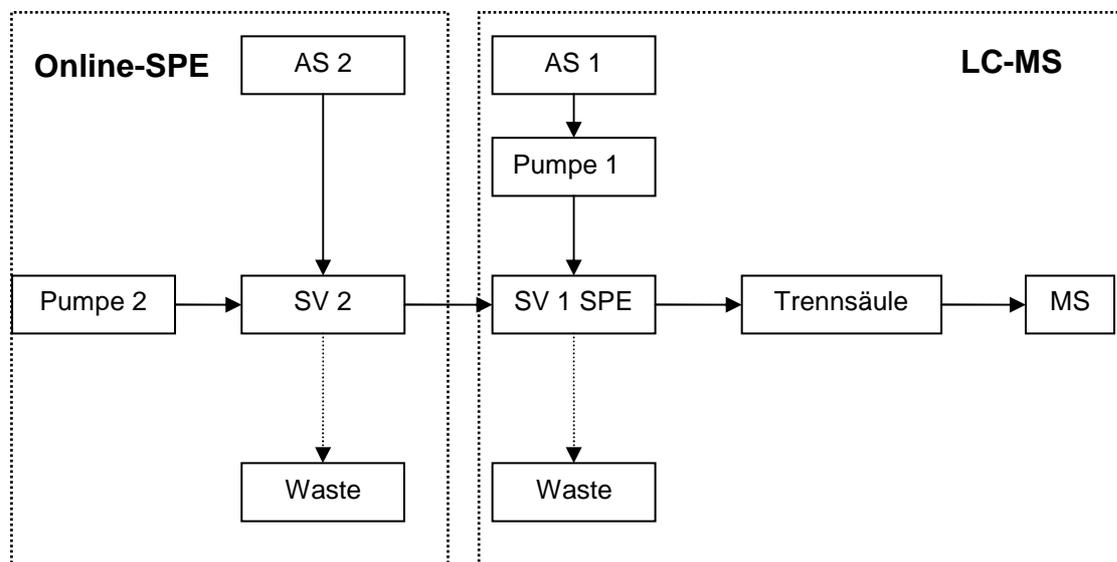


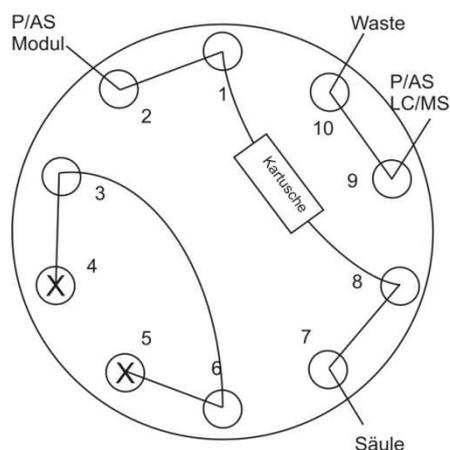
Abb. 31: Komponenten des Online-SPE Moduls (Abk. vgl. Abb. 32)



- | | |
|-----------|------------------------------|
| AS 1: | AS 3000 (HPLC Autosampler) |
| Pumpe 1: | P 4000 (HPLC Pumpe) |
| SV 1 SPE: | Säulenschaltventil 1 und SPE |
| Pumpe 2 | L-7100 (Modul- Pumpe) |
| AS 2: | AS 4000 (Modul- Autosampler) |
| SV 2: | Säulenschaltventil 2 |
| MS: | Massenspektrometer |

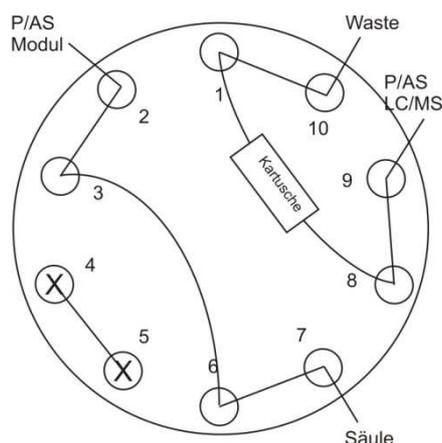
Abb. 32: Schematische Darstellung der Kopplung des Online-SPE-Moduls mit der LC-MS

Die schematischen Darstellungen in Abb. 33 a und b zeigen die Belegung des Schaltventils (SV 1). Die Probenaufnahme des Analyten erfolgt in Position 1 und nach Schalten des Ventils auf Position 2 wird im Backflash-Verfahren eluiert. Dies ermöglicht eine vollständige und kompakte Elution des Analyten und die Minimierung irreversibel retardierter Anteile der Analyten auf der Kartusche. Nach der Probenaufnahme und Elution wird die Kartusche mit Waschlösungen (Wasser, MeOH/ H₂O (5/95 %)) gespült und für den nächsten Sequenzschritt rekonditioniert.



Position 1
(Probenaufnahme)

Abb. 33 a: Schaltventil in Position 1



Position 2
(Elution)

Abb.33 b: Schaltventil in Position 2

Die Anschlüsse des Schaltventils sind wie folgt belegt:

1. zur Kartusche und weiter zu 8
2. Anschluss von AS2 (Pumpe 2)
3. Loop zu 6
4. geschlossen (x), keine Belegung
5. geschlossen (x), keine Belegung
6. Loop zu 3
7. Anschluss zur HPLC-Säule
8. zur Kartusche und weiter zu 1
9. Anschluss von AS1 (Pumpe 1)
10. zum Abfallbehälter (im folgenden „Waste“ genannt)

Die Probenlösung wird in Position 1 von der LC/MS- Pumpe (Pumpe 1) aufgegeben und mit Wasser und MeOH/ H₂O (5/95 %) gewaschen. Die Waschlösung fließt direkt in den Abfall-Behälter („Waste“). Zur Elution wird das Schaltventil auf Position 2 geschaltet, und die Modul-Pumpe (Pumpe 2) startet das Gradientenprogramm. Zum Rekonditionieren wird auf Position 1 geschaltet.

Es wurden zum Vergleich dotierte Honige mit Hilfe der Online-SPE analysiert und dieselben Honige ohne Hinzuschalten des Moduls, d.h. nach erfolgter manuelle Festphasenextraktion per Direktinjektion in das LC-MS-System (LCQ-Advantage). Der für die Online-SPE-Methode

bereits zur Bestimmung der Sulfonamide im Arbeitskreis entwickelte Gradient A (vgl. Tab 11), wurde nachfolgend weiter optimiert [280]. Insgesamt dauert die Analyse einer aufgearbeiteten Honigprobe ca. 60 min, wobei dem Gradientenprogramm eine 20-minütige Auftragephase der Probe auf die Online-SPE-Kartusche vorausgeht.

Tab. 11: Gradient A für die Online-SPE-Methode

Zeit [min]	Laufmittel A* [%]	Acetonitril [%]	Fluss [mL/min]
-20	90	10	0,2
0	90	10	0,2
6	50	50	0,2
7	0	100	0,2
10	0	100	0,2
12	50	50	0,2
15	90	10	0,2
15,9	90	10	0,2
16	0	100	0,2
20	0	100	0,4
26	0	100	0,4
26,5	90	10	0,4
35	90	10	0,4
35,5	0	100	0,4
38	0	100	0,4

* Zusammensetzung des Laufmittels A siehe Kapitel 11.3, Seite 154

Mit dem optimierten Gradienten B (vgl. Tab. 12) und der angepassten Auftragedauer auf das Online-SPE-Modul [281] benötigt man 36 min zur Analyse einer Probe. Ermöglicht wurde dies durch eine erhöhte Flussrate (0,4 mL/min) und eine auf 5 min verkürzte Auftragephase.

Tab. 12: Gradient B für die Online-SPE-Methode; Flussrate: 0,4 mL/min

Zeit [min]	Laufmittel A* [%]	Acetonitril [%]
-5	90	10
0	90	10
3	70	30
6	0	100
8	0	100
10	90	10
11	90	10
12	0	100
26	0	100
26,1	90	10
31	90	10

* Zusammensetzung des Laufmittels A siehe Kapitel 11.3, Seite 154

In Abb. 34 sind die Chromatogramme von 11 Sulfonamiden (Mischstandardlösung) gezeigt, welche mit den Laufmittelgradienten (links: Gradient A (0,5 mg/L; rechts Gradient B (0,1 mg/L)) erhalten worden sind.

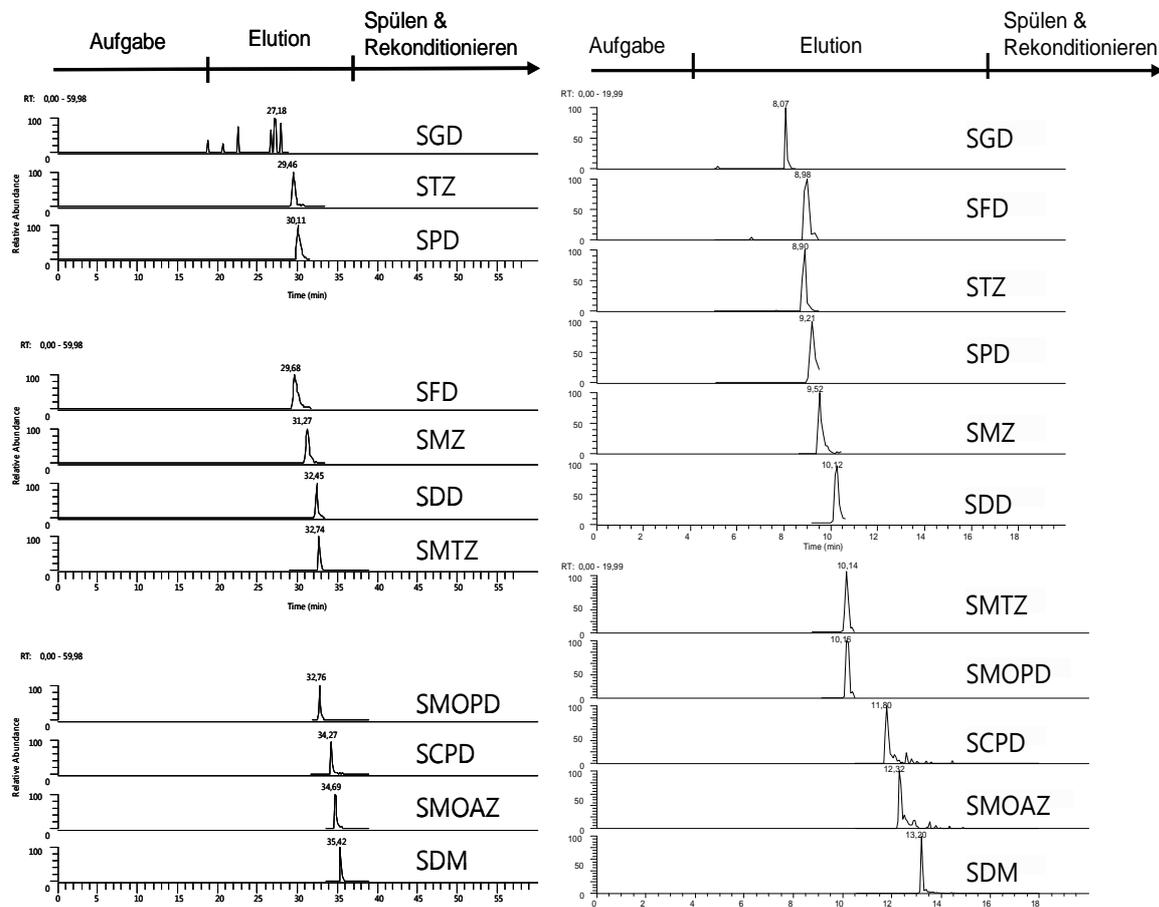


Abb. 34: Online-SPE-LC-MS:MS-Chromatogramme eines Mischstandards von 11 Sulfonamiden mit Gradient A (links; 0,5 mg/L) und Gradient B (rechts; 0,1 mg/L); beide mit Online-SPE-Modul, SRM-Modus (LCQ); Abk. siehe Tab. 21, Kap. 8.2.2

Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass es gelungen ist, die Dauer eines Analyselaufs von 60 auf 36 min zu verkürzen. Aufgrund der hohen Anzahl gleichzeitig zu analysierender Substanzen, war es notwendig, in das Messprogramm des Massenspektrometers mehrere Scan-Events einzuspeichern. Scan-Events erlauben es, innerhalb eines definierten Zeitfensters nur bestimmte Massen/Ladungs-Verhältnisse zu scannen. Auf diese Weise kann die Empfindlichkeit der MS-Detektion erhöht werden. Jedes Segment enthält im Vergleich weniger Scan-Events als ein Segment mit allen Scan-Events zur Detektion der Analyten. Die Scanzeit wird verringert, wodurch eine bessere „Abtastung“ des Analytsignals im Massenspektrometer gewährleistet wird. Ein Analytsignal erscheint in einem Chromatogramm als Peak. Dieser hat eine gewisse Breite, was wiederum einer bestimmten Zeit entspricht. Wenn innerhalb dieser Zeit häufiger gescannt wird, erhält man eine genauere Abbildung des Analytsignals im Chromatogramm.

8 Ergebnisse und Diskussion

Die Chromatogramme der Analyse eines 100 µg/L Mischstandards aller elf verwendeten Sulfonamide bei Verwendung der Online-SPE-Kartusche sind in Abb. 35 aufgeführt. Die Abkürzungen der einzelnen Sulfonamide sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

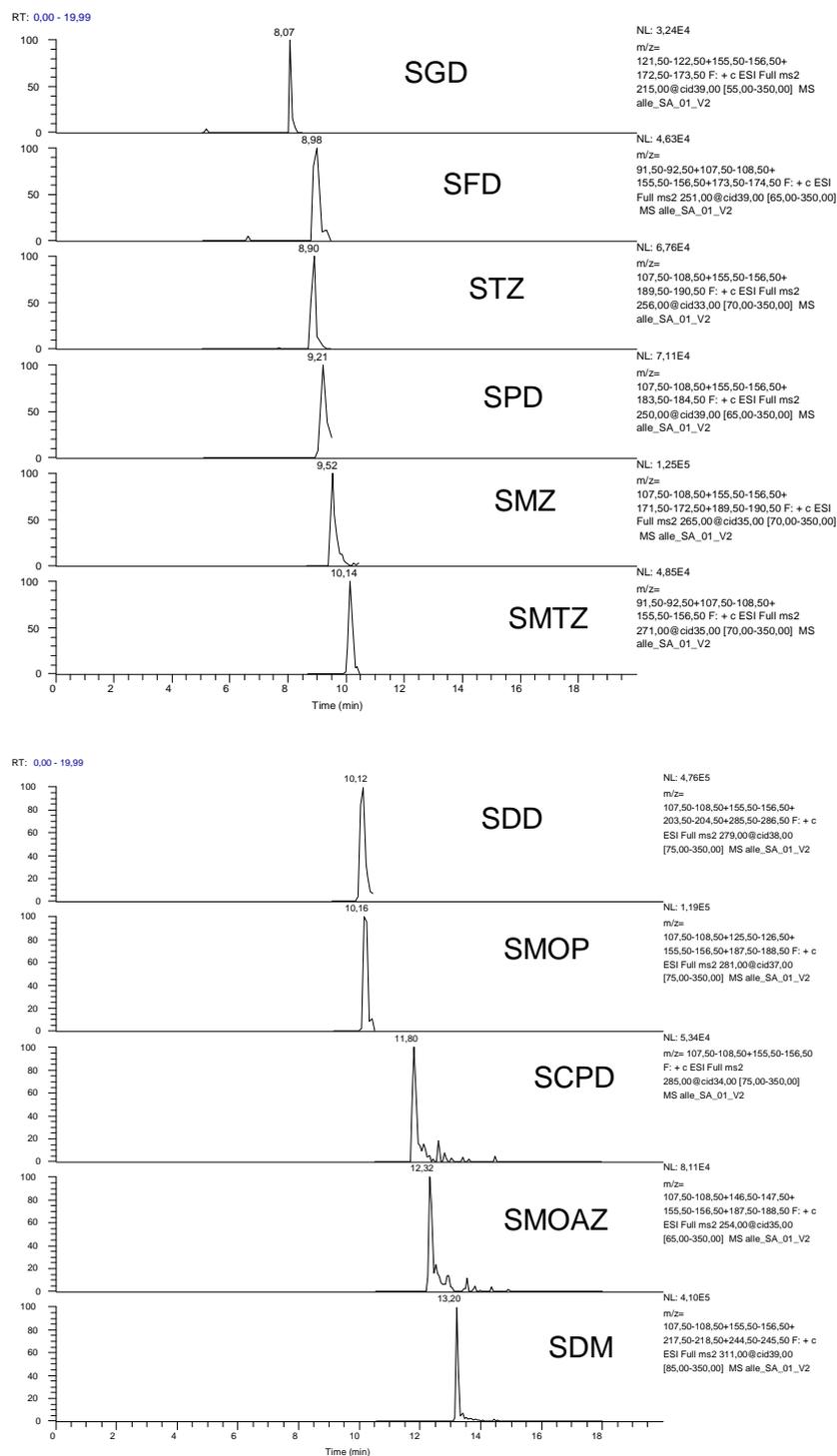


Abb. 35: Online-SPE-LC-MS: MS-Chromatogramme eines Mischstandards aller 11 eingesetzten Sulfonamide; Gradient B (0,1 mg/L, SRM-Modus), Abk. siehe Tab. 21, Kap. 8.2.2

8.1.2 Online-SPE: Tetracycline

Die entwickelte Online-SPE-Methode konnte auch auf die Stoffklasse der Tetracycline übertragen werden. Ein entwickelter Laufmittelgradient [41] (vgl. Tab. 13) zur chromatographischen Trennung von Tetracyclinen diente als Ausgangspunkt für die Methodenentwicklung.

Tab. 13: Laufmittelgradient zur chromatographischen Trennung der Tetracycline (Flussrate: 0,4 mL/min)

Zeit [min]	Laufmittel A* [%]	Laufmittel B* [%]
0	90	10
1,5	80	20
10	60	40
17	0	100
21	0	100
24	90	10
35	90	10

*Zusammensetzung der Laufmittel A und B siehe Kapitel 10.3, Seite 154

Für die Untersuchungen wurden insgesamt elf verschiedene Tetracycline verwendet (siehe Abb. 36). Strukturchemische Daten sind in Kapitel 5.1 und 8.1.2 aufgeführt.

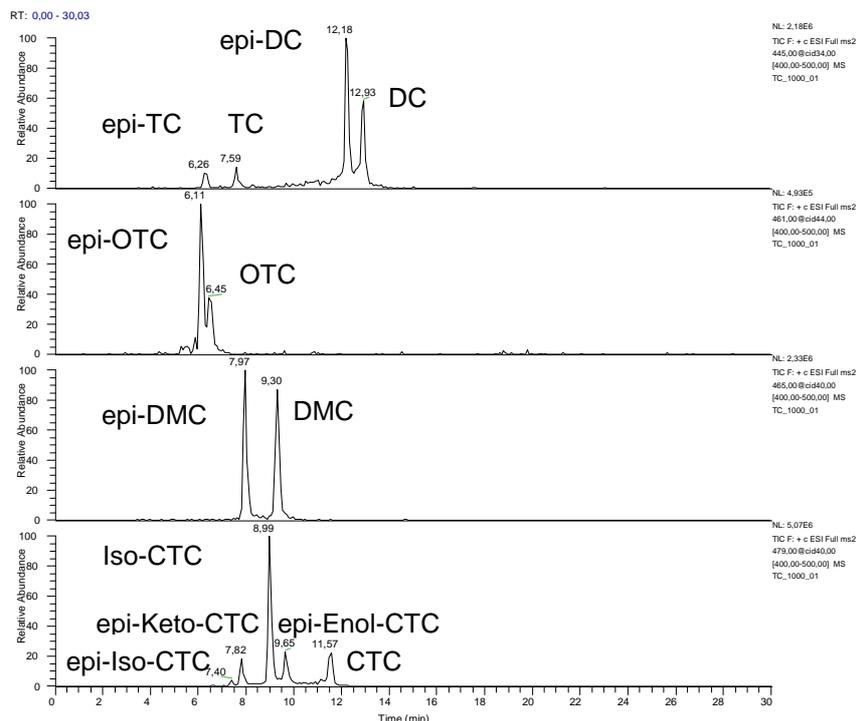


Abb. 36: MS-Chromatogramme eines 1 mg/L Tetracyclin-Mischstandards (ohne Online SPE-Kartusche, SRM-Modus); Abk. siehe Tab. 19, Kap. 8.2.1

Abb. 37 zeigt die MS-Chromatogramme eines Mischstandards aus den elf Tetracyclinen, aufgenommen ohne Online-Kartusche. Man erkennt, dass neben Iso-CTC auch sein Epimer epi-Iso-CTC vorhanden war, welches sich in der Lösung aus dem Iso-CTC bildete. Außerdem lag epi-CTC in seinen beiden Tautomeren epi-Keto- und epi-Enol-CTC vor. Daher

sind in den Chromatogrammen nicht nur elf, sondern insgesamt dreizehn Peaks vorhanden, die den entsprechenden Tetracyclinen zugeordnet werden. Die Daten für die Zuordnung basieren zum einen auf der Analyse von den jeweiligen Einzelsubstanzen und vorangegangenen eigenen Arbeiten [66].

Zur Nutzung der Online-SPE-Kartusche wurde dieser Gradient (vgl. Tab. 13) übernommen und in Pumpe 2 (vgl. Abb. 37) einprogrammiert. Hinzugefügt wurden lediglich die Umschaltereignisse für das Schaltventil (SV 1). Die Auftragedauer von 5 min auf die Online-Kartusche wurde anhand der Erfahrungen mit den Sulfonamiden beibehalten. Da Pumpe 2 während der Auftragephase schon Laufmittel A und B mit den Anfangsbedingungen des Gradienten fördert (Laufmittel A/B: 90/10 v/v) und die letzten 11 min des optimierten Gradienten C diesen Rekonditionierungsbedingungen entsprachen, konnte das Gradientenprogramm um 5 min auf 30 min verkürzt werden. Die Umschaltereignisse fanden beim Start des Gradientenprogramms (auf Position 2) und in der 28. Minute (auf Position 1) statt. Das bedeutet, dass für die folgenden 7 min die analytische Säule mit Laufmittel A und B (im Verhältnis 90:10 v/v) gespült und rekonditioniert wurde, während die Online-Kartusche mit Wasser durchspült und auf die nächsten Startbedingungen eingestellt wurde (vgl. Tab. 14).

Tab. 14: Optimierter Gradient C zur chromatographischen Trennung der Tetracycline mit Online-SPE-Kartusche (0,4 mL/min)

Zeit [min]	Laufmittel A* [%]	Laufmittel B* [%]	Umschalten des Ventils
-5	90	10	
0	90	10	auf Pos. 2
1,5	80	20	
10	60	40	
17	0	100	
21	0	100	
24	90	10	
28	90	10	auf Pos. 1
30	90	10	

*Zusammensetzung der Laufmittel A und B siehe Kapitel 10.3, Seite 154

Abb. 38 zeigt die Chromatogramme eines 1 mg/L Tetracyclin-Mischstandards unter Verwendung des Online-SPE-Moduls. Es sind bis auf die Retentionszeitverschiebung von etwa 5 min im Vergleich zu Abb. 36 keine weiteren Unterschiede erkennbar.

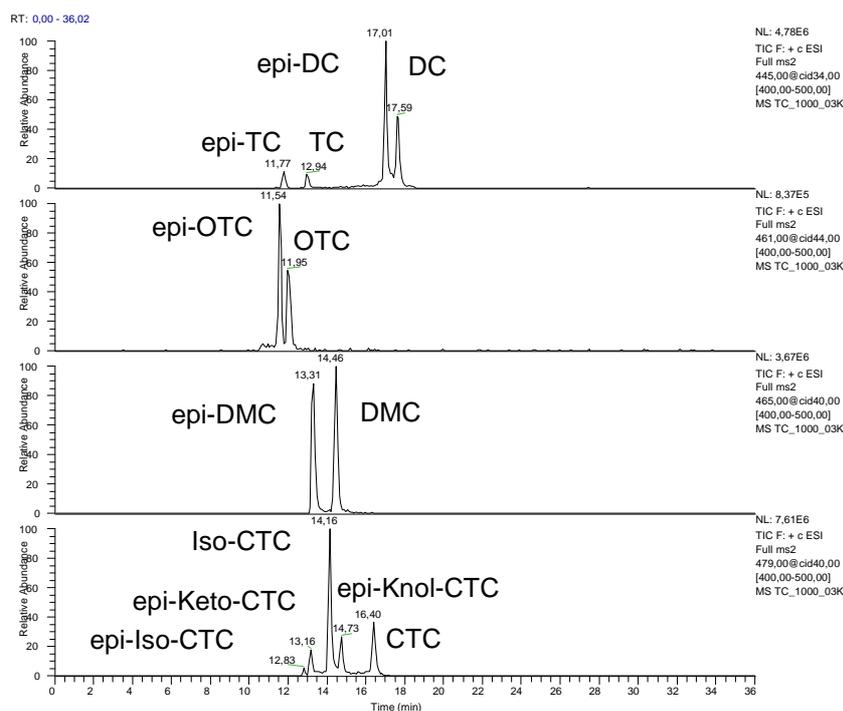


Abb. 37: MS-Chromatogramme eines 1 mg/L Tetracyclin-Mischstandards (mit Online-SPE-Kartusche, SRM-Modus); Abk. siehe Tab. 19, Kap. 8.2.1

8.1.3 Online SPE: 10 mL-Aufgabevolumen

Die entwickelten Online-SPE-Methoden zum Nachweis von Sulfonamiden und Tetracyclinen in Honig dienen zur Aufreinigung bereits vorbereiteter Messextrakte. Das Injektionsvolumen betrug 200 μL , das Volumen der Probenschleife 1 mL. Um die manuelle Festphasenextraktion zu automatisieren, wurde als abschließender Schritt der Online-SPE-Methodenentwicklung eine 10 mL-Probenschleife in den Autosampler eingebaut. Somit kann ohne vorherige manuelle Probenvorbereitung, die Extraktion einer (dotierten) Honigprobe per Online-SPE-Kartusche durchgeführt werden. Die Kapazität der Online-SPE-Kartusche wurde im Zuge des Einbaus einer größeren Probenschleife erhöht. Der Porendurchmesser wurde vergrößert (vom Hersteller sind keine genauen Angaben bekannt, Fa. R. S. Chromatographie) und das Volumen beträgt 5 mL. Durch Einbau eines zweiten Schaltventils (SV 2) kann die 10 mL-Probenschleife zur Probenaufgabe zugeschaltet und zum Waschen der SPE-Kartusche umgangen werden. Dadurch wird gewährleistet, dass die jeweilige Waschlösungen nach der Probenaufgabe direkt die Kartusche erreichen.

Die Analysenzeit betrug 47 min für eine Probe. Zur Dotierung wurden 3 Sulfonamide (Sulfapyridin, Sulfadimidin, Sulfadimethoxin) verwendet. In Abb. 38 und 39 ist das Schaltventil 1 in Stellung 1 und 2 abgebildet.

Pumpe 1: HPLC-Pumpe
 Pumpe 2: Modul-Pumpe
 K: Online-SPE-Kartusche
 Waste: Abfallbehälter

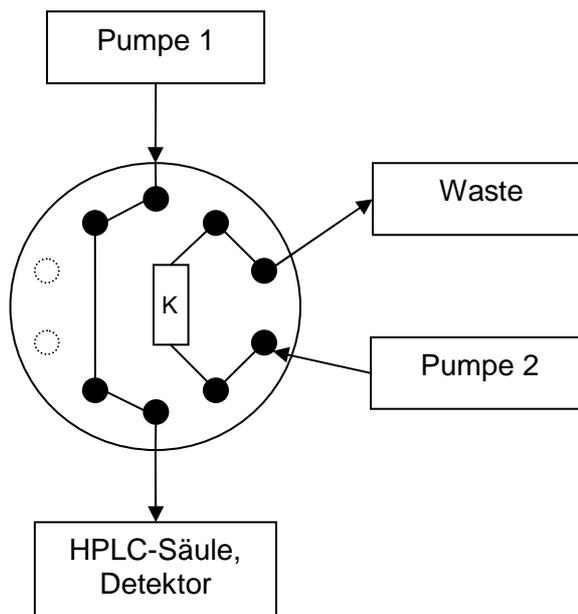


Abb. 38: Stellung 1 des SV 1 zur Probenaufgabe

Pumpe 1: HPLC-Pumpe
 Pumpe 2: Modul-Pumpe
 K: Online-SPE-Kartusche
 Waste: Abfallbehälter

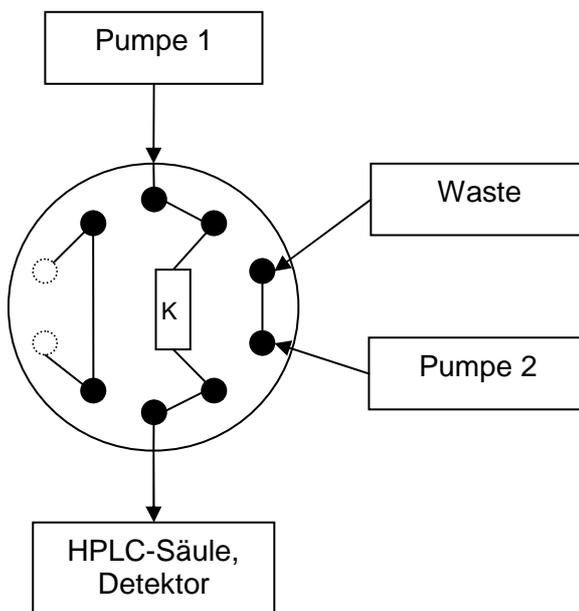


Abb. 39: Stellung 2 des SV1 zur Elution der Analyten

Tab. 15 gibt den Gradienten der Waschlösungen und das Event-Schaltprogramm der Pumpe 2 wieder. In Tab. 16 sind die Events beschrieben.

Tab. 15: Gradient und Event-Schaltprogramm der Pumpe: Probenaufgabe, Elution, Waschen und Rekonditionieren

Zeit t [min]	Wasser [%]	Methanol [%]	Fluss [mL/min]	Event
0,0	100	0	1,5	10/30
0,1	100	0	1,5	21
10,0	100	0	1,5	31
15,0	100	0	1,5	20
20,0	95	5	1,5	
25,0	95	5	1,5	11
25,1	100	0	0,1	
35,0	100	0	0,1	
35,1	0	100	1,0	10/30
38,0	0	100	1,0	
41,0	100	0	1,0	
45,0	100	0	1,5	
47,0	100	0	1,5	

Tab. 16: Definition der Events die im Gradientenprogramm der Pumpe 2 gespeichert sind

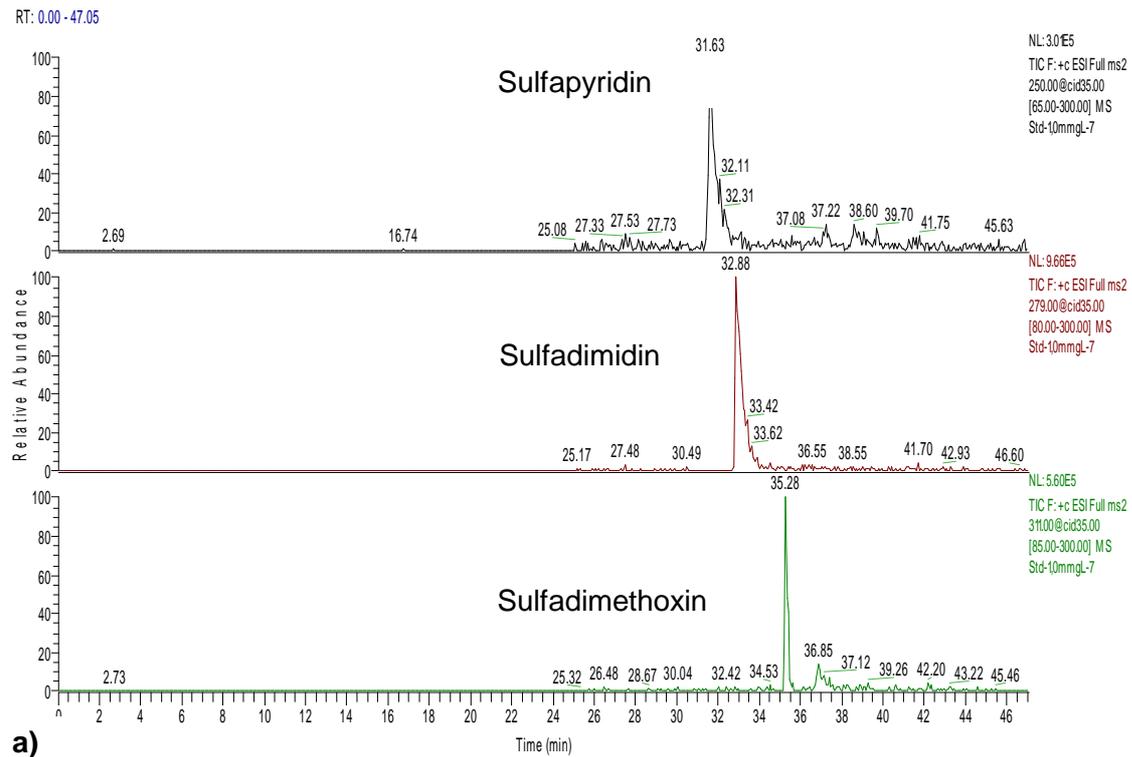
Event	Funktion
10	SV 1 in Stellung 1
11	SV 1 in Stellung 2
20	Autosampler in Wartestellung
21	Autosampler startet Programm
30	SV 2: Probeschleife wird genutzt
31	SV 2: Probeschleife wird umgangen

In Abb. 40 a, b und 41 a, b sind Chromatogramme einer Mischstandardlösung (1 mg/L) und einer dotierter Honigprobe (100 µg/kg) zu sehen. Die Standardlösung und die Honigprobe enthielten die Sulfonamide Sulfapyridin, Sulfadimidin und Sulfadimethoxin. Die Signale in den MS-Chromatogrammen (vgl. Abb. 36 und 38) weisen im Vergleich zur Online-SPE mit kleinerem Aufgabevolumen Peaktailing auf. Sulfapyridin ist in der dotierten Honigprobe nur noch qualitativ auswertbar. Die Kapazität der Online-SPE Phase wurde zwar durch Wahl eines größeren Porendurchmessers (vom Hersteller sind keine genauen Angaben bekannt, Fa. R. S. Chromatographie) und Volumen (5 mL) vergrößert, ist aber nicht ausreichend um Sulfapyridin hinreichend gut zu retardieren.

8 Ergebnisse und Diskussion

E:\lines\Messungen\290908\Std-1,0mmg/L-7

9/29/2008 17:56:04



Std-1,0mmg/L-7 #1918 RT: 32.94 AV: 1 NL: 5.37E5
F: +c ESI Full ms2 279.00@cid35.00 [80.00-300.00]

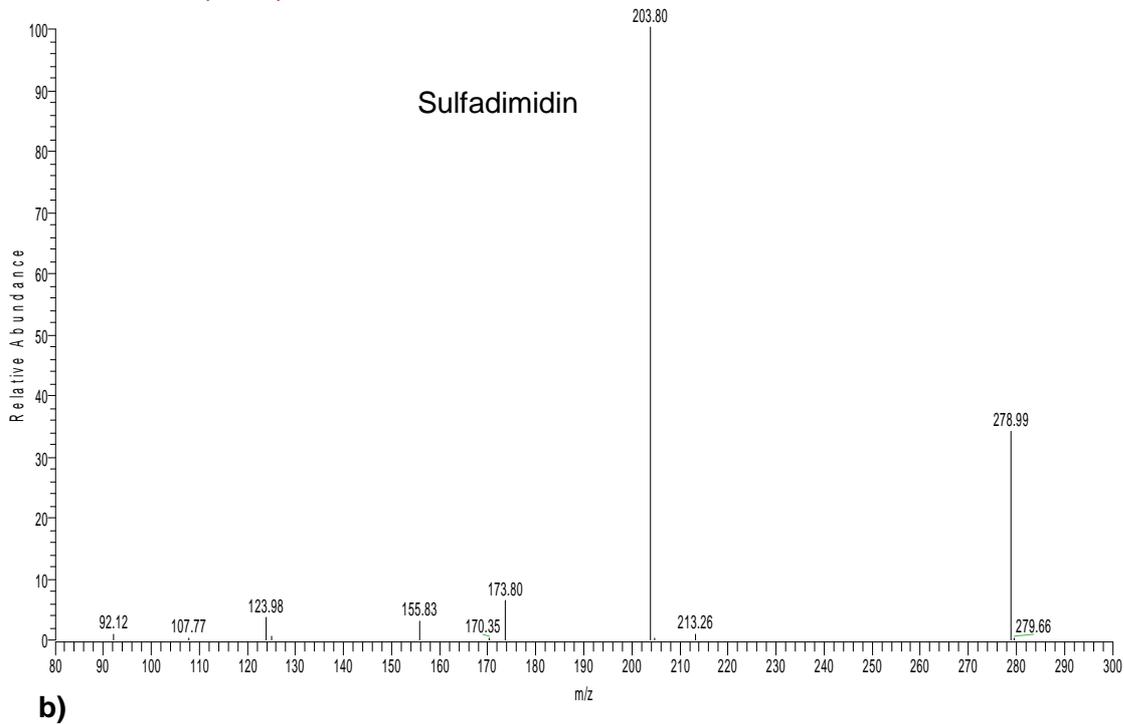
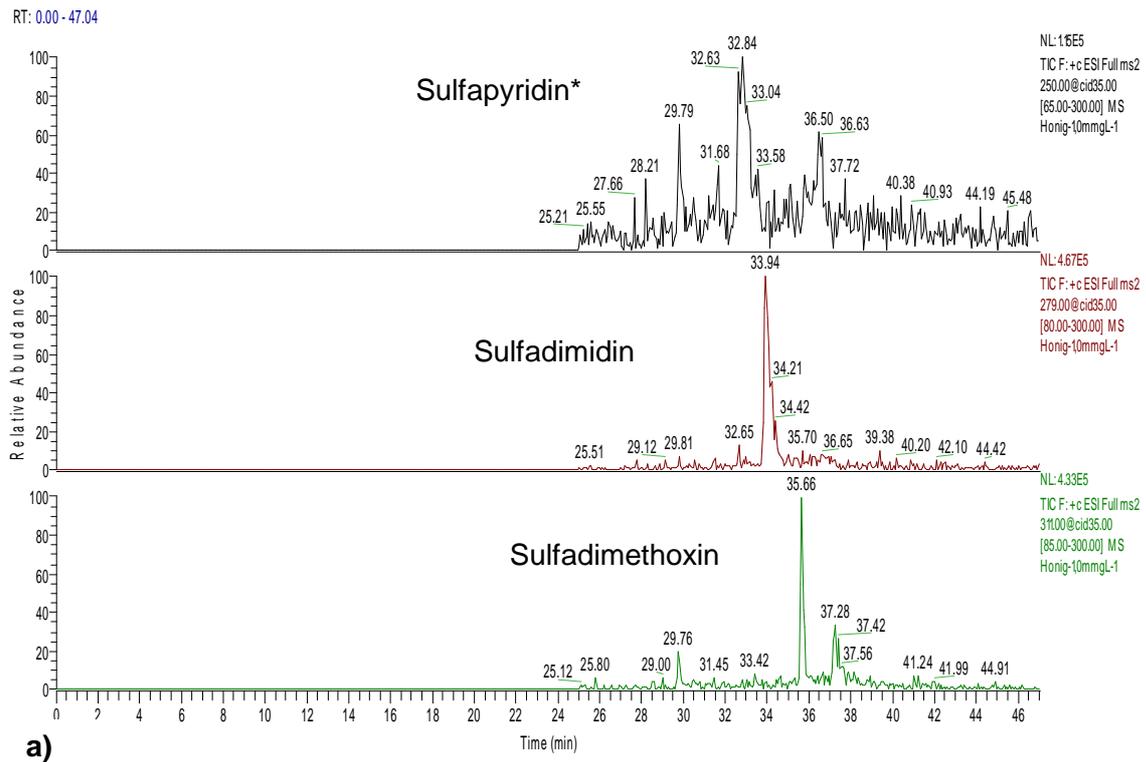


Abb. 40: MS-Chromatogramme **a)** eines 1 mg/L Sulfonamid-Mischstandards (mit Online-SPE-Kartusche, Fullscan-Modus, LCQ); **b)** MS-Spektrum des Sulfadimidins

8 Ergebnisse und Diskussion

E:\lines\Messungen\250908\Honig-1,0mmg/L-1

10/2/2008 09:00:57



Honig-1,0mmg/L-1 #1982 RT: 34.01 AV: 1 NL: 2.57E5
 F: +c ESI Full ms2 279.00@cid35.00 [80.00-300.00]

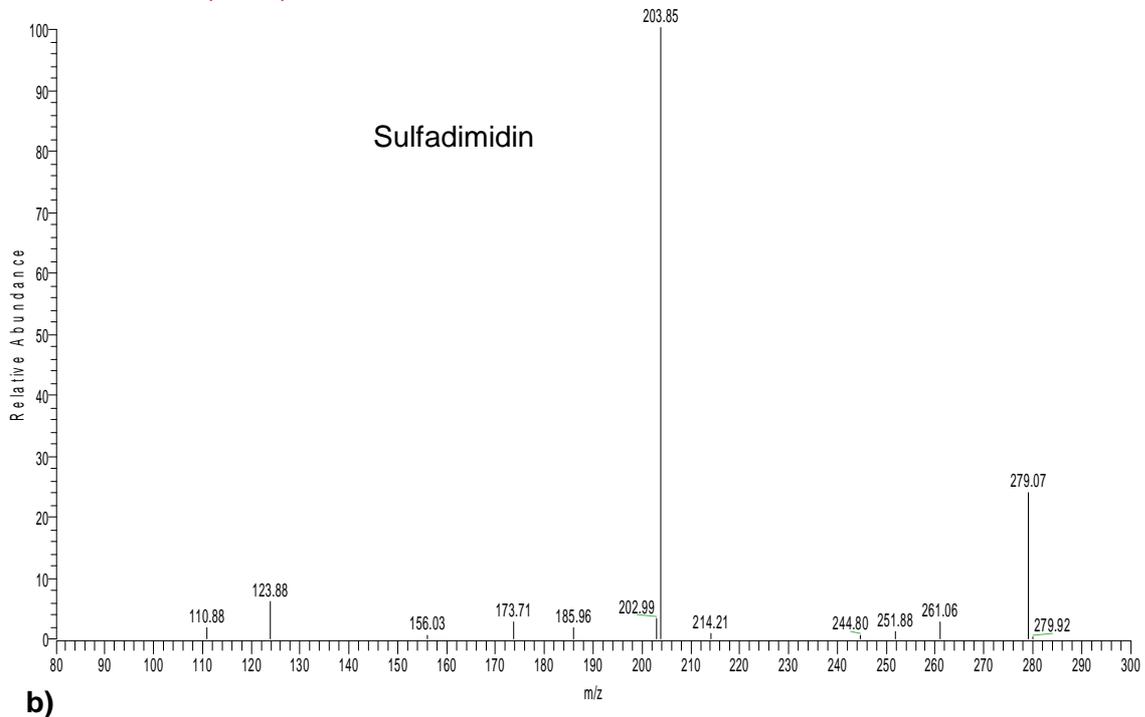


Abb. 41: MS-Chromatogramme eines a) mit jeweils 100 µg Sulfonamid /kg dotierten Honigs (mit Online- SPE-Kartusche, Fullscan-Modus, LCQ) b) MS-Spektrum des Sulfadimidins; * keine Identifizierung für Sulfapyridin möglich

Grund für die schlechte Wiederfindung des Sulfapyridins ist eine unzureichend starke Wechselwirkung des Analyten mit dem SPE-Kartuschenmaterial. Sulfapyridin ist aufgrund des unsubstituierten Pyridinringes etwas basischer (pKs 8,4) als Sulfadimidin (pKs 7,4) bzw. Sulfadimethoxin (pKs 5,9). Vermutlich wirkt sich der etwas größere pKs-Wert nachteilig auf die Anreicherung an die Festphase aus [130,132,135].

Die Leistungsfähigkeiten des entwickelten Online-LC-MS Verfahrens zum Nachweis von Sulfonamidrückständen in Honig und der manuellen Festphasenextraktion wurden verglichen. Dazu wurde ein Akazienhonig, der frei von Sulfonamidrückständen war, mit Sulfapyridin, Sulfadimidin und Sulfadimethoxin dotiert und der jeweiligen Probenvorbereitung unterzogen. Anhand der Wiederfindung, der relativen Standardabweichung und der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde ein Leistungs-Vergleich der Methoden möglich. In Tab. 17 sind die entsprechenden Verfahrenskenndaten für jede Probenvorbereitungs- und Analysetechnik dargestellt.

Tab.17: Vergleich: Manuelle SPE – Online-SPE; Wiederfindung (WF), relative Standardabweichung s_{rel} , Nachweis- und Bestimmungsgrenze (NWG: S/N 3:1; BG: S/N: 10:1) berechnet bzw. abgeschätzt anhand von Standardlösungen (1 mg/L, n=3) und eines dotierten Akazienhonigs (1 mg/kg, n=3); Std: Standard

Sulfonamid	Manuelle SPE					Online-SPE				
	WF [%]	S_{rel} [%]		NWG [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	BG [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	WF [%]	S_{rel} [%]		NWG [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	BG [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
		Std	Dot. Honig				Std	Dot. Honig		
Sulfapyridin	85,1	11,7	10,6	30,0	90,0	34,1	6,1	5,0	130,0	400,0
Sulfadimidin	76,8	7,5	12,1	10,0	30,0	24,8	8,0	3,2	120,0	360,0
Sulfadimethoxin	102,3	11,7	4,8	5,0	15,0	71,7	7,4	7,4	80,0	240,0

Die Implementierung der Online-SPE in das bestehende LC-MS-System (LCQ) führte zu einer erhöhten Präzision der Messwerte aber auch zu geringeren Wiederfindungen und höheren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Im ersten Schritt wurde der Probenextrakt mit Hilfe einer Online-SPE weiter aufgereinigt, bevor die chromatographische Trennung und MS-Detektion erfolgt. Die Honigproben wurden per manueller SPE extrahiert, das Eluat eingedampft und der verbleibende Rückstand in einem geeigneten Lösungsmittelgemisch (Laufmittel A/B: 90/10 v/v) wieder gelöst. Bei dieser Probenvorbereitung wurden die Analyten, bevor die Online-SPE erfolgt, angereichert (Faktor 10). Die Voranreicherung entfällt bei der direkten Aufgabe eines 10 mL-Probenvolumens auf eine Online-SPE-Kartusche mit größerer Kapazität (Faktor 10 größer dimensioniert). Es zeigte sich bei der Anwendung einer größeren Probenschleife, dass die Wiederfindung gegenüber der herkömmlichen Methode geringer ist. Um die Wiederfindung zu verbessern, sollten weitere

SPE-Materialien getestet sowie das Schaltprogramm der Spülschritte, Konditionierung und Elution angepasst werden. Die instrumentelle Kopplung von Online-SPE Modulen in die LC-MS-Systeme ist erfolgreich abgeschlossen worden. Die Arbeiten am LCQ-Iontrap Massenspektrometer bildeten die Grundlage für weitere Entwicklungsarbeiten. Die Übertragung der entwickelten Methoden von dem LCQ auf das LTQ ist möglich. Das System zur weiteren Aufreinigung von bereits angereicherten Messproben konnte somit auf die Analytik der Sulfonamide, Tetracycline, Fluorchinolone u.a. angewendet werden. Für den Nachweis von Chloramphenicol ist durch Integration eines SP2000 Online-SPE-Moduls eine Aufreinigung der Flüssig-Flüssig-Extrakte im Rahmen des Monitoringprogramms möglich.

Der Vergleich mit Online-SPE-Verfahren zum Nachweis von Antibiotika und Pestiziden in Wasser zeigt ähnliche Reproduzierbarkeiten aber schlechtere Wiederfindungen. Das von Choi et al. [235] entwickelte Verfahren für die Analyse von Sulfonamiden und Tetracyclinen in Wasser weist Wiederfindungen von 74,3 bis 116,5 % auf. Die Reproduzierbarkeit betrug 1 bis 12,4 %. Feitosa-Felizzola et al. [231] haben in ihren Analysen von zwölf verschiedenen Antibiotika in Wasser Wiederfindungen von 40 bis 120 % und Standardabweichungen von 5 bis 25 % ermittelt. In Abwässern wurden von Stoob et al. [237] Sulfonamide und Pestizide mittels Online-SPE-LC-MS nachgewiesen. Die Wiederfindung reicht von 85 bis 112 %, die Standardabweichung von 8 bis 15 %. Die schlechteren Wiederfindungen im Vergleich mit den Literaturdaten resultieren nicht zuletzt an der unterschiedlichen Matrix. Wasseranalytik (z.B. Überwachung von Trinkwasser) gestaltet sich durch Abwesenheit komplexer organischer Bestandteile wesentlich einfacher und sorgt für gute Wiederfindungen der Analyten. Der Vergleich zeigt aber auch, dass die Reproduzierbarkeit bei den automatisierten SPE Analysen besser ist, als die der manuellen Vorbereitung.

8.2 Methodenentwicklung (LTQ)

Die Methodenentwicklung mit dem linearen Ionenfallen-Massenspektrometer System LTQ wird im folgendem vorgestellt. Die Einzelmethode zum Nachweis von Antibiotikarückständen in Honig bilden die Bausteine für das Monitoringsystem.

8.2.1 Tetracycline

Bei der Analytik der Tetracycline konnte auf bereits entwickelte Methoden und Grundlagen der Probenvorbereitung zurückgegriffen werden [41-43,66,80]. Eine Methode zum Screening von Tetracyclinen und Sulfadiazin in Boden und Pflanzen [66] diente als Basis für die Auswahl der stationären und mobilen Phasen. Die Probenvorbereitung wurde auf die Matrix Honig angepasst und ist in Form einer Standard Operation Procedure (SOP) im Anhang 2 aufgeführt. Die Festphasenextraktion erfolgte mit einer Oasis-HLB Kartusche, die Chromatographie mit einer YMC ODS-AM Säule. Das Gradientenprogramm ist in Tab. 18 wiedergegeben.

Tab. 18: HPLC-Bedingungen und Gradientenprogramm zur chromatographischen Trennung der Tetracycline

LC-Bedingungen	Zeit [min]	% A*	% B*
0,2 mL/min 20 µL Inj. Volumen YMC ODS-AM, 150 x 3,0 mm i.D. Vorsäule: YMC ODS, 20 x 3,0 mm, 3 µm	0,0	90	10
	1,5	90	10
	10,0	60	40
	17,0	0	100
	21,0	0	100
	24,0	90	10
	35,0	90	10

* Zusammensetzung der Laufmittel A und B siehe Kapitel 10.3, Seite 154

Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, Sulfonamide und Tetracycline innerhalb eines chromatographischen Laufes zu erfassen. Durch Kombination der Methoden können aber die optimalen massenspektrometrischen Parameter einer bestimmten Substanzklasse nicht verwendet werden, was in diesen Methoden zu Empfindlichkeitsverlusten führen kann. Im Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit wurde deshalb darauf verzichtet. Durch die entwickelte LC-MS Methode können insgesamt 20 verschiedene Tetracycline inklusive Epimere, Tautomere und Isomere erfasst werden (vgl. Tab. 19).

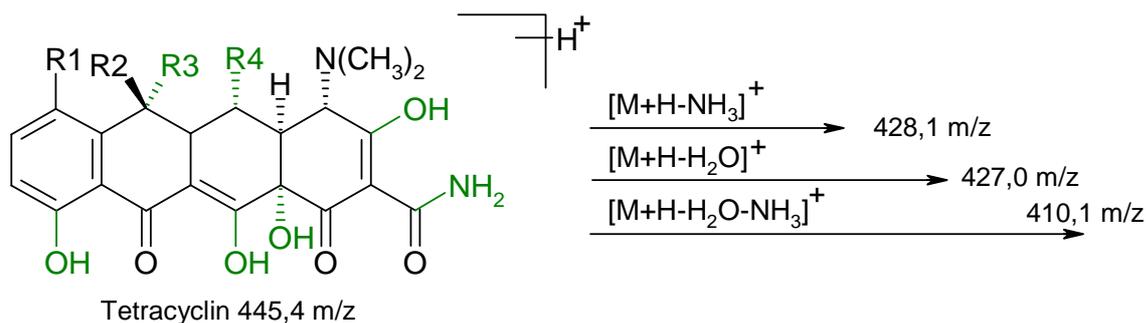
Tab. 19: LTQ-Massenzahlen, charakteristische Fragmente und Retentionszeiten von verschiedenen Tetracyclinen; HPLC-Bedingungen vgl. Tab. 18

Analyt (chem. Formel)	Abk.	M _r (g/mol)	Quasi- molekül- ionen (m/z)	Stoß- energie (%)	Produkt- ionen (m/z)	t _R [min]
Anhydro- tetracyclin (C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₇)	ATC	426,1	427,1	15	410,1 (100%)	19,41
4-epi-Anhydro- tetracyclin (C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₇)	epi- ATC	426,1	427,1	15	410,1 (100%)	18,38
Anhydrochlor- tetracyclin (C ₂₂ H ₂₁ ClN ₂ O ₇)	ACTC	497,3	461,1	16	444,0 (100%)	21,38
4-epi- Anhydrochlor- tetracyclin (C ₂₂ H ₂₁ ClN ₂ O ₇)	epi- ACTC	497,3	461,1	16	444,0 (100%)	19,74
α-Apo- Oxytetracyclin (C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₉)	α-Apo- OTC	442,1	443,1	15	426,0 (100%)	12,03
β-Apo- Oxytetracyclin (C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₉)	β-Apo- OTC	442,1	443,1	15	426,0 (100%)	19,64
Chlortetracyclin (C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈)	CTC	478,9	479,1	16	444,0 (15%) 462,0 (100%)	17,30
4-epi-Enol- Chlortetracyclin (C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈)	epi- Enol- CTC	478,9	479,1	16	444,0 (80%) 462,0 (100%)	15,68
4-epi-Keto- Chlortetracyclin (C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈)	epi- Keto CTC	478,9	479,1	16	444,0 (<5%) 462,0 (100%)	13,61
Iso- Chlortetracyclin (C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈)	Iso- CTC	478,9	479,1	16	462,0 (100%)	14,84
4-epi-Iso- Chlortetracyclin (C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈)	epi- Iso- CTC	478,9	479,1	16	462,0 (100%)	13,16
Demeclocyclin (C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈)	DMC	464,9	465,8	17	448,0 (100%) 430,0 (15%)	15,36
4-epi- Demeclocyclin (C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈)	epi- DMC	464,9	465,8	14	448 (100%) 430 (10%)	13,98
Doxycyclin (C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₈)	DC	444,4	445,4	16	428,1 (100%)	17,92
6-epi- Doxycyclin (C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₈)	epi- DC	444,4	445,4	14	428,1 (100%)	17,60
Tetracyclin (C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₈)	TC	444,4	445,4	24	410,1 (10%) 427,0 (60%) 428,1 (100)	11,95

Fortsetzung der Tab. 19

Analyt (chem. Formel)	Abk.	M _r (g/mol)	Quasi- molekül- ionen (m/z)	Stoß- energie (%)	Produkt- ionen (m/z)	t _R [min]
4-epi- Tetracyclin (C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₈)	epi- TC	444,4	445,4	14	427,1 (100%) 410,1 (25%)	13,44
Methacyclin (C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₈)	Me TC	442,1	443,1	15	426,1 (100%) 398,0 (5%)	13,96
Oxytetracyclin (C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₉)	OTC	460,4	461,4	19	426,0 (5%) 444,1 (100%)	12,04
4-epi- Oxytetracyclin (C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₉)	epi- OTC	460,4	461,4	17	426,0 (55%) 444,1 (100)	11,64

Die Fragmentierung ist gekennzeichnet durch Abspaltung der unspezifischen Moleküle Wasser und Ammoniak (vgl. Abb. 42). In der Abbildung sind die Amino- und Hydroxyfunktionen grün markiert. Für das Quasimolekülion $[M+H]^+$ von Tetracyclin sind beispielhaft die Produktionen angegeben.



R= Rest

R3 = OH: Tetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Oxytetracyclin, Doxycyclin

R4 = OH: Oxytetracyclin, Doxycyclin

Abb. 42: Abgangsgruppen bei der Fragmentierung von Tetracyclinen im positiven ESI-Modus [39]

Ein Mittel zur Absicherung eines positiven Antibiotika-Befundes in Honig ist ein MS³-Scan. Falsch-Positiv-Befunde, die von Matrixeinflüssen des Honigs hervorgerufen werden, lassen sich damit vermeiden. Mit Hilfe des MS³-Scans lassen sich auch Epimere wie zum Beispiel das Demeclocyclin und das epi-Demeclocyclin sicher anhand der MS³-Spektren unterscheiden. In Abb. 43 und 44 sind die Chromatogramme und MS²- und MS³-Spektren von Demeclocyclin bzw. 4-epi-Demeclocyclin (Mischstandardlösung 1 mg/L) zu sehen. Deutlich zu erkennen ist, dass sich die MS²-Spektren der beiden Tetracycline nicht unterscheiden. Erst der MS³-Scan liefert die notwendigen Informationen für eine sichere Unterscheidung.

8 Ergebnisse und Diskussion

c:\daten\...1210806\demeclocyclin

21.08.2006 20:27:06

Demeclocyclin

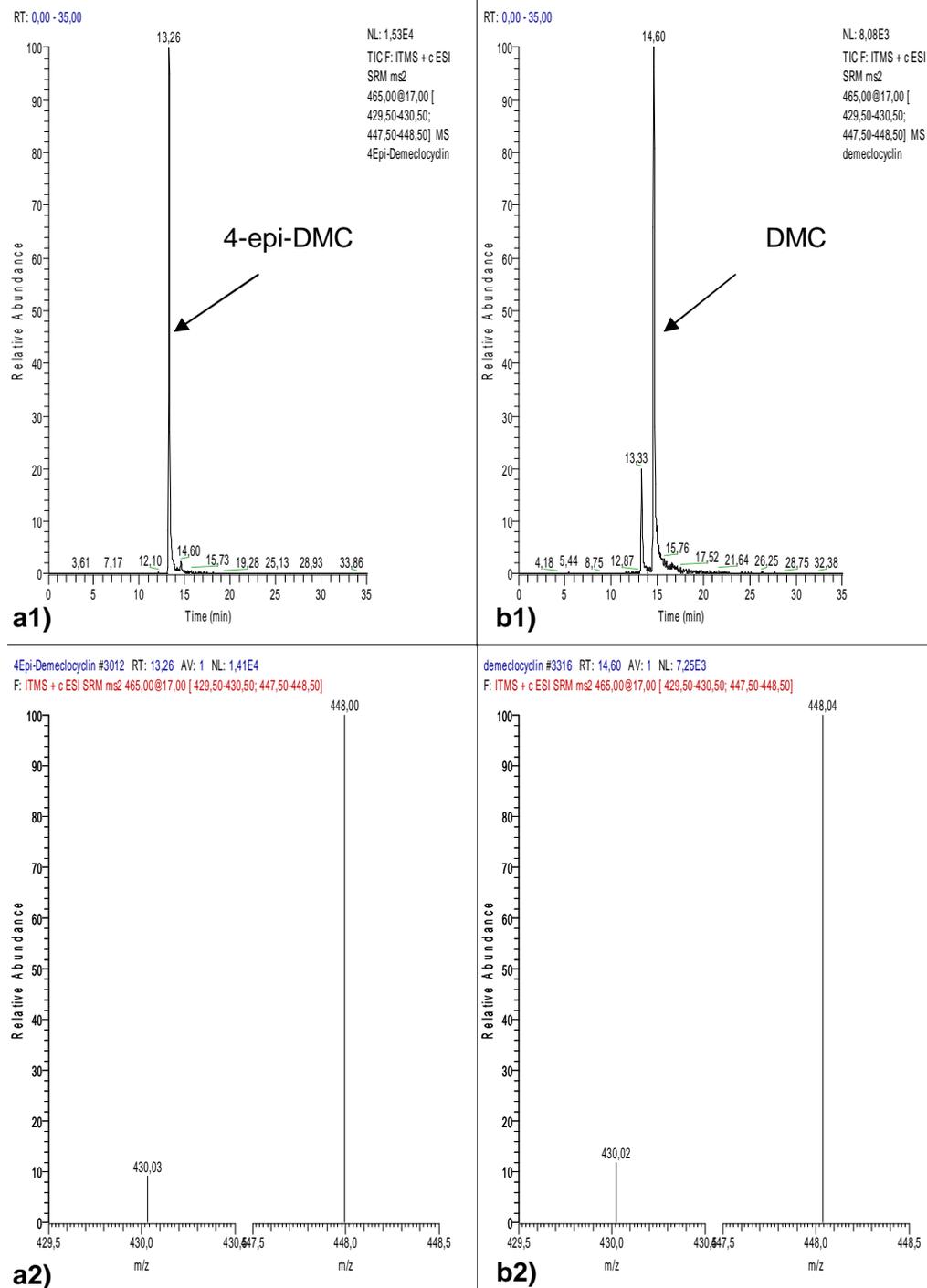


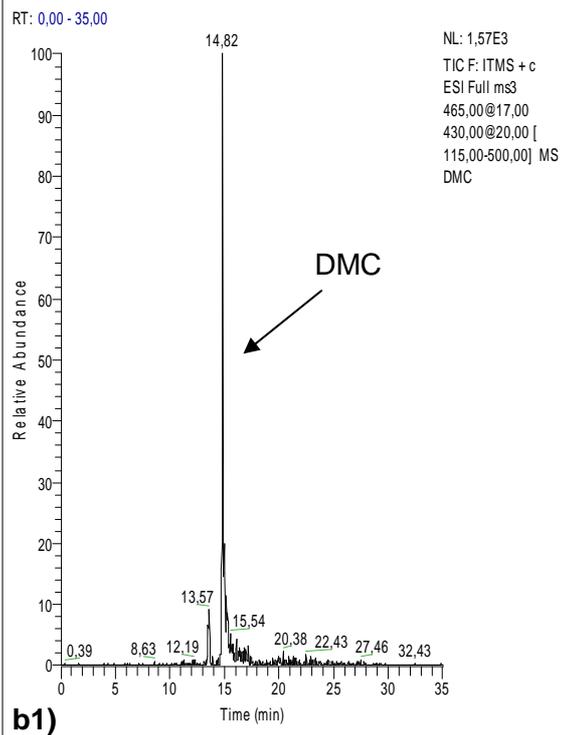
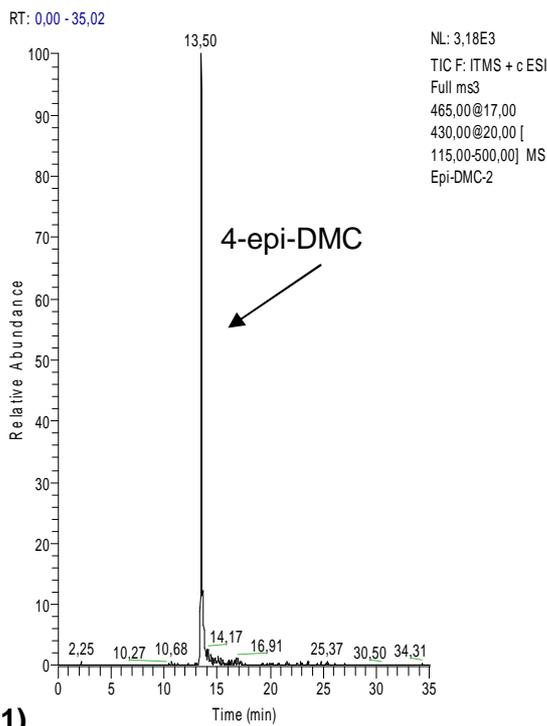
Abb. 43: MS-Chromatogramme und MS²-Spektren von **a1) & a2)** Demeclocyclin (DMC) und **b1) & b2)** epi-Demeclocyclin (4-epi-DMC); (Mischstandardlösung 1 mg/L); LTQ, 35 min Gradient vgl. Tab. 18

8 Ergebnisse und Diskussion

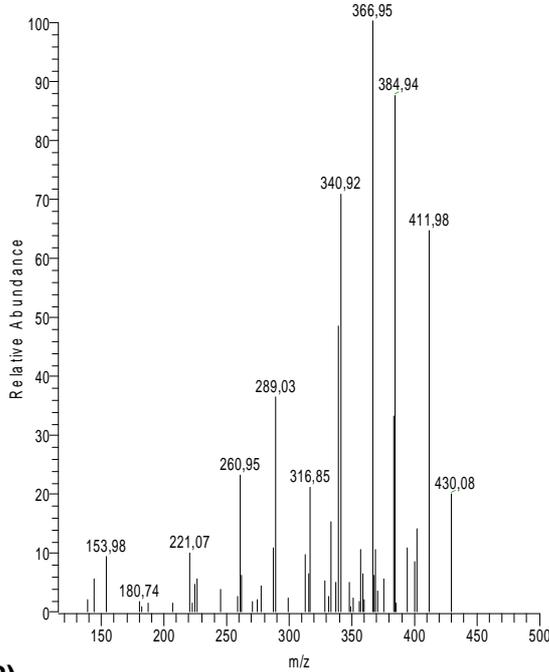
C:\Daten\...\Ok06\311006\Epi-DMC-2

31.10.2006 11:00:22

Epi-DMC-2



Epi-DMC-2 #2576 RT: 13,50 AV: 1 NL: 4,46E2
F: ITMS + c ESI Full ms3 465,00@17,00 430,00@20,00 [115,00-500,00]



DMC #2828 RT: 14,82 AV: 1 NL: 5,66E2
F: ITMS + c ESI Full ms3 465,00@17,00 430,00@20,00 [115,00-500,00]

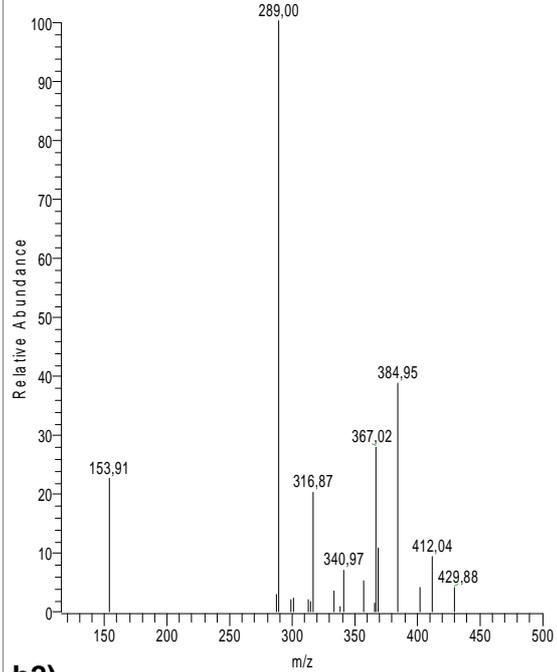


Abb. 44: MS-Chromatogramme und MS³-Spektren von a1) & a2) Demeclocyclin (DMC) und b1) & b2) epi-Demeclocyclin (4-Epi-DMC); (Mischstandardlösung 1 mg/L); LTQ, 35 min Gradient vgl. Tab. 18

Die MS-Chromatogramme einer Tetracyclin-Mischstandardlösung (100 µg/L) sind in Abb. 45 aufgeführt. Fast alle Tetracycline konnten unter Verwendung der YMC-Trennsäule Basislinien getrennt werden, bis auf Doxycyclin und das entsprechende Epimer.

8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...310507_Kalibration\100_Std1
100µg/L

01.06.2007 09:54:30

100_Std1

RT: 0,00 - 35,01

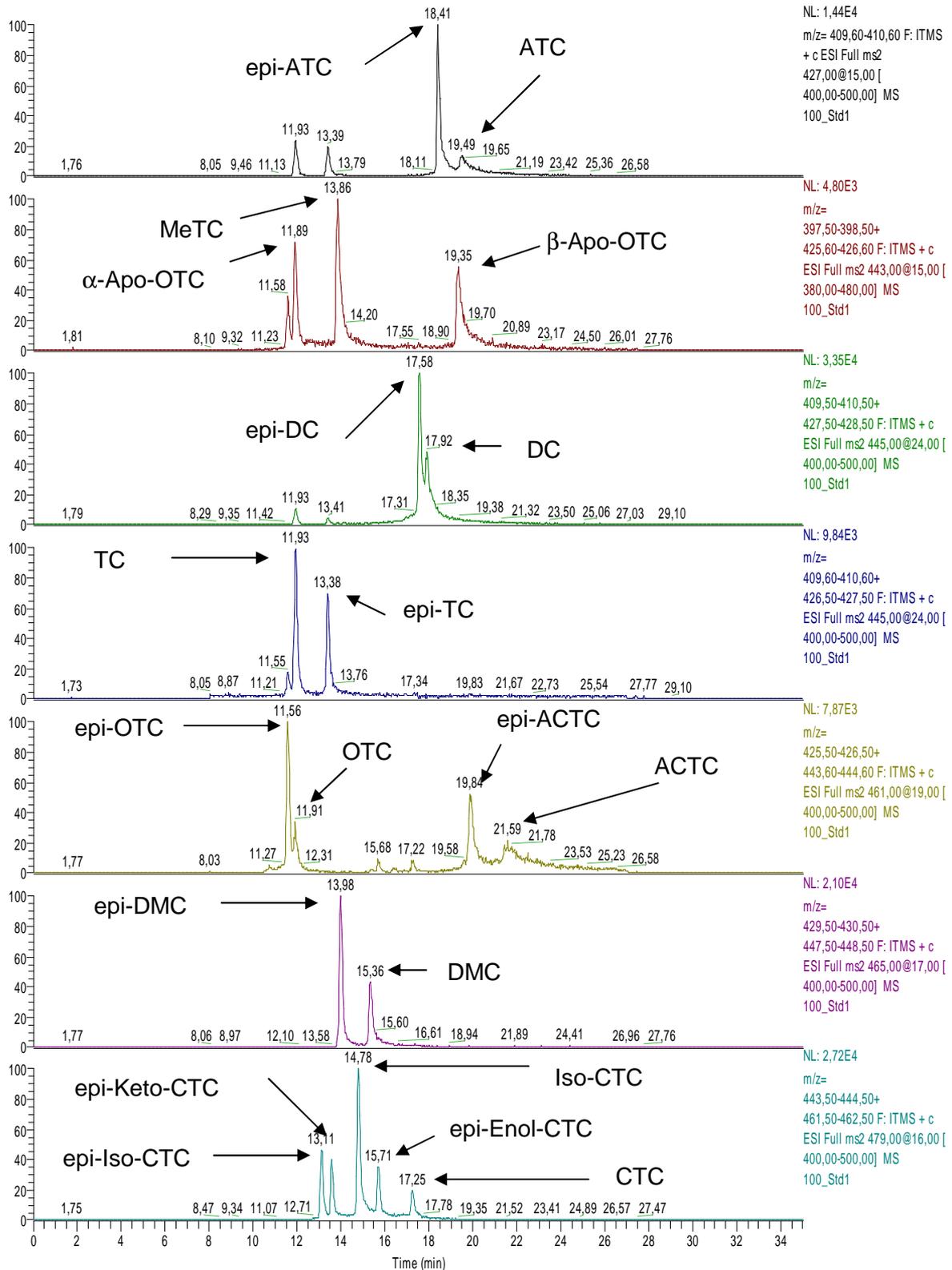


Abb. 45: MS-Chromatogramme (Full-Scan-Modus) einer Tetracyclin-Mischstandardlösung 100 µg/L; LTQ, 35 min Gradient vgl. Tab. 18

Die Probenvorbereitung wurde kombiniert mit der Extraktion von Sulfonamiden und Trimethoprim durchgeführt. Die fertigen Messextrakte wurden zuerst auf Gehalte von Tetracyclinen hin untersucht, dann auf Sulfonamide. In der Praxis wurden dazu zwei Analysendurchläufe programmiert und diese nacheinander von der LC-MS Software Xcalibur abgearbeitet. Aus einem Autosamplervial wurde für die beiden verschiedenen Methoden jeweils einmal ein Aliquot injiziert. Es entfällt eine zusätzliche Extraktion und dadurch konnten Chemikalienkosten gesenkt und Zeit eingespart werden.

Die Analytik deckt im Unterschied zu publizierten Methoden [71,95,96,99,109,110,117,123] zum Nachweis von Tetracyclinen in Honig ein breiteres Spektrum an Analyten ab. Methoden wie von Casado-Terrones et al. [117] und Oka et al. [109,110], die Elektrophorese und HPLC-UV Verfahren zum Nachweis von Tetracyclinen in Honig entwickelten, sind aufgrund der hohen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NWG: 20 bis 50 µg/kg, BG: 50 bis 100 µg/kg) nicht in der Lage, Analyte im Konzentrationsbereich der Mindestleistungsgrenze von 10 µg/kg zu detektieren. Aktuelle Verfahren beinhalten die Detektion mit dem empfindlicheren Massenspektrometer. Hauptaugenmerk liegt dabei auf den beiden Tetracyclinen Oxytetracyclin und Tetracyclin [71,95,123]. Das Nachweisvermögen cc_{α} (Definition vgl. Kap. 8.3.3) 20-21 µg/kg und die Erfassungsgrenze cc_{β} (Definition vgl. Kap. 8.3.3) 49-50 µg/kg für den Nachweis von Oxytetracyclin und Tetracyclin in Honig mittels LC-MS liegen nach Pena et al. [71] noch etwas über den definierten Mindestleistungsgrenzen. Die Wiederfindung betrug 87 %, die Standardabweichung 1,8-2,1 %. Neuere Veröffentlichungen zur Tetracyclinanalytik in Honig zeigen, dass durch den Einsatz der Festphasenextraktion und Analyse mittels LC-MS die Mindestleistungsgrenzen erfüllt werden können. So können mit der Methode von Carrasco-Panorbo et al. [96] acht Tetracycline in Honig quantifiziert werden. Die Nachweisgrenze variiert je nach Substanz zwischen 0,05 und 0,76 µg/kg. Huq et al. [123] stellen eine Methode vor, mit der Oxytetracyclin und Tetracyclin in Honig analysiert wird. Die Wiederfindung beträgt 102 bzw. 107 %, die relative Standardabweichung 3,8 bzw. 7,0 µg/kg. Als interner Standard wird Chlortetracyclin genutzt. Dies ist als Nachteil zu werten, da durch diese Maßnahme CTC-Positivbefunde nicht detektiert werden können. Khong et al. [95] haben eine Methode entwickelt, die den Nachweis der Epimere der Tetracycline beinhaltet, aber die Isomere und weitere Antibiotika wie die Apo-Oxytetracycline auslässt.

Die Verfahrenskenndaten der eigenen Methodenentwicklung zur Tetracyclinanalytik sind ausführlich in Kap. 8.3.6 (Tab. 39) und im Anhang 3 dargestellt. Die Wiederfindung liegt zwischen 17,7 % (β -Apo-Oxytetracyclin) und 125 % (epi-Iso-Chlortetracyclin). Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Nachweisvermögen und Erfassungsgrenze liegen bis auf wenige Ausnahmen unterhalb der geforderten Mindestleistungsgrenze von 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ausnahmen bilden das epi-Anhydrochlortetracyclin mit einer Nachweisgrenze von 15,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und das epi-Iso-Chlortetracyclin mit 19,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Die Verfahrensstandardabweichung beträgt 2,9 % für das Iso-Chlortetracyclin und im Maximum 11 % für epi-Iso-Chlortetracyclin.

Die entwickelte Analysenmethode ist nach heutigem Stand der Analytik das umfangreichste Einzelverfahren zum simultanen Nachweis von Tetracyclinen in Honig. Die Validierungskenndaten zeigen die Leistungsfähigkeit der Methode. Im Vergleich zu bestehenden Methoden liegen die Nachweis- und Bestimmungsgrenze, die Wiederfindung und die Reproduzierbarkeit auf annähernd vergleichbarem Niveau.

8.2.2 Sulfonamide und Trimethoprim

Bei der Entwicklung der Analysenmethode zum Nachweis von Sulfonamiden und Trimethoprim konnte auf bereits gewonnene Erkenntnisse [41-43,66] zurückgegriffen werden. Es gelang, die entwickelten Messbedingungen von dem LCQ-Ionenfallen-Massenspektrometer auf die lineare LTQ-Ionenfalle zu übertragen und die Analyse um weitere Sulfonamide zu erweitern. Ausgehend von Sulfadiazin wurden zwölf weitere Sulfonamide und Trimethoprim in die Analysenmethode integriert. Die Dauer einer Messung wurde um 15 min durch Anpassen des Gradientenprogramms auf 20 min verkürzt. In Tab. 20 sind die chromatographischen Bedingungen wiedergegeben.

Tab. 20: HPLC-Bedingungen und Gradientenprogramm zur chromatographischen Trennung der Sulfonamide und Trimethoprim

LC-Bedingungen	Zeit [min]	% A	% B
0,2 mL/min 20 µL Inj. Volumen YMC ODS-AM, 150 x 3,0 mm i.D. Vorsäule: YMC ODS, 20 x 3,0 mm, 3 µm	0,0	90	10
	1,0	60	40
	6,0	0	100
	12,0	0	100
	15,0	90	10
	20,0	90	10

* Zusammensetzung der Laufmittel A und B siehe Kapitel 10.3, Seite 154

Die Analyten wurden mittels einer Festphasenextraktion (Oasis HLB-Kartuschen) manuell angereichert. Die einzelnen Schritte der Probenvorbereitungstechnik zur Analyse von Sulfonamiden und Trimethoprim in Honig sind in Anhang 2 dargestellt. Ein wichtiger Schritt der Probenvorbereitung ist die saure Hydrolyse der matrix-gebundenen Sulfonamide durch geeignete Puffersysteme (Citratpuffer pH 4,1) [151,152]. Die Tab. 21 gibt die massenspektrometrischen Bedingungen der Analyse von Sulfonamiden und Trimethoprim in Honig wieder.

Tab. 21: LTQ-Massenzahlen, charakteristische Fragmente und Retentionszeiten von Sulfonamiden und Trimethoprim; HPLC-Bedingungen vgl. Tab. 20

Analyt (chem. Formel)	Abk.	M _r (g/mol)	Quasi- molekül- ionen (m/z)	Stoß- energie (%)	Produkt- ionen (m/z)	t _R [min]
Sulfaguanidin (C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₂ S)	SGD	214,2	215,0	24	122,0 (5%) 156,0 (100%) 173,0 (10%)	5,25
Sulfapyridin (C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S)	SPD	249,3	250,0	26	92,0 (5%) 108,0 (10%) 156,0 (100%) 184,0 (60%)	8,89
Sulfadiazin (C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S)	SFD	250,3	251,0	27	92,0 (10%) 108,0 (10%) 156,0 (100%)	9,11
Sulfameth- oxazol (C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S)	SMOAZ	253,3	254,0	26	92,0 (5%) 108,0 (10%) 147,0 (60%) 156,0 (100%)	11,09
Sulfathiazol (C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂)	STZ	255,3	256,0	21	92,0 (5%) 108,0 (10%) 156,0 (100%) 190,0 (5%)	8,91
Sulfamerazin (C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S)	SMZ	264,3	265,0	25	92,0 (10%) 108,0 (15%) 156,0 (85%) 172,0 (100%)	9,47
Sulfamethizol (C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂)	SMTZ	270,3	271,0	21	92,0 (5%) 108,0 (5%) 156,0 (100%)	9,83
Sulfamethazin (Sulfadimidin) (C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S)	SDD	278,3	279,0	20	92,0 (5%) 108,0 (5%) 156,0 (10%) 186,0 (100%)	9,86
Sulfameter (C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S)	SM	280,3	281,0	24	92,0 (5%) 108,0 (20%) 156,0 (100%) 188,0 (90%)	10,31
Sulfamethoxy- pyridazin (C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S)	SMOPD	280,3	281,0	24	92,0 (5%) 108,0 (15%) 156,0 (100%) 188,0 (25%)	9,87
Sulfachloro- pyridazin (C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S)	SCPD	284,7	285,0	20	92,0 (5%) 108,0 (10%) 156,0 (100%)	10,79
Sulfadimethoxin (C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S)	SDM	310,3	311,0	22	92,0 (5%) 108,0 (10%) 156,0 (100%) 218,0 (45%)	11,78
Sulfadoxin (C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S)	SDX	310,3	311,0	22	92,0 (5%) 108,0 (15%) 156,0 (100%) 245,0 (10%)	10,80

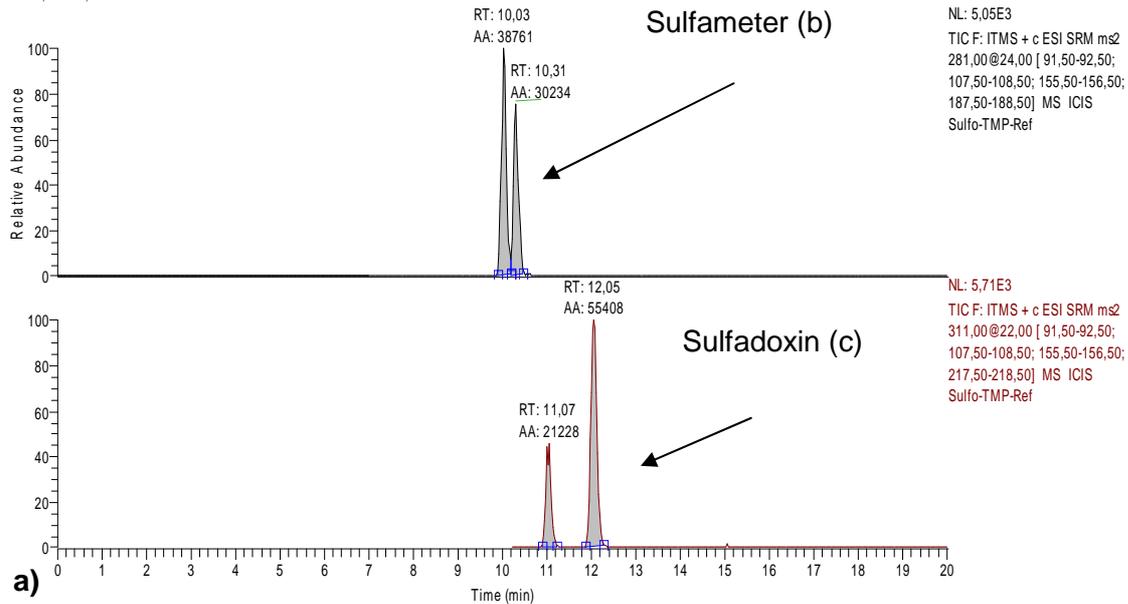
8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...\Juli07\050707\Sulfo-TMP-Ref

05.07.2007 07:39:21

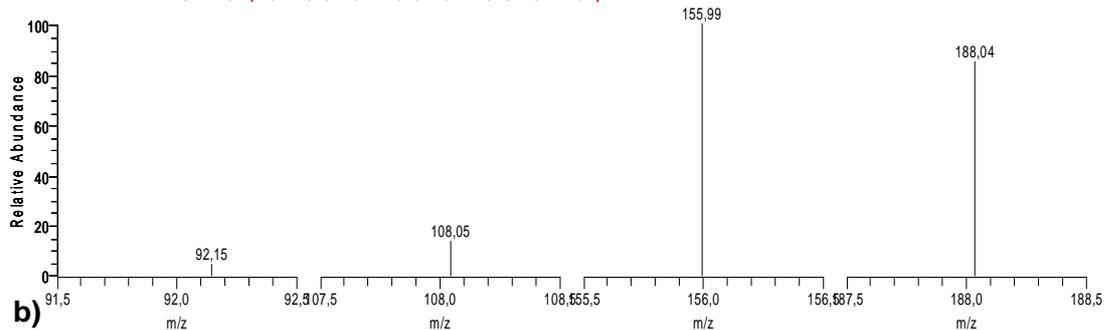
Sulfo-TMP-Ref

RT: 0,00 - 20,02



Sulfo-TMP-Ref #2266 RT: 10,34 AV: 1 NL: 1,48E3

F: ITMS + c ESI SRM ms2 281,00@24,00 [91,50-92,50; 107,50-108,50; 155,50-156,50; 187,50-188,50]



Sulfo-TMP-Ref #2642 RT: 12,05 AV: 1 NL: 3,62E3

F: ITMS + c ESI SRM ms2 311,00@22,00 [91,50-92,50; 107,50-108,50; 155,50-156,50; 217,50-218,50]

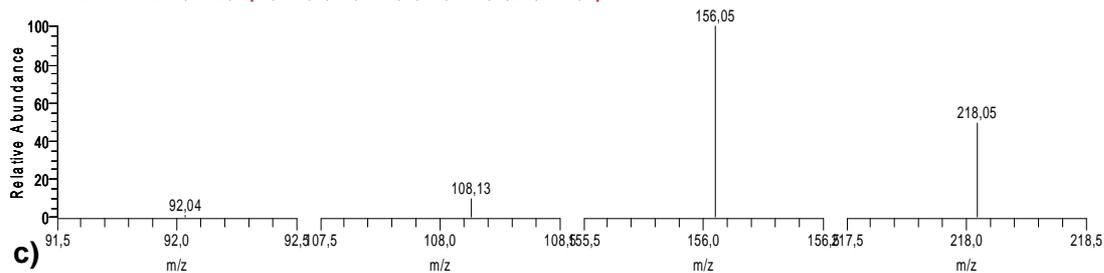


Abb. 46: MS-Chromatogramme (SRM, **a**) und Massenspektren (MS², **b** & **c**) eines Sulfonamid-Mischstandards (20 µg/L); LTQ, 20 min Gradient vgl. Tab. 20

Die Abb. 46 b und 46 c zeigen neben spezifischen Fragmentationen für jedes einzelne Sulfonamid auch die charakteristischen Ionen der Einzelkomponenten dieser Antibiotikasubstanzklasse. So ist immer eine Aufspaltung in die Fragmente mit den m/z-Verhältnissen 92, 108 und 156 zu beobachten (vgl. Abb. 47).

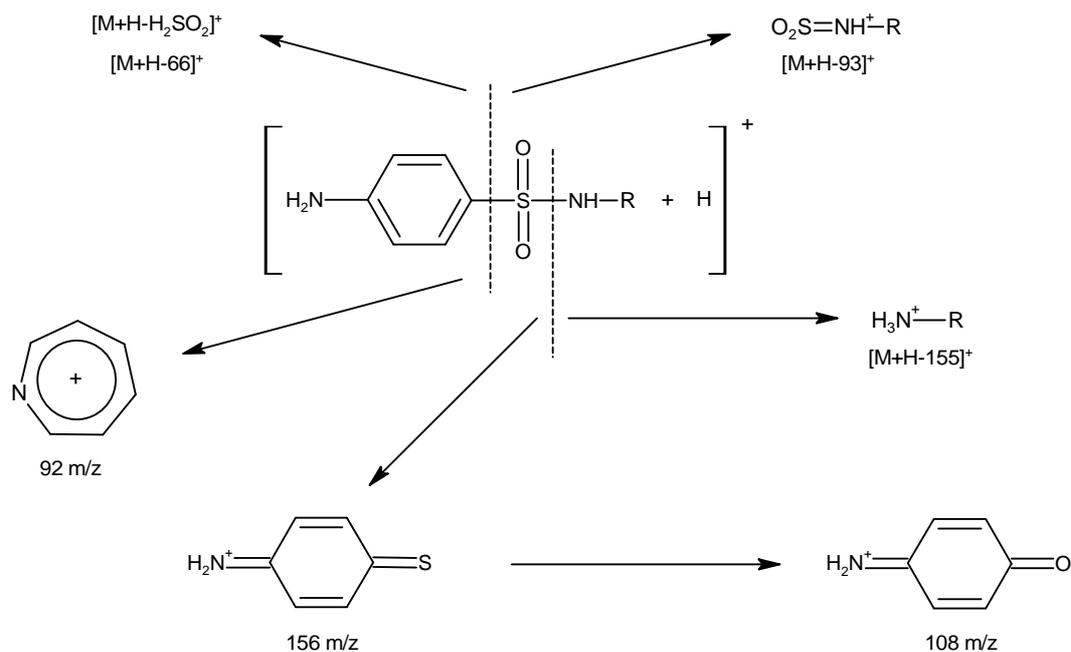


Abb. 47: Fragmentierung von Sulfamethizol im positiven ESI-Modus [39]

Nachfolgend sind die MS-Chromatogramme einer Mischstandardlösung und eines dotierten Honigs zu sehen. Bis auf das Sulfaguanidin (vgl. Abb. 49 a) sind alle Sulfonamide in dem dotierten Honig (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) zu identifizieren und quantitativ auswertbar. Die schlechte Wiederfindung des Sulfaguanidins in Honig ist auf dessen geringe Wechselwirkung mit der HLB-Phase der Oasis-Kartusche zurückzuführen. Als schwach basischer Analyt (pK_s 11) liegt er in der Citrat-Pufferlösung (pH 4,1) protoniert vor. Die Polarität des Sulfaguanidins wird maßgeblich von der Guanidinfunktion bestimmt. Um eine verbesserte Sorption mit dem unpolaren Sorbens zu erhalten, muss Sulfaguanidin ungeladen vorliegen. Dies kann durch Einstellen des pH-Wertes oberhalb des pK_s -Wertes erreicht werden [130,132,135,232]. Durch Einsatz anderer stationärer Phasen (schwache Kationenaustauscher) könnte auch die Wiederfindung verbessert werden aber auf Kosten der Wiederfindungsraten der anderen Analyten, die eine geringere Polarität aufweisen.

8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...280307\Sulfo-TMP-Ref01

28.03.2007 16:16:33

Sulfo-TMP-Ref01

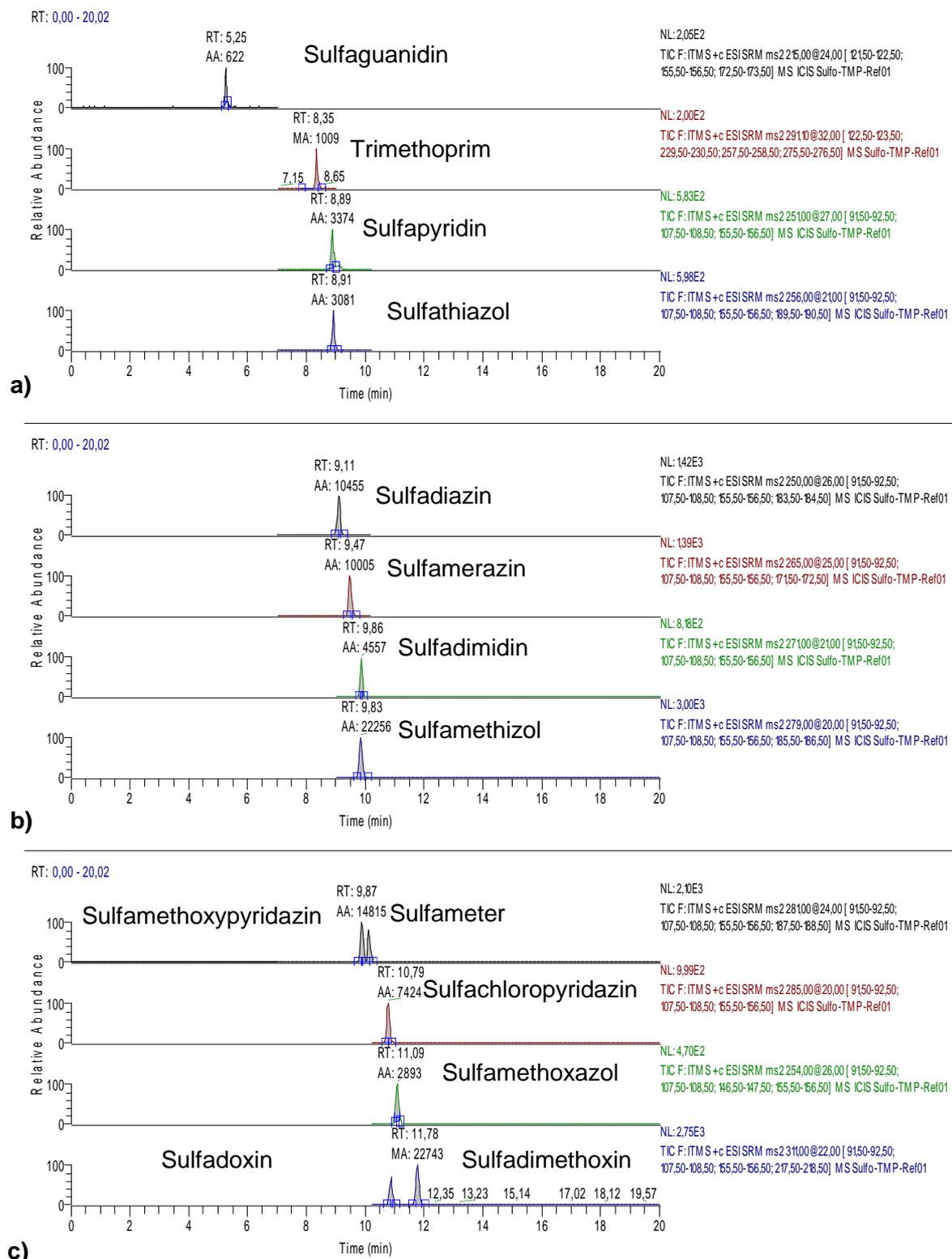


Abb. 48: MS-Chromatogramme **a) - c)** (SRM-Modus) der Sulfonamide und Trimethoprim (Mischstandardlösung 20 µg/L); LTQ, 20 min Gradient vgl. Tab. 20

8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...Maerz07\120307\E133998-dot

12.03.2007 22:26:28

E133998-dot

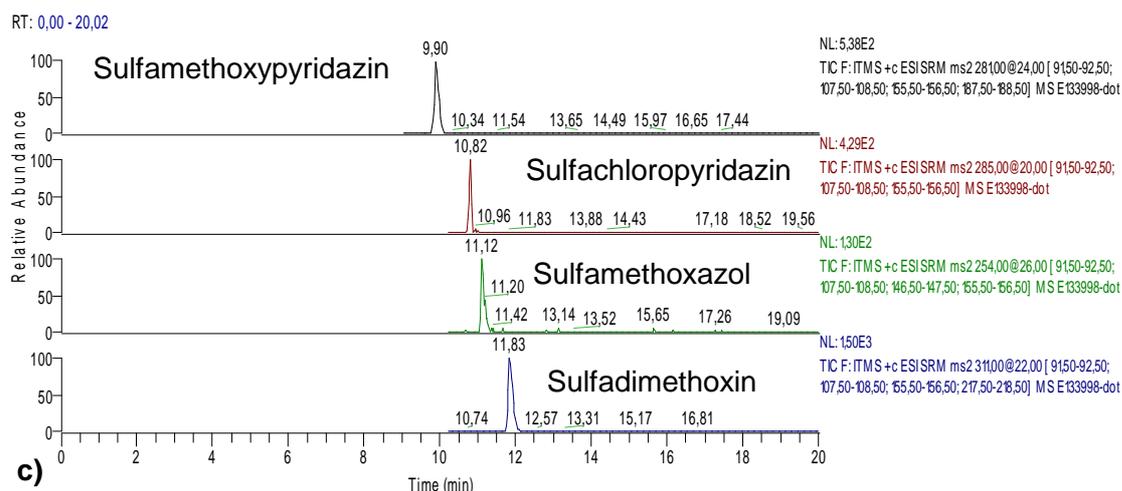
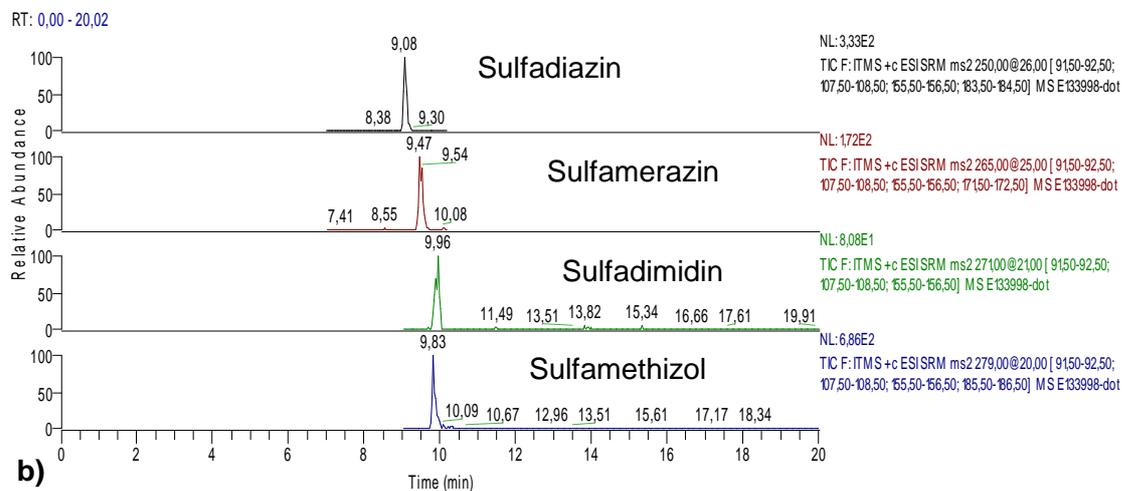
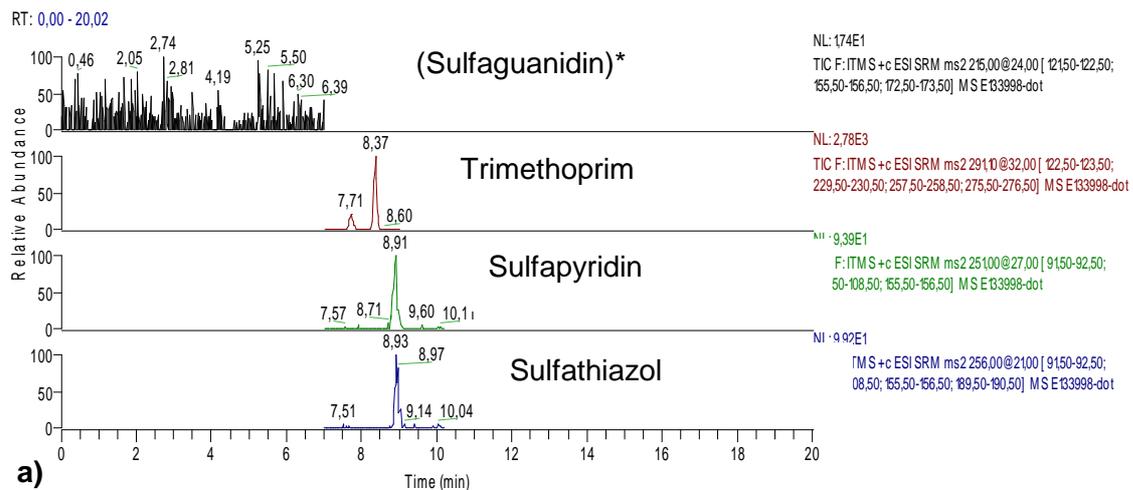


Abb. 49: MS-Chromatogramme **a) - c)** (SRM-Modus) einer dotierten Honigprobe (Herkunft: Osteuropa, 88% Sonnenblume; 10 µg/kg; Sulfameter und Sulfadoxin nicht dotiert), *Sulfaguanidin nicht detektierbar; LTQ, 20 min Gradient vgl. Tab. 20

Trimethoprim wird wie eingangs erwähnt (vgl. Kap. 5.2), sehr häufig in Form von Kombinationspräparaten verabreicht. Deshalb wurde es in die Methode zum Nachweis von Sulfonamiden in Honig integriert. In Tab. 22 sind die Detektionsbedingungen dargestellt. Die Abb. 50 zeigt die Fragmentierung des Trimethoprim im positiven ESI-Mode, und in Abb. 51 das zugehörige LC-MS Chromatogramm einer Standardlösung (1 mg/L).

Tab. 22: LTQ-Massenzahlen, charakteristische Fragmente und Retentionszeit des Trimethoprim; HPLC-Bedingungen vgl. Tab. 20

Analyt	Abk.	M _r (g/mol)	Quasi-molekül- ionen (m/z)	Stoß- energie (%)	Produkt- ionen (m/z)	t _R [min]
Trimethoprim (C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃)	TMP	290,1	291,1	32	123,0 (50%) 230,0 (100%) 258,0 (40%) 276,0 (25%)	8,35

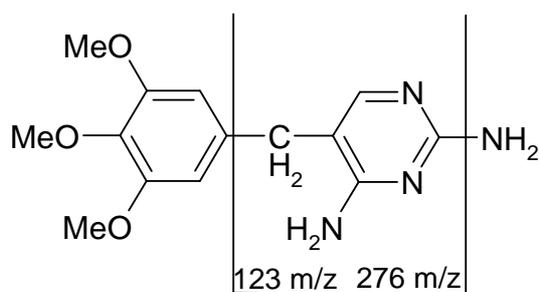


Abb. 50: Fragmentierung von Trimethoprim im positiven ESI-Modus

Die in Abb. 50 dargestellten m/z Verhältnisse der Fragmentionen sind zwei postulierte Beispiele für die Ionisation des Trimethoprim im positiven ESI-Modus. In Abb. 51. sind die resultierenden Fragmente den entsprechenden Fragmente dem MS²-Spektrum zugeordnet.

8 Ergebnisse und Diskussion

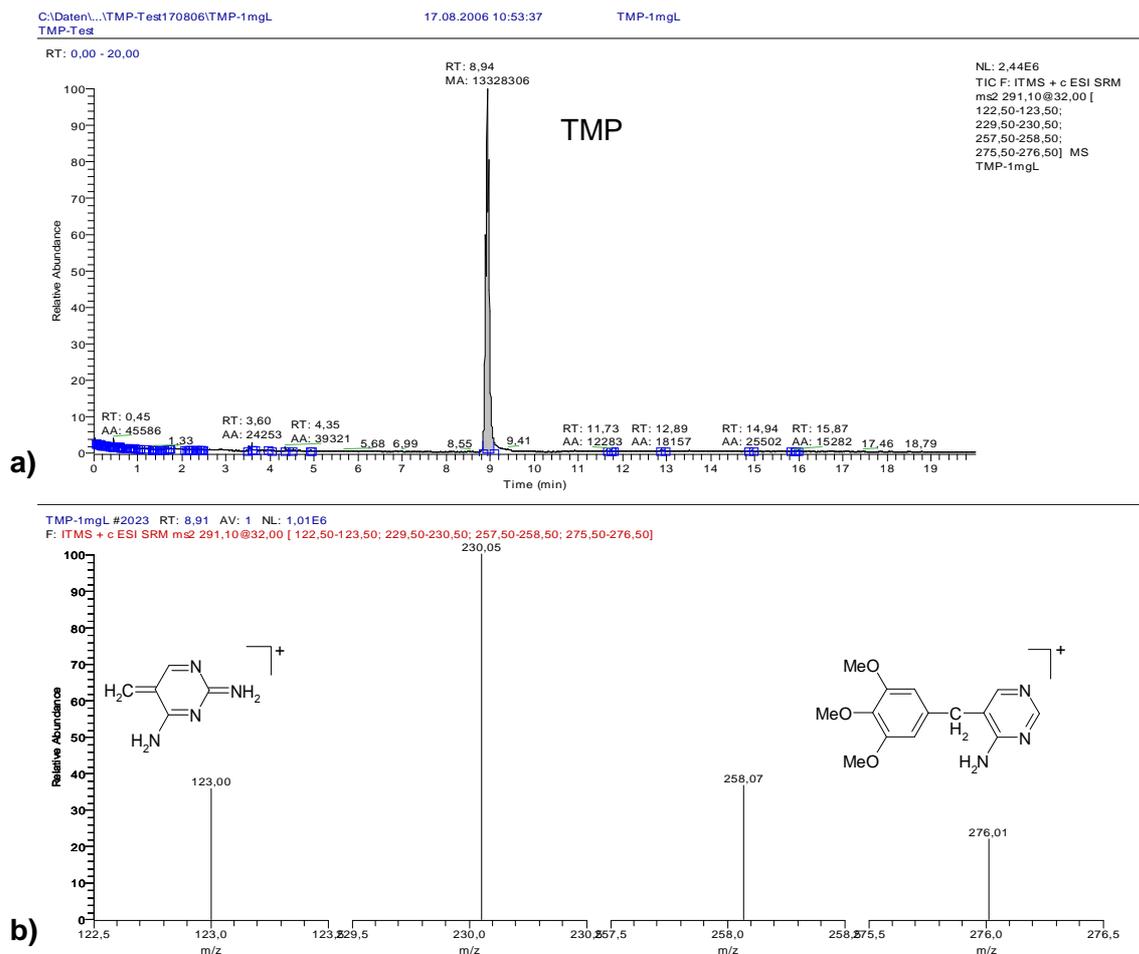


Abb. 51: MS-Chromatogramm **a)** (SRM-Modus) und MS²-Spektrum **b)** des Trimethoprim (1 mg/L-Standard); Strukturen der Fragmentationen 123,0 m/z und 276,0 m/z sind in **b)** dargestellt, LTQ, 20 min Gradient vgl. Tab. 20

Die LC-MS Methode zum Nachweis von Sulfonamiden und Trimethoprim in Honig bietet die Möglichkeit, 10 µg/kg sicher zu quantifizieren. Bis auf Sulfaguanidin und Sulfadoxin sind sämtliche in dieser Arbeit aufgeführten Sulfonamide und Trimethoprim im Bereich der Mindestleistungsgrenze von 10 µg/kg detektierbar. Die Verfahrensstandardabweichung beträgt 4,0 % für Sulfachlorpyridazin und 14,5 % für Sulfadoxin. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen liegen im Bereich von 2,2 µg/kg bis 8,0 µg/kg bzw. 7,4 µg/kg bis 26,1 µg/kg. Alle Wiederfindungen liegen über 90%. Für Trimethoprim ergeben sich für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze 2,4 µg/kg bzw. 7,8 µg/kg für die Wiederfindung 96,9 % und für die Reproduzierbarkeit 4,3 %. Die Daten der Validierung sind in Anhang 3 für jedes Sulfonamid einzeln aufgeführt.

Im Vergleich zu eigenen Untersuchungen haben Kaufmann et al. [130] in ihren Studien 306 Honige auf Gehalte von 16 Sulfonamiden und 4 weiteren Antibiotika hin untersucht. Die Nachweisgrenzen wurden anhand von Signal-zu-Rauschverhältnissen abgeschätzt und betragen für Sulfadimidin und Sulfadoxin 0,4 µg/kg, sowie als Maximalwert 11 µg/kg für Sulfapyridin. Bis auf Sulfaguanidin (35,7 %) und Sulfanilamid (48,8 %) wurden

Wiederfindungen um 100 % berechnet. Die niedrigen Wiederfindungen für die beiden Sulfonamide werden auf zu geringe Wechselwirkung mit dem SPE-Material zurückgeführt. Eine Methode von Krivohlavek et al. [132] weist 11 Sulfonamide in Honig nach, mit Wiederfindungen von 75 % (Sulfasalazin) bis 115 % (Sulfamethoxypyridazin). Die Nachweisgrenze betrug mindestens 25 µg/kg (S/N 3:1), die relative Standardabweichung war für alle Sulfonamide unterhalb von 15 %. Thompson et al. [137] haben ein Analyse-Verfahren entwickelt, mit dem 8 Sulfonamide in Honig detektiert werden können. Die Wiederfindungen lagen zwischen 91 % und 109 %, die relative Standardabweichung für fast alle Sulfonamide unterhalb 20 %. Sehr gute Nachweisgrenzen von 0,5 µg/kg bis 2,0 µg/kg wurden für die einzelnen Sulfonamide bestimmt. Verzegnassi et al. [138] konnten 10 Sulfonamide in Honig mit Wiederfindungen von 44 % bis 73 % anhand dotierter Honige (50 µg/kg) nachweisen. Ähnliche Wiederfindungen konnten Mohamed et al. [153] erzielen. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für 15 Sulfonamide in Honigmatrix liegen zwischen 0,4 µg/kg und 4,5 µg/kg bzw. 1,2 µg/kg und 15,0 µg/kg.

Das in dieser Arbeit entwickelte LC-MS Verfahren stellt eine empfindliche und präzise Analysenmethode dar. Nur Mohamed et al. konnte niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen mit einem LC-MS Verfahren erhalten. Die Wiederfindungen variieren von Sulfonamid zu Sulfonamid recht stark, basierend auf der Polarität des Moleküls. Die Anzahl der untersuchten Sulfonamide nach Literaturangaben reicht von 8 bis 16 Sulfonamiden inklusive Trimethoprim. Im Vergleich dazu wurden 13 Sulfonamide und Trimethoprim in der LC-MS Methode erfasst. Eine Einbindung von weiteren Sulfonamiden in die bestehende Methode, wie neue Substanz-Homologa und internen Standards, ist ohne weiteres möglich. Es ist abschließend festzustellen, dass die LC-MS Methode erfolgreich entwickelt und validiert worden ist. Sie stellt im Vergleich zu Literaturmethoden eine gute Möglichkeit dar, Sulfonamide im Spurenbereich (10 µg/kg) in Honig zu detektieren.

8.2.3 Chloramphenicol

Die Probenvorbereitung beruht auf einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat oder Acetonitril. Zum Lösen und Homogenisieren des Honigs werden vornehmlich Wasser, Puffer oder NaCl-Lösungen eingesetzt. Das entwickelte Verfahren, basierend auf einer internen Methode der Fa. Applicha (Bremen) beruht darauf, den Honig in 4%iger (w/w) NaCl-Lösung zu lösen und anschließend mit Ethylacetat zu extrahieren. Die organische Phase wurde eingedampft und in einem Wasser/Methanol-Gemisch wieder aufgenommen. Diese Lösung wurde zur weiteren Minimierung von Matrixeffekten abschließend durch einen Mikrofilter filtriert. Durch die Zugabe der Natriumchloridlösung wurde die Trennung der wässrigen von der organischen Phase verbessert. Die Anwendung von Ethylacetat hatte im Vergleich zu Acetonitril den Vorteil, dass das Einengen der organischen Phase bedeutend schneller verläuft. Durch Hinzuschalten eines Online-SPE-Moduls (SP2000-Modul, Fa. Applicha) konnte eine Minimierung von Matrixbestandteilen in der Messprobe erreicht werden [167]. Das SP2000-Modul beinhaltet eine Pumpe und Schaltventile. Mit einem Schaltventil wurde die Probenaufnahme auf die Online-SPE-Kartusche und die Gradientenelution geregelt. Das andere Schaltventil diente zur Auswahl der mobilen Phase zum Waschen und Rekonditionieren der SPE-Phase. Das Schaltprogramm der Ventile und der Gradient sind in Anhang 1 aufgeführt. In Tab. 23 sind die chromatographischen Bedingungen und das Gradientenprogramm dargestellt.

Tab. 23: Chromatographische Bedingungen und Gradientenprogramm zum Nachweis von Chloramphenicol in Honig

LC-Bedingungen	Zeit [min]	% A*	% B*
0,2 mL/min 200 µL Inj.Volumen Thermo BDS Hypersil-C18 125 x 2,1 mm; 5µm Vorsäule: Hypersil BDS-C18 10 x 2 mm; 5 µm	0,0	90	10
	4,0	90	10
	15,0	10	90
	18,0	10	90
	20,0	90	10
	25,5	90	10

* Zusammensetzung der Laufmittel A und B siehe Kapitel 10.3, Seite 156

Als qualitätssichernde Maßnahme wurde ein interner Standard jeder Honigprobe vor der Flüssig-Flüssig-Extraktion zugegeben. Es handelte sich dabei um ein fünffach deuteriertes Chloramphenicol (CAP-d5). Die Quantifizierung im Falle eines positiven Chloramphenicolbefundes in einer Probe wurde durch den internen Standard korrigiert. Dazu wurden die Signalfächen (CAP-d5) in der Probe auf das Niveau der Standardlösung normiert. Es resultierten je nach (Matrixsuppression bzw. -expression) mathematische Korrekturfaktoren, die mit den gemessenen Flächen multipliziert wurden, bevor die Quantifizierung erfolgte. Neben dem ³⁵Chlor-Isotop des Chloramphenicols wurde zusätzlich

das ^{37}Cl -Isotop mit in der LC-MS-Messung erfasst. Die Identifizierung der Rückstände in Honig wird dadurch noch sicherer. In Tab. 24 sind u.a. die massenspektrometrischen und chromatographischen Kenndaten der Analyten aufgeführt.

Tab. 24: LTQ-Massenzahlen und charakteristische Fragmente und Retentionszeiten des Chloramphenicols bzw. des deuterierten Chloramphenicols; HPLC-Bedingungen vgl. Tab. 23

Analyt	Abk.	M_r (g/mol)	Quasi- molekül- ionen (m/z)	Stoß- energie (%)	Produktionen (m/z)	t_R [min]
Chloramphenicol (^{35}Cl)	CAP	320,0	321,0	20	152,0 (20 %) 194,0 (50%) 257,0 (100%)	11,93
Chloramphenicol (^{37}Cl)	CAP	322,0	323,0	20	152,0 (20%) 194,0 (100%) 257,0 (80%) 259,0 (100%)	11,91
Chloramphenicol- d5 (^{35}Cl)	CAP-d5	325,0	326,0	20	157,0 (20%) 199,0 (20%) 262,0 (100%)	11,91
Chloramphenicol- d5 (^{37}Cl)	CAP-d5	327,0	328,0	20	157,0 (40%) 199,0 (30%) 262,0 (80%) 264,0 (100%)	11,88

- Isotopenmarkierter interner Standard: [$^2\text{H}_5$] CAP (CAP-d5)

In Abb. 52 ist die Fragmentierung des Chloramphenicols nach Gentilli et al. [39] und Forti et al. [155] dargestellt. Im negativen ESI-Modus wird ein Wasserstoffatom abstrahiert und das CAP-Molekül liegt negativ geladen vor. Das Masse-zu-Ladungsverhältnis des Quasimoleküliions beträgt 321 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$. Die Fragmentierung führt zu den charakteristischen Produktionen mit den m/z-Verhältnissen 257 und 152 m/z.

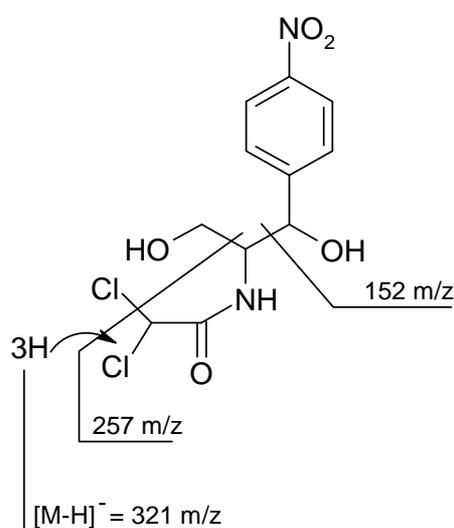


Abb. 52: Fragmentierungsmuster von Chloramphenicol im negativen ESI-Modus [39,155]

In Abb. 53 sind die MS-Chromatogramme und zugehörigen MS²-Spektren einer Chloramphenicol-Standardlösung ((CAP): 1 µg/L; (CAP-d5): 5 µg/L) gezeigt. In Abb. 54 sind die MS-Chromatogramme und MS²-Spektren eines mit Chloramphenicol-d5 dotierten Honigs dargestellt ((CAP-d5): 5 µg/kg).

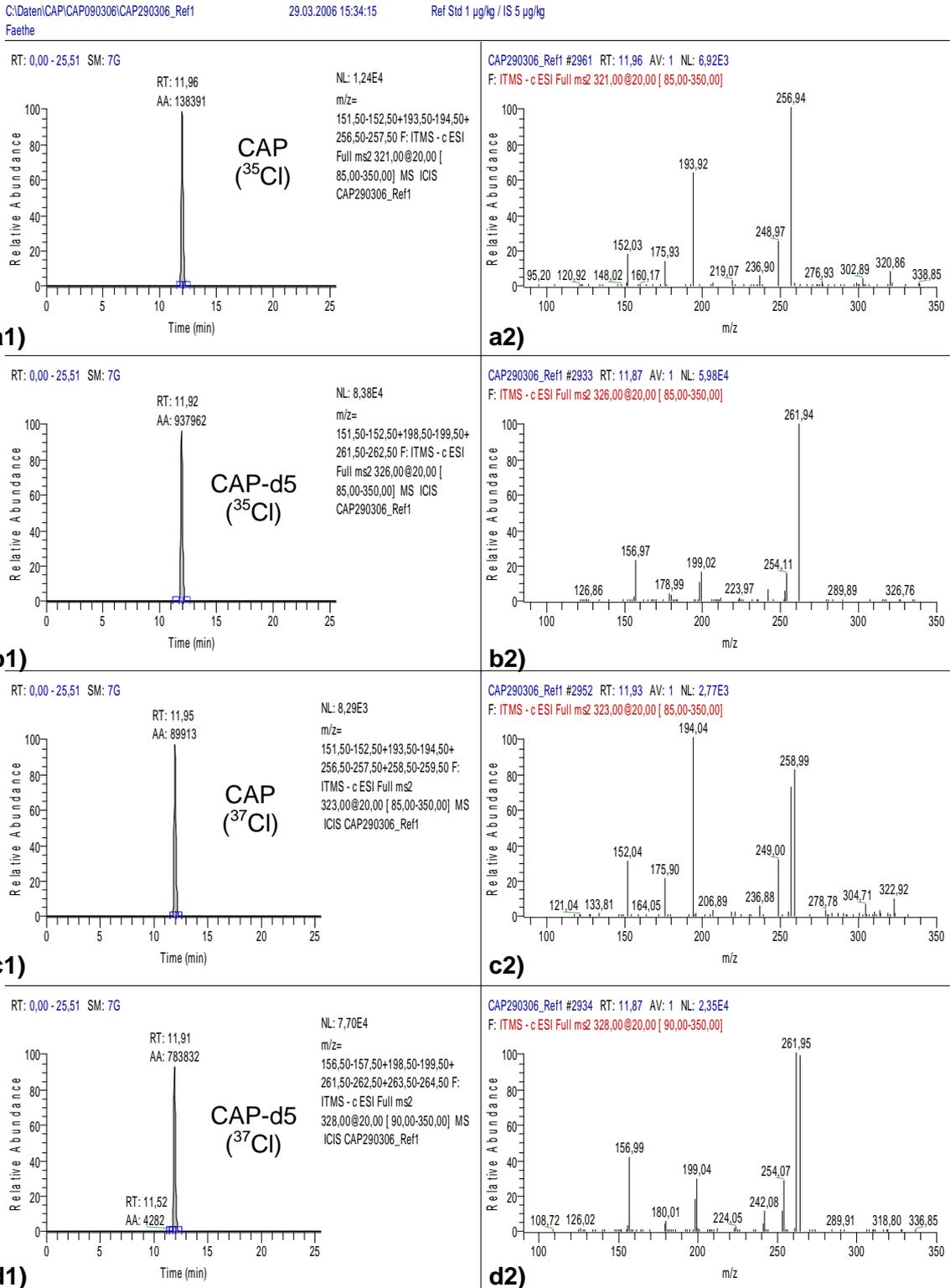


Abb. 53: MS-Chromatogramme a1) - d1) und MS²-Spektren a2) - d2) von Chloramphenicol (CAP) und dem internen Standard Chloramphenicol-d5 (CAP-d5) (Mischstandardlösung 1 µg/L); Online-SPE-LTQ, 25,5 min Gradient vgl. Tab. 24

8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...Maerzl\080307\T3-07-05-I

08.03.2007 15:22:53

T3-07-05-I

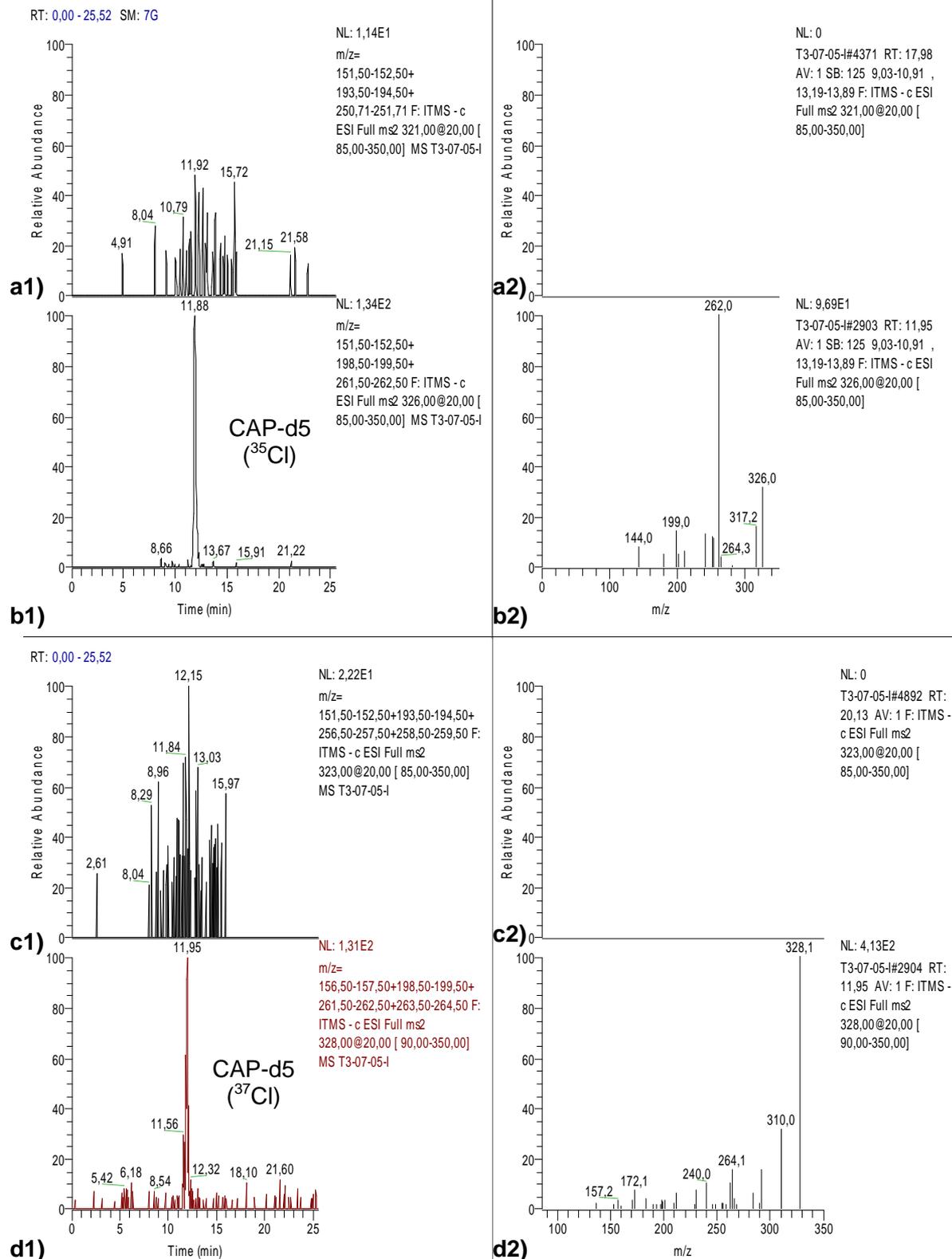


Abb. 54: MS-Chromatogramme **a1)** - **d1)** und MS²-Spektren **a2)** - **d2)** eines Honig mit internem Standard Chloramphenicol-d5 (5 µg/kg) dotiert); Online-SPE-LTQ, 25,5 min Gradient vgl. Tab. 24

Die Methode zur Bestimmung von CAP-Rückständen in Honig ist ein gutes Beispiel für den Einsatz von isotoopenmarkierten internen Standards (^{13}C , ^{15}N) und die Möglichkeit, das natürliche Isotopenverhältnis des Chlors ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$: 3:1) zur Identifizierung zu nutzen. Vor jeder Extraktion der Proben wurden sie mit dem internen Standard CAP-d5 dotiert. Je nach Honigmatrix kann die Wiederfindung für CAP bzw. CAP-d5 variieren. Um den Einsatz des internen Standards und die Kompensation von Matrixeffekten des Honigs bei der Quantifizierung zu veranschaulichen, folgt ein konkretes Rechenbeispiel.

Die Konzentration von Chloramphenicol in der Messprobe berechnet sich wie folgt:

$$(Probe_{CAP}) = \frac{A[CAP_{d5}](Std)}{A[CAP_{d5}](Probe)} \cdot \frac{A[CAP](Probe)}{A[CAP](Std)} \cdot (Std_{CAP})$$

Mit	$(Probe_{CAP})$	Konzentration CAP in der Probe
	(Std_{CAP})	Konzentration CAP in Standardlösung
	$A[CAP_{d5}](Std)$	Fläche CAP-d5 in Standardlösung
	$A[CAP_{d5}](Probe)$	Fläche CAP-d5 in der Probe
	$A[CAP](Probe)$	Fläche CAP in der Probe
	$A[CAP](Std)$	Fläche CAP in Standardlösung

Beispiel:

(Std_{CAP})	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CAP in Honig
$A(CAP_{d5})(STD)$	50000 Flächeneinheiten (FE)
$A(CAP_{d5})(Probe)$	39000 FE
$A[CAP](Probe)$	7600 FE
$A[CAP](Std)$	10000 FE

Berechnung mit Korrektur über internen Standard:

$$(Probe_{CAP}) = \frac{50000 \text{ FE}}{39000 \text{ FE}} \cdot \frac{7600 \text{ FE}}{10000 \text{ FE}} \cdot 1 \frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} = 0,97 \mu\text{g}/\text{kg}$$

Berechnung ohne Korrektur:

$$(Probe_{CAP}) = \frac{7600 \text{ FE}}{10000 \text{ FE}} \cdot 1 \frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} = 0,76 \mu\text{g}/\text{kg}$$

Ohne die Korrektur über den internen Standard würde man eine Chloramphenicol-Konzentration von 0,76 $\mu\text{g}/\text{kg}$ berechnen. Dieses Beispiel zeigt deutlich die Vorteile einer Einbindung von internen Standards in analytische Methoden. Matrixeffekte wie Suppression und Expression können kompensiert werden und gewährleisten eine sichere Quantifizierung.

Die Leistungsfähigkeit der LC-MS Methode wird durch Vergleich der experimentell ermittelten Verfahrenskennwerten mit Literaturwerten bewertet. Im Rahmen der Validierung der Methode zum Nachweis von Chloramphenicol in Honig wurden die Wiederfindung, die Reproduzierbarkeit und die Nachweis- und Bestimmungsgrenze bzw. das Nachweisvermögen und die Erfassungsgrenze bestimmt. Die Wiederfindung beträgt 89 %, das Nachweisvermögen cc_{α} 0,13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und die Erfassungsgrenze cc_{β} 0,22 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Damit ist die Bestimmungsmethode hinreichend empfindlich, um Gehalte von 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (MRPL) sicher quantifiziert zu können.

Ortelli et al. [63] geben eine Nachweisgrenze von 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und eine Bestimmungsgrenze von 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für die Bestimmung von Chloramphenicol in Honig mittels LC-MS an. Die Wiederfindung betrug 64 %. Sheridan et al. [159] ermitteln eine ähnliche Nachweis- (0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und Bestimmungsgrenze (0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$), sowie eine Wiederfindung von 78%. Beide Verfahren besitzen eine Bestimmungsgrenze oberhalb des MRPL's für Chloramphenicol in Honig, sind also nicht empfindlich genug. Vivekanandan et al. [160] haben ein Verfahren entwickelt, dass Gehalte von 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in Honig sicher quantifizieren können. Die Wiederfindung wurde in diesem Fall mit 86,9 % angegeben. Drei weitere LC-MS Methoden [155,157,162] werden durch Nachweisvermögen cc_{α} und Erfassungsgrenze cc_{β} charakterisiert. Die Werte für cc_{α} befinden sich zwischen 0,003 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 0,11 $\mu\text{g}/\text{kg}$, für cc_{β} zwischen 0,007 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 0,14 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Forti et al. [155] berechnen eine Wiederfindung von 98,5 %, Rodziewicz et al. [162] 91-104 % für unterschiedlich dotierte Honige. Ronning et al. [157] ermitteln mit 110 % die höchste Wiederfindung.

Der Vergleich zeigt, dass die entwickelte LC-MS Methode zwar nicht die empfindlichste Methode mit der höchsten Wiederfindung ist, aber dennoch robust und leistungsstark, um Chloramphenicol-Rückstände im geforderten Konzentrationsbereich (MRPL 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sicher zu detektieren.

8.2.4 Nitrofurane

Die Analyse von Nitrofuranen gestaltet sich durch deren schnellen Metabolismus komplexer als zum Beispiel die der relativ stabilen Sulfonamide - die in vivo-Halbwertszeiten betragen nur wenige Stunden. Daher wurden in der Rückstandsanalytik biologischer Proben i.d.R. die freien Metabolite der Nitrofurane detektiert und nicht die Wirkstoffe (vgl. Kap. 5.4, Abb. 19) [84,85]. Da die Nitrofuran-Metabolite aber überwiegend matrix- (z.B. protein-) gebunden sind, mussten diese in der ersten Stufe der Probenvorbereitung unter milden sauren Bedingungen in die freien Formen überführt werden. Der nukleophile Angriff der Carbonylgruppe des Aldehydes erfolgt am Kohlenstoff der primären Aminogruppe und wird durch Säuren katalysiert. Somit konnte nach saurer Hydrolyse die Umsetzung zum Nitrofuranderivat erfolgen [171]. Danach war eine Derivatisierung zu 2-Nitrobenzaldehyd-Iminen, sog. Schiffchen Basen, notwendig, um die Empfindlichkeit der Nachweismethoden sowohl mit der HPLC-UV/Fluoreszenz als auch der MS-Detektion zu erhöhen (vgl. Abb. 55).

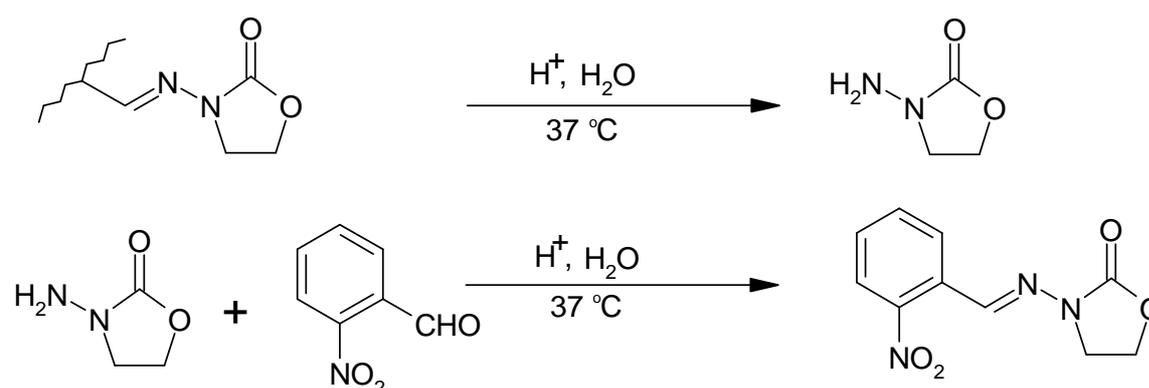


Abb. 55: Hydrolyse gebundener Nitrofuranmetabolite und anschließende Derivatisierung zu den 2-Nitrophenylderivaten am Beispiel des Furazolidon [84,85]

Die einzelnen Schritte der Probenvorbereitung sind im Anhang 2 in Form eines Fließschemas aufgeführt. Die chromatographischen Bedingungen zur LC-MS Detektion sind in Tab. 25 wiedergegeben.

Tab. 25: Chromatographische Bedingungen und Gradientenprogramm zum Nachweis von Nitrofuranmetaboliten in Honig

LC-Bedingungen	Zeit [min]	% A*	% B*
0,2 mL/min 20 μL Inj. Volumen Phenomenex Synergi Polar-RP 250 x 2,0 mm; 4 μm Vorsäule: Phenomenex Synergi Guard 4 x 2,0 mm; 4 μm	0,0	90	10
	5,0	90	10
	13,0	0	100
	18,0	0	100
	22,0	90	10
	26,0	90	10

* Zusammensetzung der Laufmittel A und B siehe Kapitel 10.3, Seite 155

Die Tab. 26 gibt die LTQ-Massenparameter der Nitrofurananalyse wieder. Als qualitätssichernde Maßnahme wurden isotopenmarkierte Referenzsubstanzen verwendet. Die internen Standards beinhalten AOZ und AMOZ als vierfach bzw. fünffach deuterierte Verbindungen und das isotopenmarkierte SEM. Im Falle des *SEM wurden zwei Stickstoffe und ein Kohlenstoff gegen die Isotope ^{15}N bzw. ^{13}C getauscht.

Tab. 26: LTQ-Massenzahlen, charakteristische Fragmente und Retentionszeiten der Nitrofuranmetabolite; HPLC-Bedingungen vgl. Tab. 25

Analyt	Abk.	M_r (g/mol)	Quasi- molekül- ionen (m/z)	Stoß- energie (%)	Produkt- ionen (m/z)	t_R [min]
Semicarbazid	SEM	207,9	208,9	20	134,0 (35%) 166,0 (50%) 192,0 (100%)	16,42
	*SEM	210,9	211,9	20	134,0 (35%) 168,0 (50%) 195,0 (100%)	16,49
1-Amino- imidazolidin-2,4- dion	AHD	247,9	248,9	25	104,0 (100%) 134,0 (55%) 178,0 (40%)	17,43
3-Amino- oxazolidin-2-on	AOZ	234,9	235,9	22	78,0 (10%) 104,0 (100%) 134,0 (30%)	17,84
	*AOZ	238,9	239,9	22	78,0 (10%) 104,0 (100%) 134,0 (30%)	17,82
3-Amino- morpholinomethyl- oxalidin-2-on	AMOZ	334,0	335,0	20	262,0 (100%) 291,0 (90%)	16,50
	*AMOZ	339,0	340,0	20	265,0 (100%) 296,0 (90%)	16,30

*Isotopenmarkierte Interne Standards:

- 1,2- $[^{15}\text{N}_2, ^{13}\text{C}]$ SEM (SEM-isotopenmarkiert)
- $[^2\text{H}_4]$ AOZ (AOZ-d4)
- $[^2\text{H}_5]$ AMOZ (AMOZ-d5)

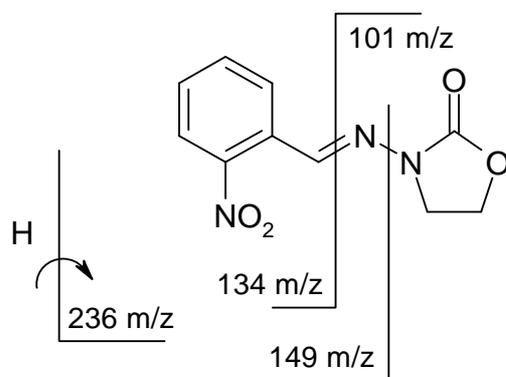


Abb. 56: Fragmentierungsmuster des NB-AOZ (Nitrobenzaldehyd-AOZ) [39]

In Abb. 56 ist die Fragmentierung am Beispiel des Nitrobenzaldehydderivates von AOZ dargestellt. Die Derivatisierung der Nitrofurane mit Nitrobenzaldehyd ist nötig, um einen Massenbereich >200 m/z erreichen, der massenspektrometrisch gut erfasst werden kann. Der untere Massenbereich kann durch Untergrundsignale, hervorgerufen durch Matrix und Lösungsmittel, beeinträchtigt werden und führt damit zu einer schlechteren Empfindlichkeit.

Die LC-MS Methode muss empfindlich genug sein, damit $1,0 \mu\text{g/kg}$ (MRPL) Nitrofuranmetabolit-Rückstände in Honig detektierbar sind. Anhand einer Validierung und Spezifitätsprüfung wurde die Leistungsfähigkeit im Bezug auf Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Richtigkeit hin untersucht. Eine detaillierte Aufstellung der Daten ist in Anhang 3 zu finden.

In Abb. 57-59 sind die MS-Chromatogramme und -spektren einer Nitrofuranreferenzlösung, einem mit internem Standard dotierten Honig und einem dotierten Honig abgebildet. Auf der linken Seite der Abbildungen sind die Chromatogramme dargestellt, auf der rechten Seite zwei MS-Spektren. Die Chromatogramme eines dotierten Honigs (vgl. Abb. 59) weisen keine Matrixinterferenzen zur bestimmten Retentionszeit (vgl. Abb. 57) der jeweiligen Analyten auf. Die Spezifität ist damit gewährleistet. Die Nachweisgrenzen reichen von $0,4 \mu\text{g/kg}$ (AMOZ) bis $5,2 \mu\text{g/kg}$ (SEM). Das Nachweisvermögen beträgt $0,04 \mu\text{g/kg}$ (AMOZ) bis $0,11 \mu\text{g/kg}$ (AHD). Die geringste Erfassungsgrenze wurde mit $0,06 \mu\text{g/kg}$ für AMOZ bestimmt. Für alle Analyten konnten Wiederfindung größer als 90 % berechnet werden.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind nur zwei weitere Methoden bekannt, in der Nitrofuranmetabolite in Honig untersucht wurden. Die weitaus größere Anzahl von Publikationen zielt auf andere Matrices ab. Khong et al. [316] verwenden in ihrer LC-MS Methode Extraktions- und Derivatisierungsbedingungen, die auch in dieser vorliegenden Arbeit genutzt wurden. Für das Nachweisvermögen geben die Autoren Werte von $0,07 \mu\text{g/kg}$ (AMOZ) bis $0,46 \mu\text{g/kg}$ (AHD) an, die Erfassungsgrenze liegt zwischen $0,12 \mu\text{g/kg}$ (AMOZ) und $0,56 \mu\text{g/kg}$ (AHD). Die Wiederfindung betrug 83 % bis 112 %. Lopez et al. [317] bestimmen für die Nachweisgrenze aller Analyten eine Konzentration von $0,25 \mu\text{g/kg}$. Die Wiederfindungen eines dotierten Honigs ($0,5 \mu\text{g/kg}$) befinden sich zwischen 92 % (AHD) und 101 % (AOZ).

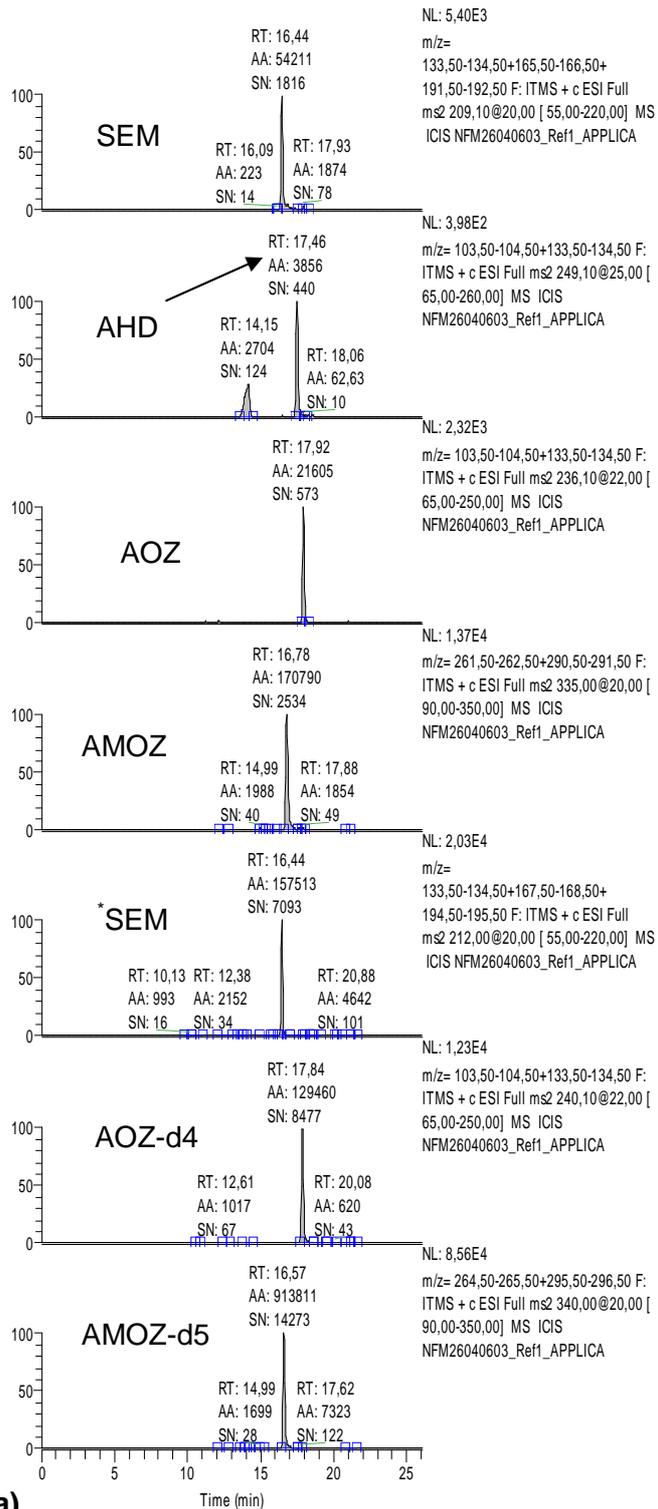
Die errechneten Konzentrationen für das Nachweisvermögen und die Erfassungsgrenze der entwickelten LC-MS Methode liegen etwas unterhalb der Literaturangaben. Die hohen Wiederfindungen aller Methoden beruhen auf der nahezu quantitativen Extraktion der Nitrofuranmetabolite nach vorangegangener Hydrolyse und Derivatisierung. Das Fazit der Methodenentwicklung im Rahmen dieser Arbeit ist, dass der MRPL-Wert von $1,0 \mu\text{g/kg}$ in Honig durch die entwickelte LC-MS Methode sicher nachzuweisen ist.

8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...NFM26040603_Ref1_APPLICA

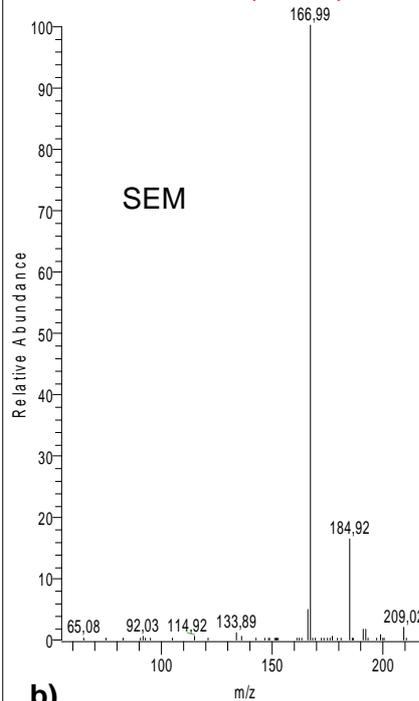
26.04.2006 22:36:32

RT: 0,00 - 26,02 SM: 7G



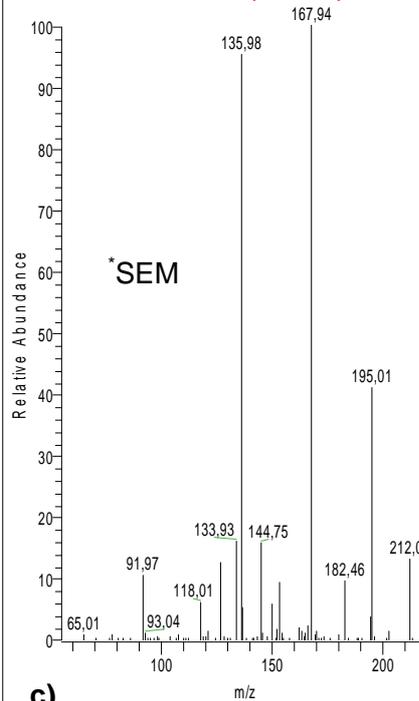
a)

NFM26040603_Ref1_APPLICA #3685 RT: 16,41 AV: 1 NL: 8,06E4
F: ITMS + c ESI Full m/z 209,10@20,00 [55,00-220,00]



b)

NFM26040603_Ref1_APPLICA #3707 RT: 16,50 AV: 1 NL: 8,28E3
F: ITMS + c ESI Full m/z 212,00@20,00 [55,00-220,00]



c)

Abb. 57: MS-Chromatogramme **a)** und MS²-spektren **b) & c)** einer Nitrofuranmetabolit-Referenzprobe (2 µg/L Standard, 10 µg/L Interner Standard; SEM-isotopenmarkiert enthalten); LTQ, 26 min Gradient vgl. Tab. 25

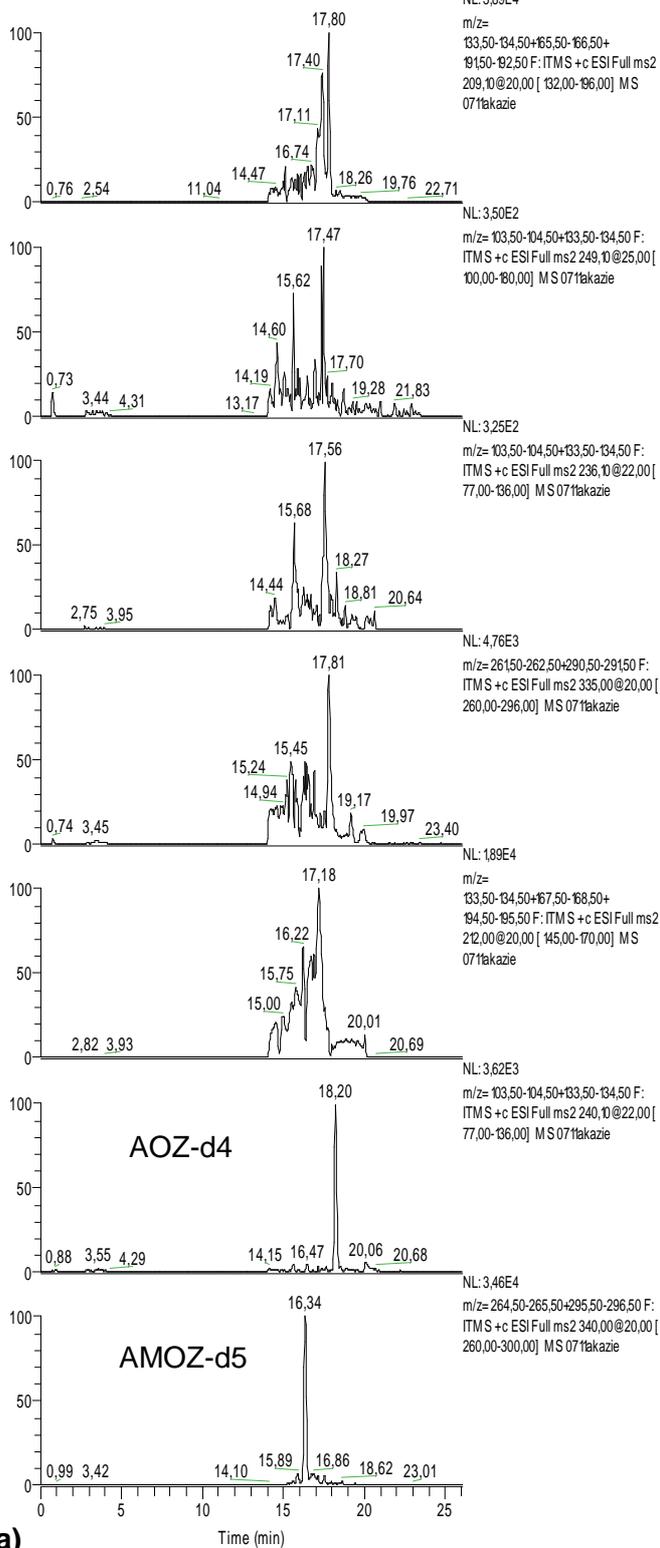
8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\... \Ok07111007\0711akazie

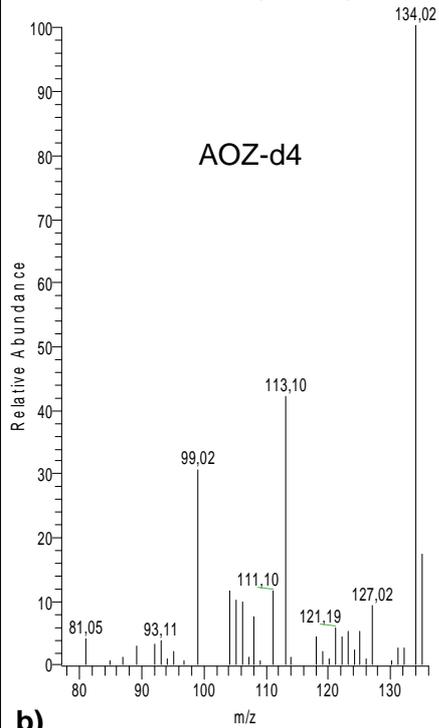
12.10.2007 01:55:02

0711akazie

RT: 0,00 - 26,03 SM: 7G

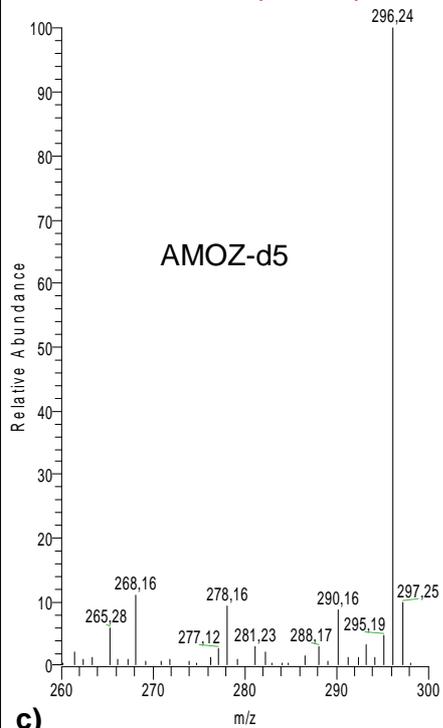


0711akazie #4503 RT: 18,18 AV: 1 NL: 3,09E3
F: ITMS + c ESI Full ms2 240,10@22,00 [77,00-136,00]



b)

0711akazie #3871 RT: 16,27 AV: 1 NL: 2,22E4
F: ITMS + c ESI Full ms2 340,00@20,00 [260,00-300,00]



c)

Abb. 58: MS-Chromatogramme **a)** und MS²-Spektren **b)** & **c)** eines dotierten Honigs (5 µg/kg Interner Standard AOZ-d4 und AMOZ-d5); LTQ, 26 min Gradient vgl. Tab. 25

8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...NFM220606_pi060313138_dot_2

30.06.2006 07:36:57

NFM220606_pi060313138_dot_2

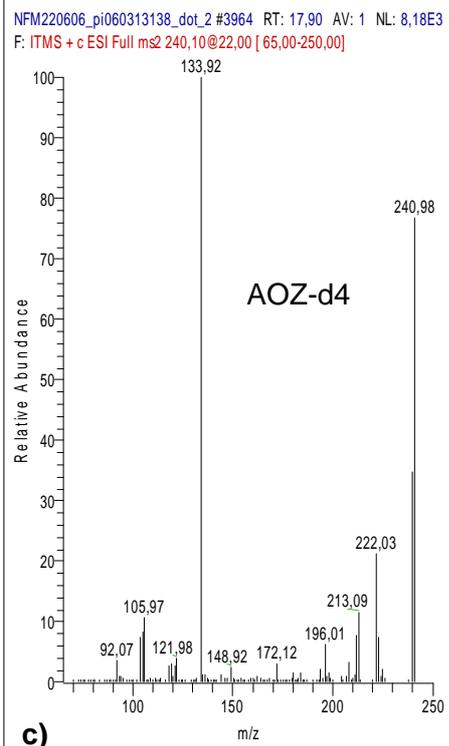
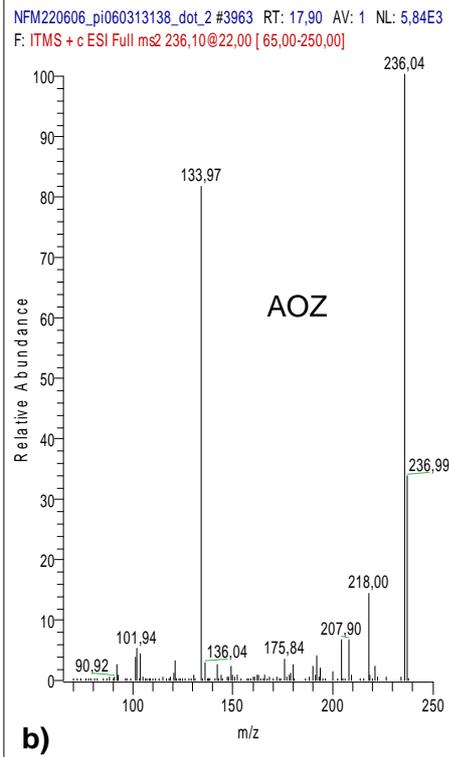
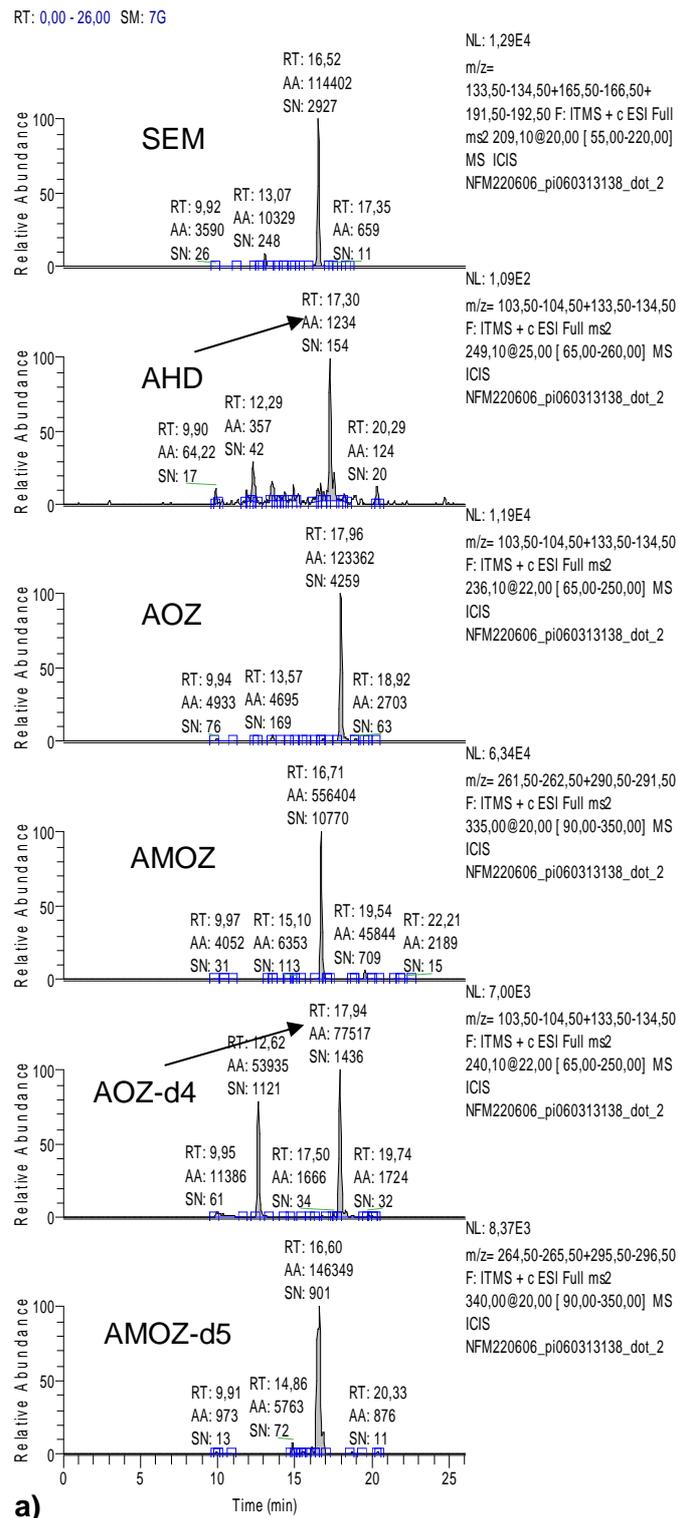


Abb. 59: MS-Chromatogramme **a)** und MS²-Spektren **b)** & **c)** eines dotierten Honigs (1 µg/kg Standard /5 µg/kg Interner Standard AOZ-d4 und AMOZ-d5; SEM-isotopenmarkiert enthalten); LTQ, 26 min Gradient vgl. Tab. 25

8.2.5 Aminoglykoside

Die Aminoglykoside sind aufgrund der vielen polaren funktionellen Gruppen sehr hydrophil (vgl. Kap. 5.5, Abb. 21). Um eine hinreichende Wechselwirkung mit der stationären RP-Phase zu gewährleisten, wurde auf die Ionenpaarchromatographie zurückgegriffen. Die Ionenpaarreagenzien bilden mit den geladenen Analytmolekülen neutrale Addukte (vgl. Abb. 60). Die in der Literatur [189,190] beschriebenen Methoden zur Detektion von Aminoglykosiden in Honig besitzen den Nachteil, dass die zum Einsatz kommenden Ionenpaarreagenzien (vgl. Abb. 61) die Ionisation der Moleküle im Electrospray stören und damit die Empfindlichkeit negativ beeinflussen.

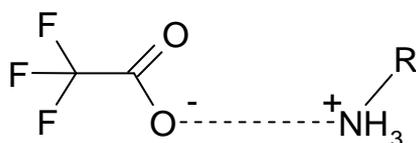


Abb. 60: Beispiel für eine Ionenpaarbindung von TFA (Trifluoressigsäure) mit einer protonierten Aminofunktion

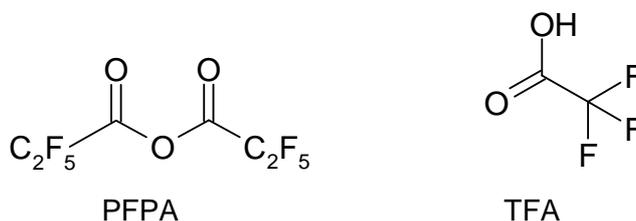


Abb. 61: Molekülstrukturen von Ionenpaarreagenzien (PFPA: Pentafluorpropionsäure-Anhydrid, TFA: Trifluoressigsäure)

Die in der NPLC (Normalphasenchromatographie) gebräuchlichen nicht wässrigen Laufmittel sind mit dem Ionisierungsprozess in der ESI-Quelle nicht kompatibel. Eine Alternative stellt die „Hydrophilic Liquid Interaction Chromatography“ (HILIC) gekoppelt mit MS-Detektion dar, die Oertel et al. [192] eingesetzt haben, um Neomycin in menschlichen Blutserum nachzuweisen. In Abb. 62 ist die chemische Struktur der funktionellen oberflächengebundenen Gruppen dieser stationären Phase schematisch dargestellt.

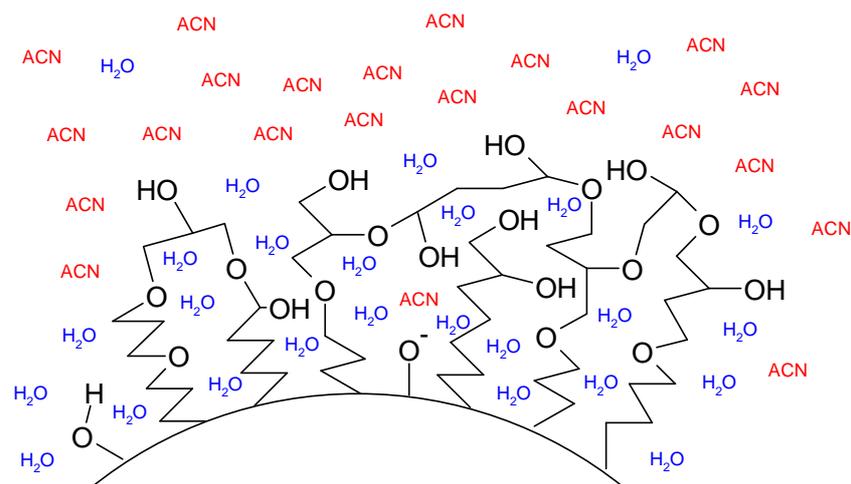


Abb. 62: Quervernetzte Diol-Phase einer HILIC-Säule umgeben von Wasser- und Acetonitrilmolekülen [282]

HILIC ermöglicht ähnliche chromatographische Trennungen wie die NPLC, man kann aber Laufmittelsysteme der RPLC (Reversed Phase Liquid Chromatography) einsetzen, die z.B. aus MeOH/ACN-Gemischen bestehen. Die Besonderheit besteht darin, dass der Wasseranteil in der mobilen Phase einen wässrigen Oberflächenfilm auf der stationären Phase schafft, mit dem die polaren Analyten wechselwirken können. Die elektrostatische Wechselwirkung der geladenen Analytmoleküle mit der stationären Phase wird durch die Pufferkonzentration kontrolliert, und dadurch lässt sich die Retentionszeit variieren [282].

Es wurden verschiedene Laufmittelzusammensetzungen und HPLC-Gradienten getestet, um die optimalen LC-Bedingungen zur Analyse von Streptomycin- und Dihydrostreptomycinrückständen in Honig zu bestimmen. Getestet wurden Pufferlösungen mit verschiedenen Konzentrationen von Ammoniumacetat und -formiat. In Tab. 27 sind die resultierenden chromatographischen Bedingungen aufgeführt.

Tab. 27: Chromatographische Bedingungen und Gradientenprogramm zur Trennung von Aminoglykosiden

LC-Bedingungen	Zeit (min)	% A*	% B*	Fluss (µL/min)
20 µL Inj. Volumen Säule: Luna HILIC 3 µ 100 x 2,0 mm Vorsäule: Luna HILIC 4 x 2,0 mm	0,0	100	0	200
	2,0	100	0	200
	3,0	40	60	500
	6,0	40	60	500
	10,0	100	0	200

* A: (Ammoniumformiat / Acetonitril / Ameisensäure 9,8/90/0,2 (v/v/v))

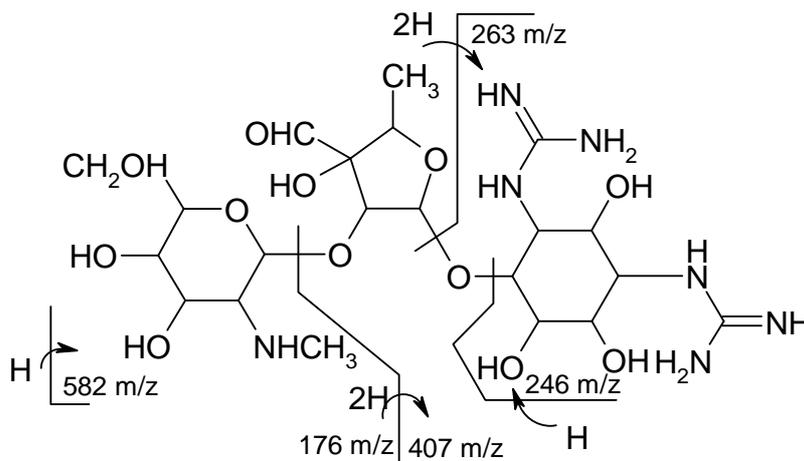
B: (Ammoniumformiat / Acetonitril / Ameisensäure 89,2/10/0,2 (v/v/v))

In Tab. 28 sind die relativen Molekülmassen, Stoßenergien und Produktionen wiedergegeben.

Tab. 28: LTQ-Massenzahlen, Stoßenergien und charakteristische Fragmente des Streptomycins bzw. des Dihydrostreptomycins; HPLC-Bedingungen vgl. Tab. 27

Analyt	Abk.	M_r (g/mol)	Quasi- molekül- ionen (m/z)	Stoß- energie (%)	Produkt- ionen (m/z)	t_R [min]
Streptomycin ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$)	STR	581,1	582,1	20	246,0 (30%) 263,2 (100%) 407,3 (15%)	4,14
Dihydro- streptomycin ($C_{21}H_{41}N_7O_{12}$)	DSTR	583,2	584,2	20	246,1 (35%) 263,2 (100%) 409,3 (15%)	4,13

In Abb. 63 ist die Fragmentierung des Streptomycins dargestellt. Das Produkt-Ion mit dem m/z-Verhältnis 263,2 ist das Signalstärkste während des Fragmentierungsprozesses. Eine Abspaltung eines weiteren Sauerstoffs führt zum Produkt-Ion 246 m/z. Es handelt sich bei dem Fragment um das Streptidin (vgl. Kap. 5.5).

**Abb. 63:** Fragmentierungsmuster von Streptomycin [39]

Der Einsatz von einem Ammoniumformiatpuffer (pH 3,2) lieferte reproduzierbare Retentionszeiten sowie eine ausreichende Ionenausbeute im Electrospray Interface des Massenspektrometers. In Abb. 64 sind die Chromatogramme und MS²-Spektren eines Mischstandards abgebildet. Die Wahl des Fließmittels, mit dem die Stammlösungen der Analyten (1000 mg/L) verdünnt wurden, hat einen entscheidenden Einfluss auf die Wechselwirkung mit der stationären Phase (vgl. Abb. 62). Eine Mischung aus 80% (v/v) Laufmittel A und 20 % (v/v) Laufmittel B (vgl. Kap.11.3) führte zu einer akzeptablen Retention, d.h. scharfe Peaks und eine Elution im mittleren Zeitsegment des gewählten Gradienten.

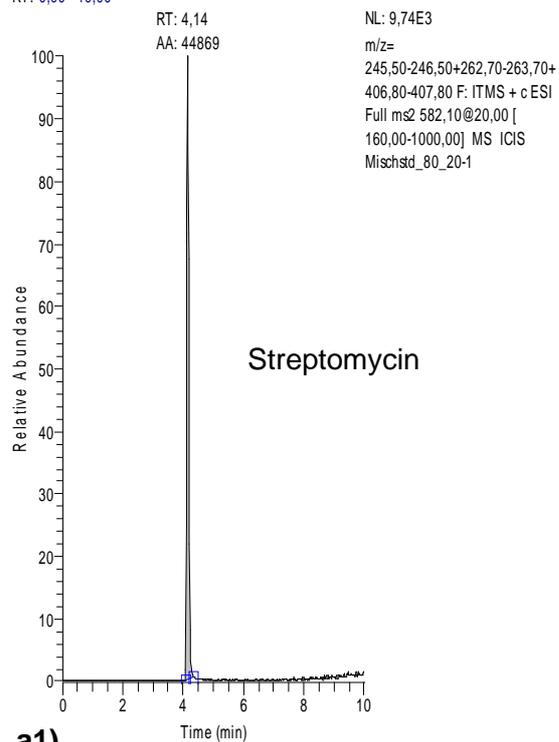
8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...090708-2\Mischstd_80_20-1

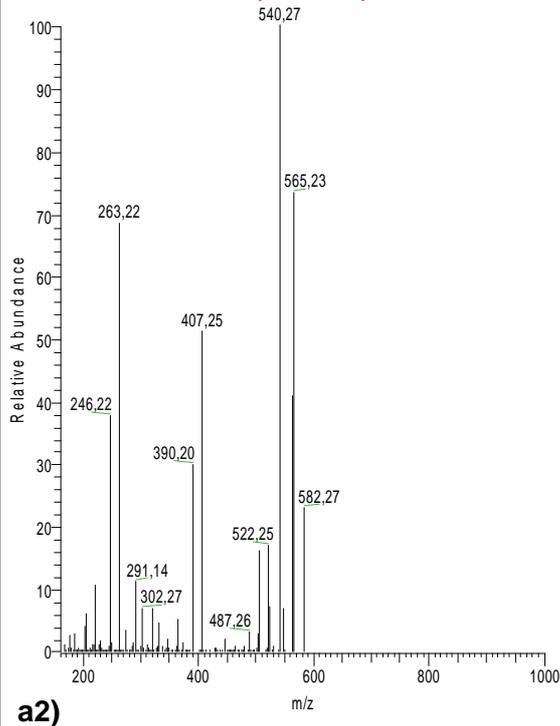
09.07.2008 11:17:13

Mischstd_80_20-1

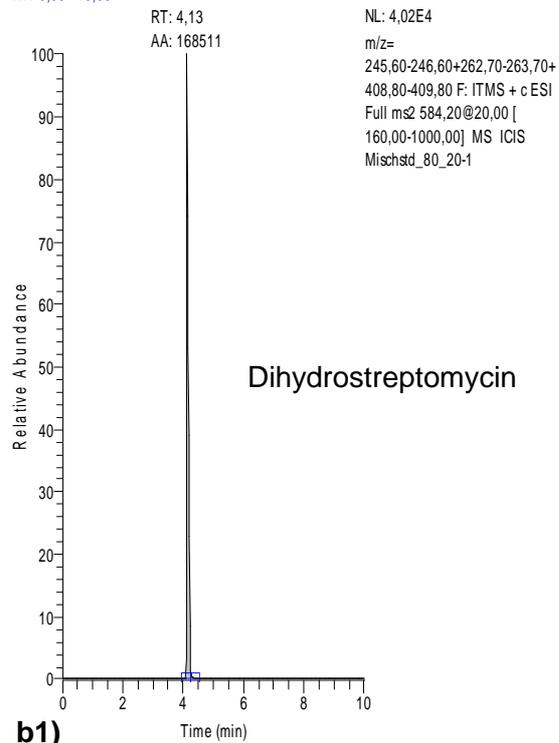
RT: 0,00 - 10,00



Mischstd_80_20-1 #918 RT: 4,14 AV: 1 NL: 6,20E3
F: ITMS + c ESI Full ms² 582,10@20,00 [160,00-1000,00]



RT: 0,00 - 10,00



Mischstd_80_20-1 #915 RT: 4,13 AV: 1 NL: 2,61E4
F: ITMS + c ESI Full ms² 584,20@20,00 [160,00-1000,00]

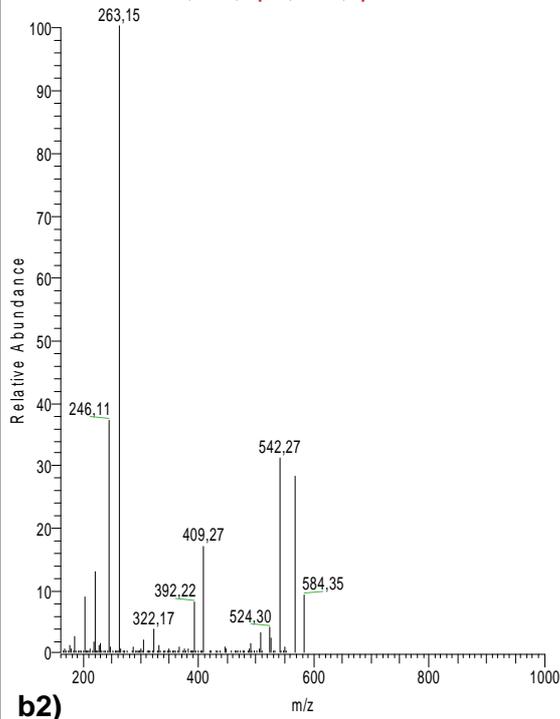


Abb. 64: MS-Chromatogramme **a1)** & **b1)** und MS²-Spektren **a2)** & **b2)** von Streptomycin und Dihydrostreptomycin (Mischstandardlösung 1 mg/L) LTQ, 10 min Gradient vgl. Tab. 27

Die Optimierung der chromatographischen und massenspektrometrischen Parameter zur Detektion von Streptomycin und Dihydrostreptomycin ist abgeschlossen worden. Wiederfindungsstudien anhand von dotierten Honigproben unter Verwendung verschiedener Probenvorbereitungstechniken (Flüssig-Flüssig-Extraktion, SPE) führten bislang nur zu geringen Wiederfindungen (<10%). Die abgeschätzten Leistungsparameter, wie Nachweis- und Bestimmungsgrenze liegen deutlich oberhalb des laborinternen MRPL's von 10 µg/kg. Hier besteht weiterer Optimierungsbedarf, um routinefähige Analysen zum Nachweis von Aminoglykosidrückständen in Honig durchführen zu können. Zur Festphasenextraktion sollten schwache Kationenaustauscher verwendet werden, da sie in den bisherigen Tests die besten Ergebnissen lieferten. Eine Online-SPE Kopplung mit einem schwachen Kationenaustauscher gekoppelt mit der HILIC-MS Analyse könnte zu höherer Reproduzierbarkeit und guten Wiederfindungen führen. Die Kopplung muss aber beinhalten, dass die Lösungsmittel zur Probenaufgabe und Elution von der Kartusche nicht unmittelbar zur HILIC-Säule gelangen. Der HILIC-Mechanismus würde durch die eingesetzten Puffer zerstört werden. Um dies zu vermeiden, sollten die Eluate neutralisiert oder verdünnt zur HILIC-Trennsäule gelangen. Dies bedarf einer komplexen Schalttechnik und die richtige Wahl der mobilen Phasen.

8.2.6 Makrolide und Lincosamide

Der Nachweis von Makroliden und Lincosamiden in Honig wurde nach Anreicherung über Oasis-HLB-Festphasenkartuschen unter ähnlichen chromatographischen Bedingungen erreicht, die Wang et al. [194] zur Analyse von Makroliden in Honig verwendete. Der tertiäre Gradient wurde im Zuge der Methodenentwicklung auf ein binäres Laufmittelsystem reduziert. Der Einsatz einer relativ kurzen HPLC-Trennsäule (50 x 2,1 mm) bringt den Vorteil mit sich, die Analysenzeit einer Probe so kurz wie möglich zu halten. Dazu wurde ein 20-minütiges Gradientenprogramm (vgl. Tab. 29) entwickelt.

Tab. 29: Chromatographische Bedingungen und Gradientenprogramm zum Nachweis von Makroliden und Lincosamiden in Honig

LC-Bedingungen	Zeit (min)	% A*	% B*
0,2 mL/min 20 µL Inj. Volumen RSC-C18-AQ, 50 x 2,1 mm, 3µm	0,0	90	10
	8,0	80	20
	10,0	0	100
	12,0	0	100
	17,0	90	10
	20,0	90	10

* Zusammensetzung der Laufmittel A und B siehe Kapitel 10.3, Seite 155

Die Makrolide können wie andere Antibiotika „Metabolite“ *in vivo* und *in vitro* bilden. Zum Beispiel entsteht aus dem Erythromycin A durch Protonieren und Abspalten eines Wassermoleküls ein Anhydro-Hemiketal (vgl. Abb. 65). Solche Umwandlungsprodukte sollten mit erfasst werden, um ein vollständiges Belastungsprofil erstellen zu können.

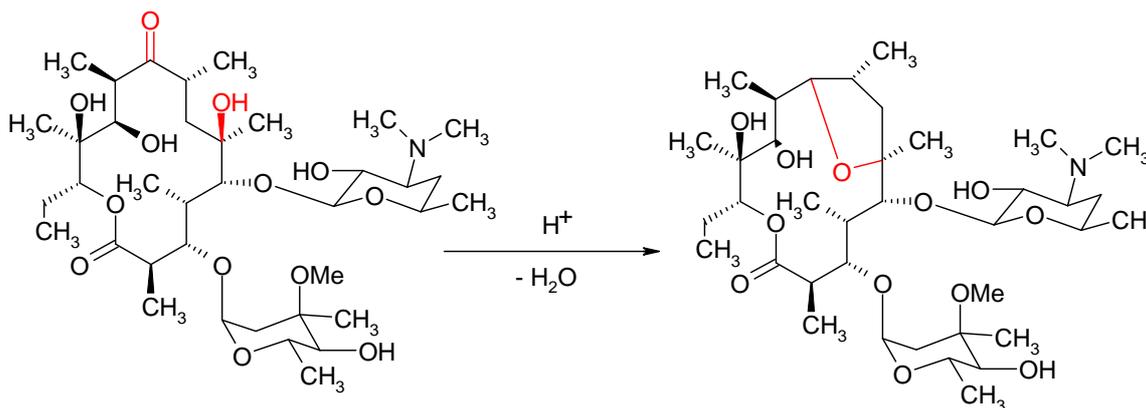


Abb. 65: Dehydratation des Erythromycin A zum Anhydro-Erythromycin A (Erythromycin A 8,9-anhydro-6,9-hemiketal) [211]

In der Abb. 66 sind die Chromatogramme und MS-Spektren des Erythromycins und der Anhydroform dargestellt. Die Dehydratation findet schon bei den leicht sauren chromatographischen Bedingungen (pH 4,1) der LC-MS Methode statt. Das m/z -Verhältnis des Quasimoleküliions des Erythromycins $[M+H]^+$ beträgt 734 m/z und nach Abspaltung eines Wassermoleküls $[M+H-H_2O]^+$ 716 m/z . In Honig, der eine saure Matrix mit einem pH Wert

8 Ergebnisse und Diskussion

von ca. 4-5 darstellt, sollte das Erythromycin ebenfalls größtenteils als Anhydro-Erythromycin vorliegen. Weist man also Anhydro-Erythromycin in Honig nach und geht von einer 1:1 Umsetzung aus, müsste ca. die gleiche Konzentration des Erythromycins vor Umwandlung enthalten gewesen sein. Die Summe der Konzentrationen Erythromycin und der Anhydro-Form sollte als Summenparameter erfasst werden, um die tatsächliche Belastung zu ermitteln.

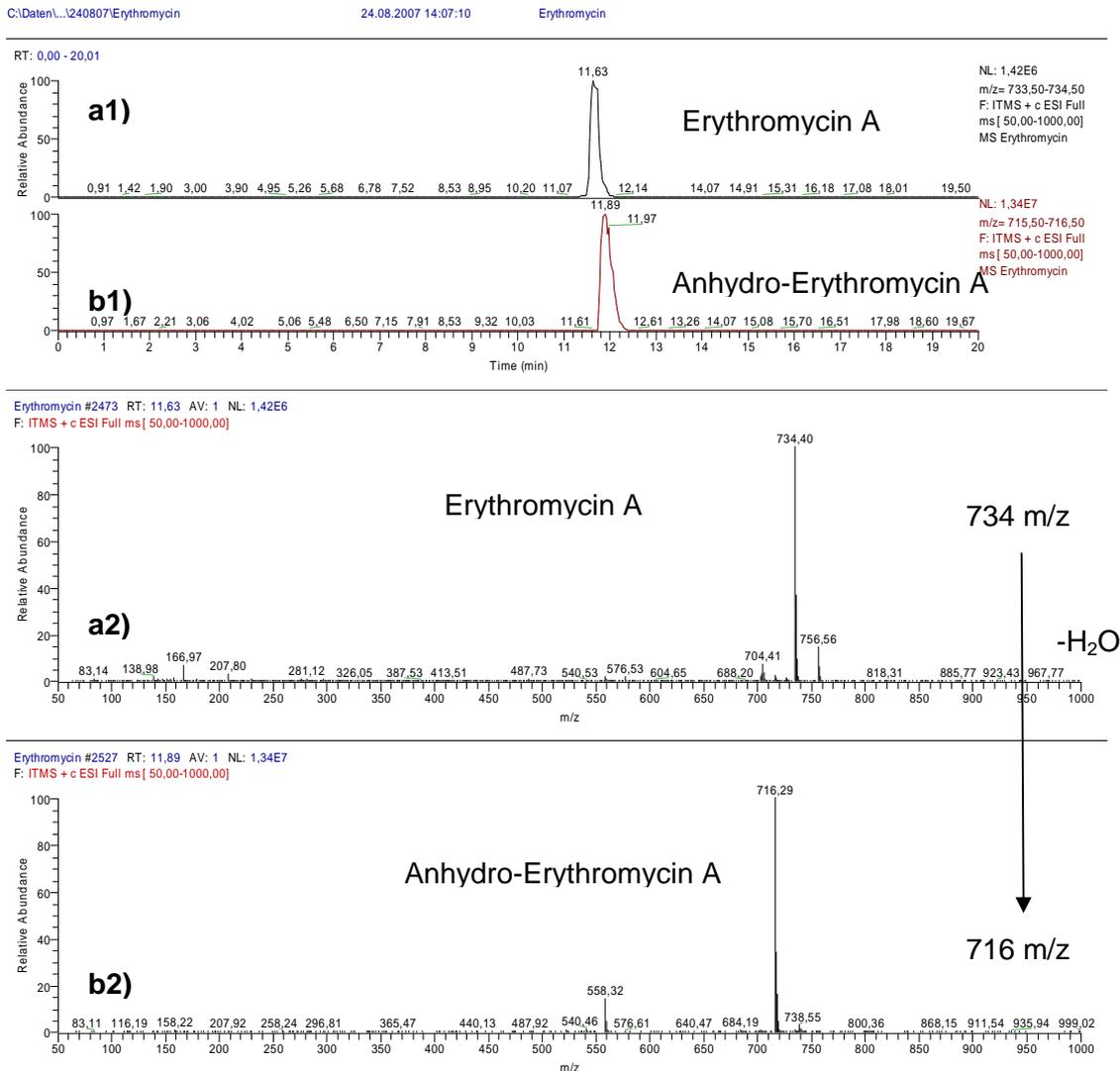


Abb. 66: MS-Chromatogramme **a1)** & **b1)** und MS²-Spektren **a2)** & **b2)** (MS²-Fullscan-Modus) einer Erythromycinstandardlösung (100 µg/L); LTQ, 20 min Gradient vgl. Tab. 29

Außer dem Anhydro-Erythromycin kann das Erythromycin A eine Vielzahl an weiteren Umwandlungs- und Abbauprodukten bilden [198]. Wenn die Probenvorbereitung in einem pH-Bereich zwischen 4 und 10 durchgeführt wird, ist Erythromycin stabil [206]. Die Extraktion von Honigen erfolgte mit dem Citratpuffer (pH 4,1), der schon bei der Sulfonamid- und Tetracyclinanalytik zum Einsatz kam. Die einzelnen Schritte der resultierenden Probenvorbereitung sind in Anhang 2 in Form eines Fließschemas dargestellt.

Die Makrolide können im ESI-Spray neben einfach geladenen Spezies auch zweifach geladene Precursorionen bilden. Erythromycin und Tylosin besitzen einen basischen Aminstickstoff und bilden einfach geladene $[M+H]^+$ Ionen. Spiramycin und Tilmicosin mit zwei tertiären Stickstoffatomen bilden sowohl einfach geladene $[M+H]^+$ Ionen als auch doppelt geladene $[M+2H]^{2+}$ Ionen [207]. Durch Variation der Tune-Parameter kann generell die prozentuale Verteilung zwischen einfach und zweifach geladenen Ionen verändert werden. Einige Antibiotika wie das Erythromycin und das Leucomycin, zeigten auch bei sehr hohen Stoßenergien (> 60%) keine nachweisbare Fragmentierung. Zur Detektion wurde der SIM-Modus (selected ion monitoring) eingesetzt. In Tab. 30 sind die MS-Parameter aufgeführt.

Tab. 30: LTQ-Massenzahlen, charakteristische Fragmente und Retentionszeiten der Makrolide und Lincosamin; HPLC-Bedingungen vgl. Tab. 29

Analyt	Abk.	M_r (g/mol)	Precursor- ionen (m/z)	Stoß- energie (%)	Produkt- ionen (m/z)	t_R [min]
Lincomycin ($C_{18}H_{34}N_2O_6S$)	Lin	406,0	407,5	20	389,3 (40%) 359,3 (100%) 126,1 (30%)	1,44
Clindamycin ($C_{18}H_{44}ClN_2O_5S$)	Cli	461,4	425,3	19	126,1 (30%) 372,2 (100%) 389,2 (20%) 407,2 (20%)	7,46
Tilmicosin ($C_{46}H_{80}N_2O_{13}$)	Til	869,1	435,6 $[M+2H]^{2+}$	15	143,0 (5%) 310,4 (5%) 340,3 (40%) 695,5 (100%)	11,05
Tylosin A ($C_{48}H_{80}NO_{20}$)	Tyl-A	915,5	916,5	30	916,0 (15%) 772,5 (100%) 598,4 (10%) 407,1 (5%)	11,56
Erythromycin A ($C_{37}H_{67}NO_{13}$)	Ery	733,9	716,4	SIM	715,5-717,5	11,65
Leucomycin ($C_{27}H_{42}NO_{10}$)	Leu	540,7	772,4	SIM	771,4-773,4	11,73
Clarithromycin ($C_{38}H_{69}NO_{13}$)	Cla	748,0	748,4	SIM	747,4-749,4	11,78
Roxithromycin ($C_{41}H_{76}N_2O_{15}$)	Rox	836,0	837,3	SIM	836,0-838,3	11,81
Josamycin ($C_{42}H_{69}NO_{15}$)	Jos	827,9	828,5	26	391,2 (10%) 582,3 (20%) 600,3 (100%) 810,4 (5%)	11,95
Spiramycin ($C_{43}H_{74}O_{14}$)	Spi	443,0 843,0	443,0 $[M+2H]^{2+}$	30	843,45 (15%) 422,4 (100%) 540,0 (5%)	12,43

Die Abb. 67 stellt das Fragmentierungsmuster von Erythromycin dar. Im ersten Schritt des Fragmentierungsprozesses werden die Zuckermoleküle abgespalten. Die weitere Erhöhung der Stoßenergie führt zur Spaltung des Lactonmakrocyclus

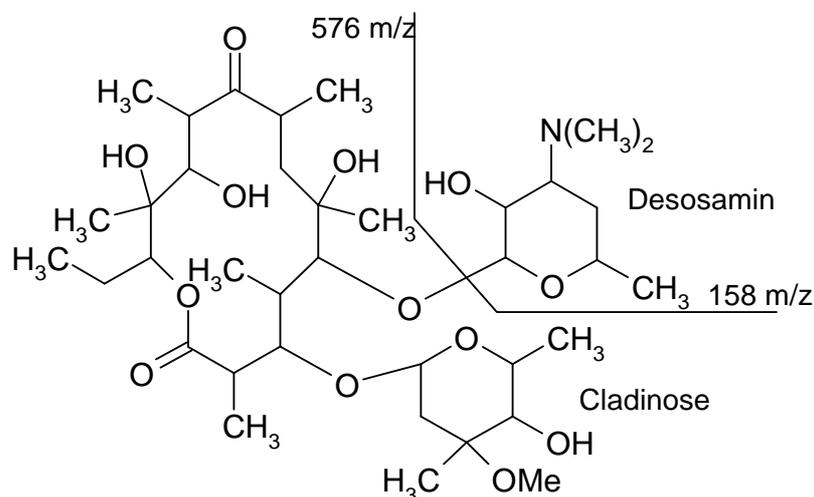


Abb. 67: Fragmentierungsmuster am Beispiel des Erythromycins [39]

Die Abb. 68 und 69 zeigen die MS-Chromatogramme eines 40 µg/L Mischstandards und eines dotierten Honigs (20 µg/kg) nach erfolgter Probenvorbereitung (vgl. Anhang 2) und LC-MS Analyse. Die Methodenentwicklung umfasste die chromatographische und massenspektrometrische Analyse der Antibiotika. Die Analysenmethode war zum Abschluss dieser Arbeit noch nicht routinefähig, da Gehalte von 10 µg/kg und niedriger für einige Analyten nicht detektierbar sind. Gründe hierfür können Matrixstörungen bei der Ionisation, zu geringe Wechselwirkung mit dem SPE-Kartuschenmaterial oder eine zu geringe Empfindlichkeit des MS-Detektors sein.

Die LC-MS Methoden, die gegenwärtig publiziert worden sind, beschäftigen sich hauptsächlich nur mit Tylosin- und Lincomycinrückständen in Honig. [196,202,204,205]. Nur Wang et al. [194,207] haben Analysen entwickelt, die ein größeres Spektrum an Analyten abdecken. Die Extraktion erfolgt nach Lösen in Puffersystemen (z.B. Citrat-, Carbonat-, Phosphatpuffer) mit SPE-Kartuschen. Die chromatographische Trennung wird durch Verwenden einer RP-C18 Phase erreicht. Im Unterschied zu den eigenen Arbeiten, werden als Detektoren Triple-Quadrupol-Massenspektrometer [194,207] und hochauflösende TOF- (Time of Flight) Geräte [194] verwendet. In der aktuellste Veröffentlichung von Wang et al. [194] werden für acht Analyten Nachweisgrenzen von 0,01 µg/kg bis 0,5 µg/kg und Wiederfindungen von 103,5 % bis 108,2 % angegeben.

Der entscheidende Vorteil gegenüber der in dieser Arbeit benutzten Ionenfallen-Technologie könnte das Verwenden des empfindlicheren Triple-Quadrupol-System sein. Sie sind um einen Faktor von ca. 10 empfindlicher als vergleichbare Ionenfallen-Massenspektrometer. Um die geforderten Mindestleistungsgrenzen dennoch zu erreichen, müsste die Probenvorbereitung soweit verbessert werden, damit die etwas geringere Empfindlichkeit der Ionenfallen-Massenspektrometer kompensiert wird.

Für das Lincomycin, als Vertreter der Substanzklasse der Lincosamide, sollte eine separate HPLC-Methode entwickelt werden. Bei der jetzigen Methode liegen so gut wie keine Wechselwirkungen mit der Trennsäule vor und die Elution erfolgt kurz nach Injektion (Totvolumen $t_R = 1$ min) der Messprobe.

8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\... \Dez07\121207\Mischstd_40-01
µg/L

12.12.2007 18:58:57

Mischstd_40-01

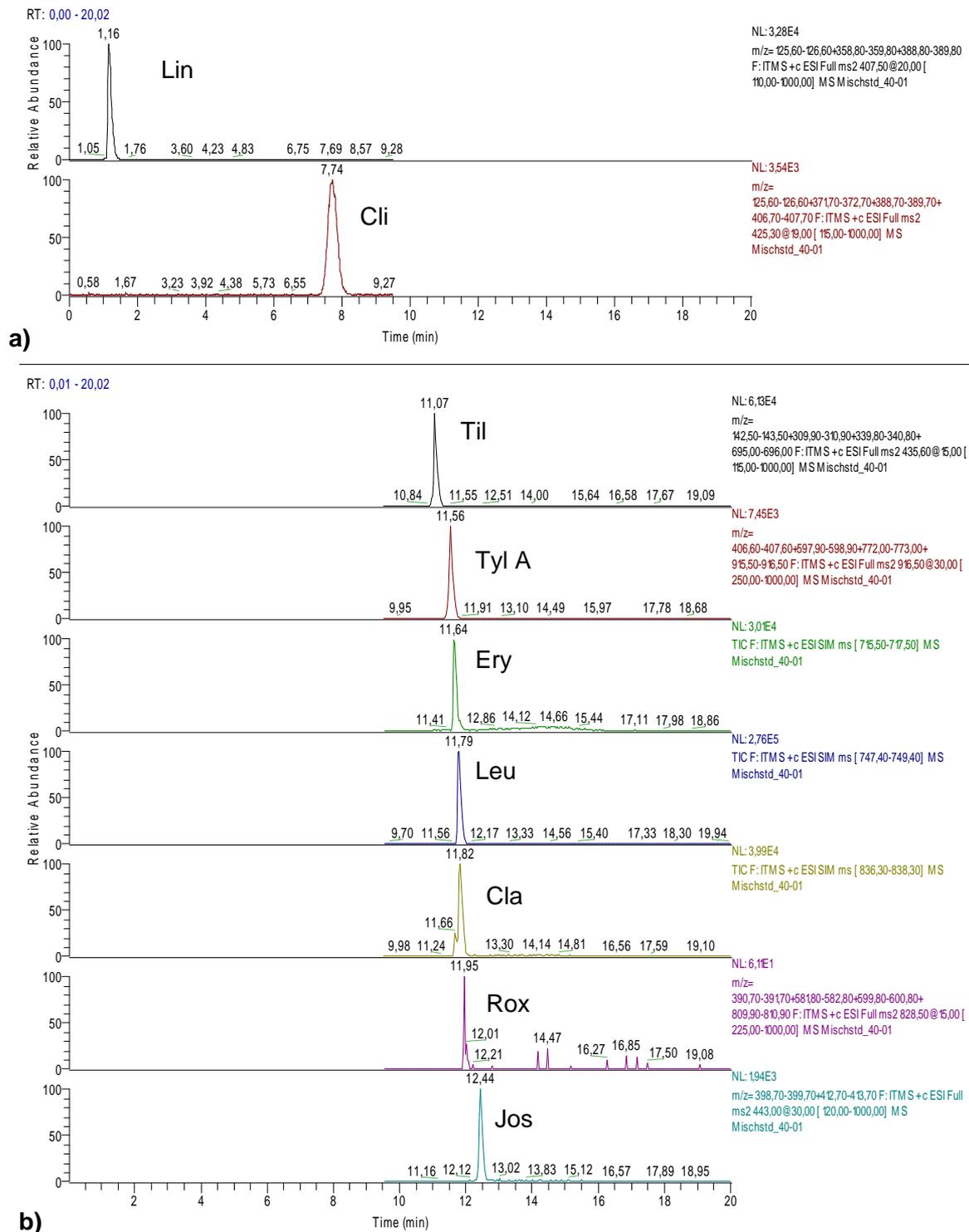


Abb. 68: MS-Chromatogramme **a)** & **b)** (MS²-Fullscan-Modus bzw. SIM-Modus) einer Mischstandardlösung verschiedener Makrolide (40 µg/L); LTQ, 20 min Gradient vgl. Tab. 29

8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...\Dez07\121207\Honig_20-01
µg/kg

13.12.2007 05:18:22

Honig_20-01

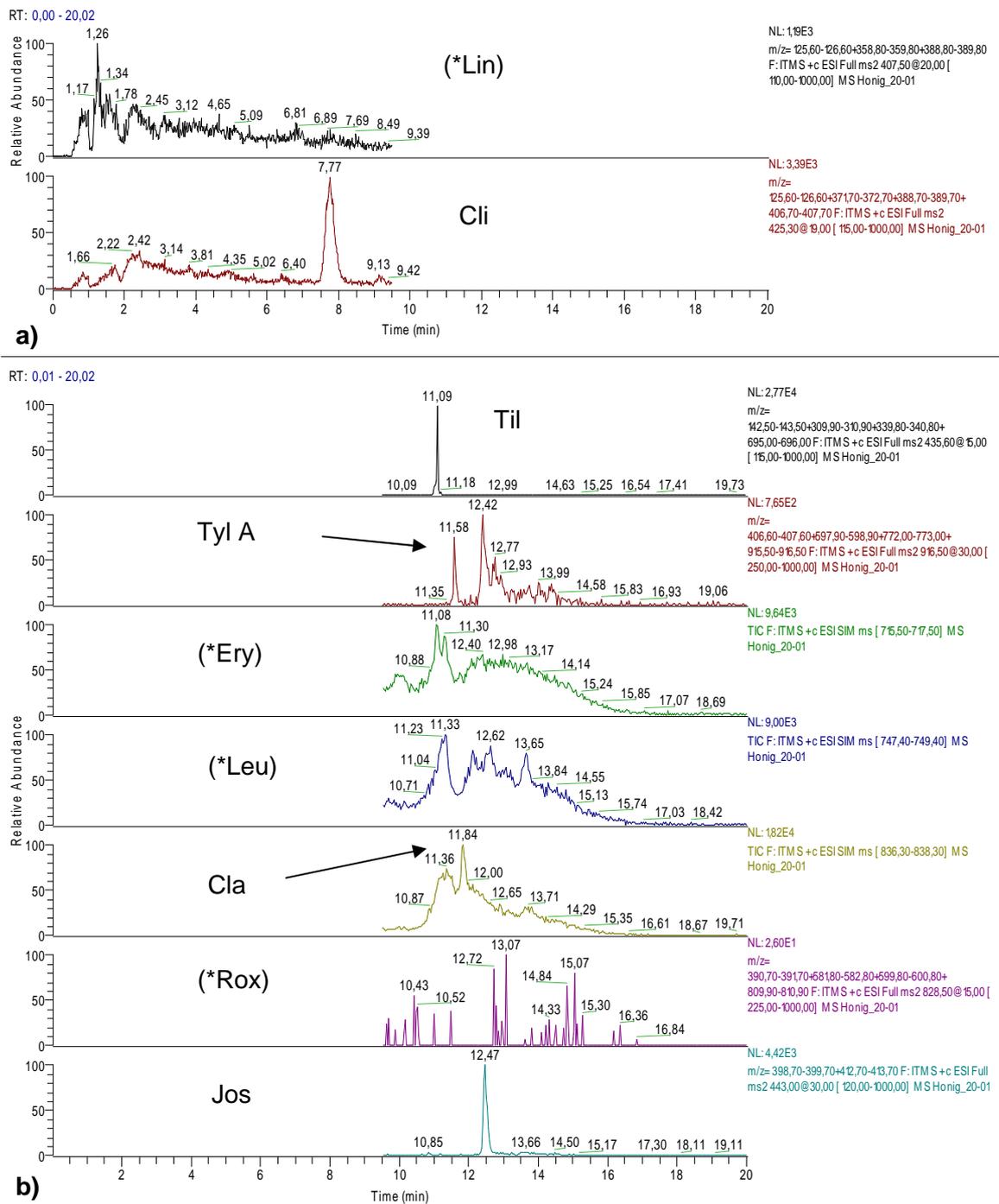


Abb. 69: MS-Chromatogramme **a)** & **b)** (MS²-Fullscan-Modus bzw. SIM-Modus) eines mit Makroliden dotierten Honigs (20 µg/kg; Akazienhonig); (*): nicht nachweisbar); LTQ, 20 min Gradient vgl. Tab. 29

8.2.7 Fluorchinolone

Zur Abtrennung von Fluorchinolone-Rückständen in unterschiedlichen Matrices werden neben der Fest-Flüssig-Extraktion [219,221,223] auch die Festphasenextraktion [220,225] angewendet. Für die Matrix Honig haben Mottier et al. [230] ein Online-Extraktionsverfahren entwickelt, das mit LC-MS gekoppelt Fluorchinolone nachweisen kann. Es stellt zurzeit das einzig publizierte Verfahren dar, das Honig auf diese Rückstände hin untersucht. Die Entwicklung der Methode zum Nachweis von Fluorchinolonen in Honig basierte auf dem Gebrauch der Oasis-HLB-Phase (Hydrophilic Lipophilic Balanced) der Fa. Waters. Sie kann für ein breites Polaritätsspektrum an Analyten eingesetzt werden, unter anderem auch für die Analytik der Fluorchinolone. Die genaue Beschreibung der Probenvorbereitung befindet sich im Anhang 2. Zur chromatographischen Trennung wurde der entwickelte Gradient zur Trennung von Sulfonamiden (vgl. Kap. 8.2.2) in Honig benutzt. In Tab. 31 sind die Bedingungen aufgeführt.

Tab. 31: Chromatographische Bedingungen und Gradientenprogramm zur Trennung von Fluorchinolonen

LC-Bedingungen	Zeit [min]	% A*	% B*
0,2 mL/min 20 µL Inj. Volumen YMC-Pack ODS-AM 150 x 3,0 mm 5 µm Vorsäule YMC ODS-AM 20 x 3,0 mm	0,0	90	10
	8,0	80	20
	10,0	0	100
	12,0	0	100
	17,0	90	10
	20,0	90	10

* Zusammensetzung der Laufmittel A und B siehe Kapitel 10.3, Seite 154

Fluorchinolone besitzen während des ESI-Prozesses eine geringe Tendenz zur Bildung von mehrfach geladenen Spezies. Als Quasimolekülonen treten $[M+H]^+$ Ionen auf [39]. Sie besitzen je nach Molekül spezifische Produktionen unterschiedlicher relativer Intensität, die eine genaue Identifizierung im MS^2 -Modus zulassen. Beispiele für eine unspezifische Fragmentierung ist die Abspaltung von Wasser und Ammoniak der Tetracycline (vgl. Kap. 8.2.1).

Tab. 32: LTQ-Massenzahlen, charakteristische Fragmente und Retentionszeiten der Fluorchinolone; HPLC-Bedingungen vgl. Tab. 31

Analyt	Abk.	M _r (g/mol)	Quasi- molekül- ionen (m/z)	Stoß- energie (%)	Produkt- ionen (m/z)	t _R [min]
Flumequin (C ₁₄ H ₁₂ FN ₃ O ₃)	Flu	261,3	262,2	22	221,1 (<5%) 244,1 (100%)	11,29
Ciprofloxacin (C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃)	Cip	331,4	332,2	21	268,2 (5%) 288,2 (100%) 314,1 (25%)	8,47
Enrofloxacin (C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃)	Enr	359,4	360,3	20	245,2 (<5%) 316,2 (100%) 342,2 (25%)	8,13
Sarafloxacin (C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃)	Sar	385,4	386,2	20	299,2 (5%) 322,2 (5%) 342,2 (100%) 368,1 (20%)	9,15
Difloxacin (C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃)	Dif	399,4	400,2	20	356,2 (100%) 382,2 (15%)	9,26
Levofloxacin ((-)- Ofloxacin) (C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄)	Lev	361,4	362,2	20	261,2 (<5%) 318,2 (100%) 344,2 (5%)	8,46
Enoxacin (Enoxolon) (C ₁₅ H ₁₇ FN ₄ O ₃)	Eno	320,3	321,2	22	234,2 (5%) 257,2 (60%) 277,2 (60%) 303,1 (100%)	8,19
Danofloxacin (C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃)	Dan	357,7	358,2	20	283,2 (10%) 294,2 (5%) 314,2 (95%) 340,2 (100%)	8,54
Sparfloxacin (C ₁₉ H ₂₂ F ₂ N ₄ O ₃)	Spa	392,4	393,3	20	292,2 (10%) 349,2 (100%) 375,2 (5%)	9,13
Fleroxacin (C ₁₇ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃)	Fle	369,3	370,2	20	269,2 (5%) 326,2 (100%) 352,1 (5%)	8,46
Norfloxacin (C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃)	Nor	319,3	320,2	22	233,2 (5%) 256,2 (5%) 276,2 (100%) 303,2 (30%)	8,35
Marbofloxacin (C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄)	Mar	362,4	363,2	20	276,1 (15%) 320,1 (100%) 345,2 (15%)	8,27
Oxolinsäure (C ₁₂ H ₁₁ NO ₅)	Oxo	261,2	262,2	22	244,1 (100%)	11,60

In Abb. 70 ist das Fragmentierungsmuster der Fluorchinolone am Beispiel des Norfloxacin dargestellt. Die Fluorchinolone bilden ein spezifisches Fragmentierungsmuster im ESI-positiv Modus. Im ersten Schritt kann entweder ein Molekül Kohlendioxid (1) oder Wasser (2) abgespalten werden. Nach Verlust der Carboxyfunktion kann im zweiten Schritt ein Molekül

HF (3) abgespalten werden oder der Piperazin-Heterocyclus durch Abstraktion von C_2H_5N (4) zum Aziridin erfolgen.

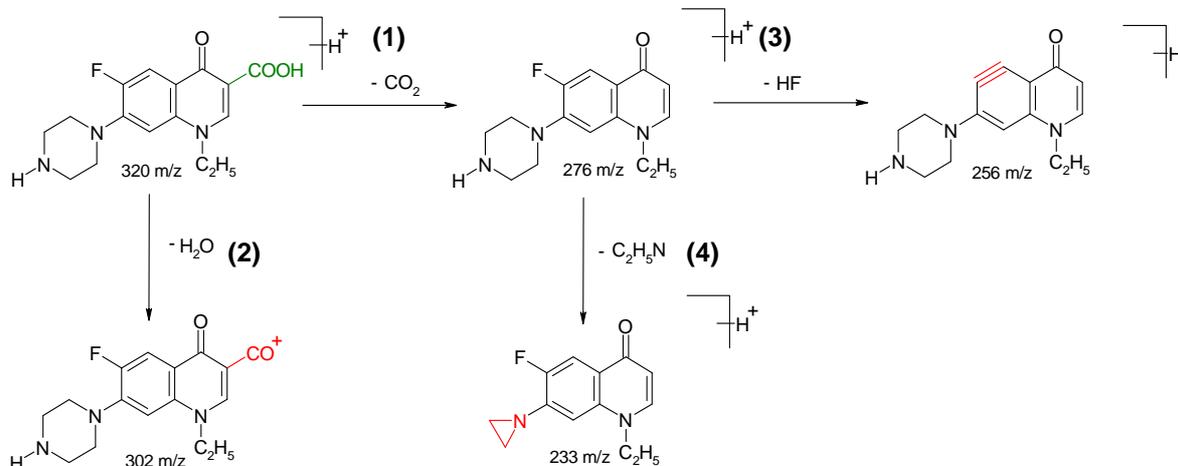


Abb. 70: Fragmentierungsmuster (ESI positiv) der Fluorchinolone am Beispiel des Norfloxacin [222]

Abb. 71 stellt die Chromatogramme einer Mischstandardlösung (20 $\mu\text{g/L}$) dar, und in Abb. 72 sind die Chromatogramme einer mit Fluorchinolonen dotierten Honigprobe (10 $\mu\text{g/kg}$; Akazienhonig) zu sehen. Oxolinsäure und Flumequin sind erst bei höheren Konzentrationen (>100 $\mu\text{g/L}$) mit ausreichender Empfindlichkeit in der Ionenfalle detektierbar. Die beiden Antibiotika besitzen im Gegensatz zu den übrigen verwendeten Fluorchinolonen weniger unpolare Substituenten und zeigen dadurch bedingt schlechtere Trenneigenschaften auf einer RP-Phase. Für Sarafloxacin und Difloxacin liegt die Nachweisgrenze mit 20 $\mu\text{g/kg}$ außerhalb des Arbeitsbereiches, der ausgehend von dem MRPL-Wert festgelegt wurde (vgl. Kap. 3). Ursache können koeludierende Matrixbestandteile sein, die die Quantifizierung beeinträchtigen. Die restlichen Strukturanaloga können aber bei einer Dotierung von 10 $\mu\text{g/kg}$ identifiziert und quantifiziert werden. Die Nachweisgrenzen befinden sich zwischen 1,60 $\mu\text{g/kg}$ (Dif) und 5,29 $\mu\text{g/kg}$ (Spa), die Bestimmungsgrenzen zwischen 5,33 $\mu\text{g/kg}$ (Dif) und 17,33 $\mu\text{g/kg}$ (Spa). Sehr gute Wiederfindungen zwischen 93,8 % (Lev) und 107,2 % (Nor) zeichnen die entwickelte Methode aus. Die Kenndaten der Validierung für jeden Analyten sind in Anhang 3 beschrieben. Mottier et al. [230] haben mit 5 $\mu\text{g/kg}$ für alle Fluorchinolone eine niedrigere Bestimmungsgrenze ermittelt. Die Wiederfindungen variieren von 85 % bis 117 % je nach Analyt. Die Autoren kommen nach Auswerten einer Marktstudie zu dem Schluss, dass hauptsächlich Ciprofloxacin und Norfloxacin ihre unerlaubte Anwendung in der Imkerei finden. Die automatisierte LC-MS Methode umfasst eine größere Anzahl von Analyten und ist empfindlicher, als das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren. Das LC-MS Verfahren mit manueller Festphasenextraktion ist aber leistungsstark genug, um die Hauptrückstände Ciprofloxacin und Norfloxacin sicher quantifizieren zu können. Um ein größeres Spektrum an Analyten zu erfassen, müsste im Zuge der Optimierung weitere

8 Ergebnisse und Diskussion

Kartuschenmaterialien getestet werden. Nach Abschluss dieses Schrittes könnte ein Online-SPE LC-MS Verfahren basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen entwickelt werden.

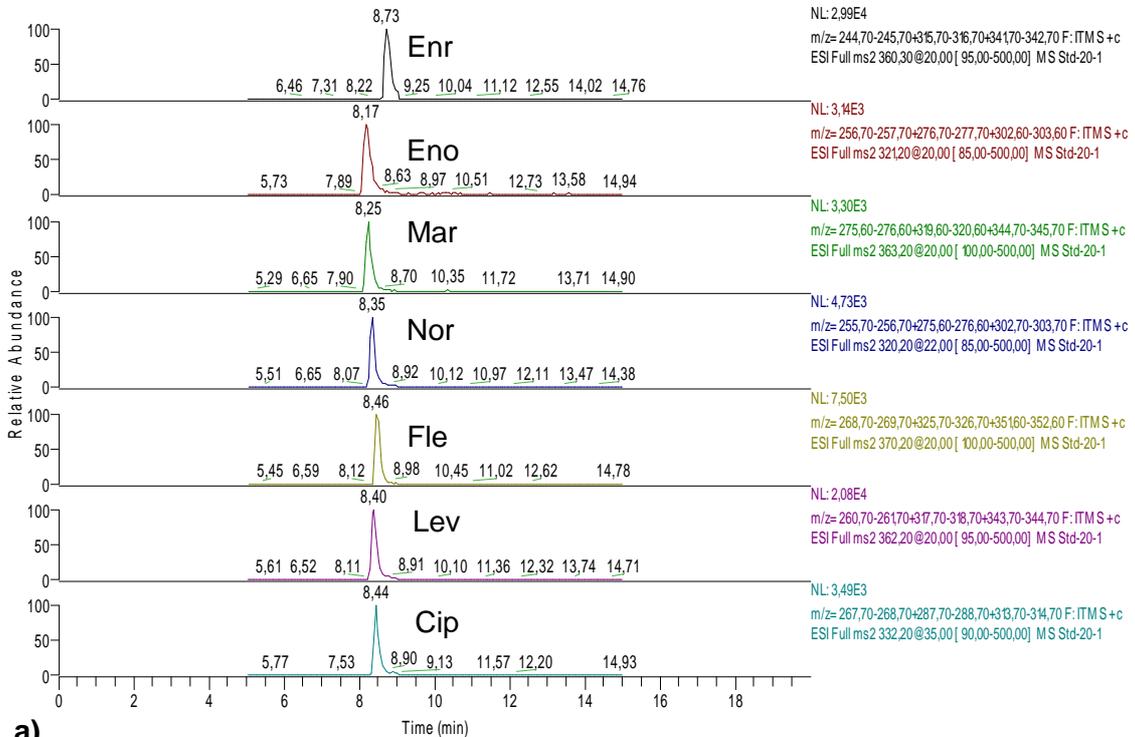
C:\Daten\... \2008\Aug08\060808\Std-20-1

06.08.2008 23:41:36

Std-20-1

C:\Daten\Fluorchinolone\Methode\Fluochinolone050808.meth

RT: 0,00 - 20,00



RT: 0,00 - 20,00

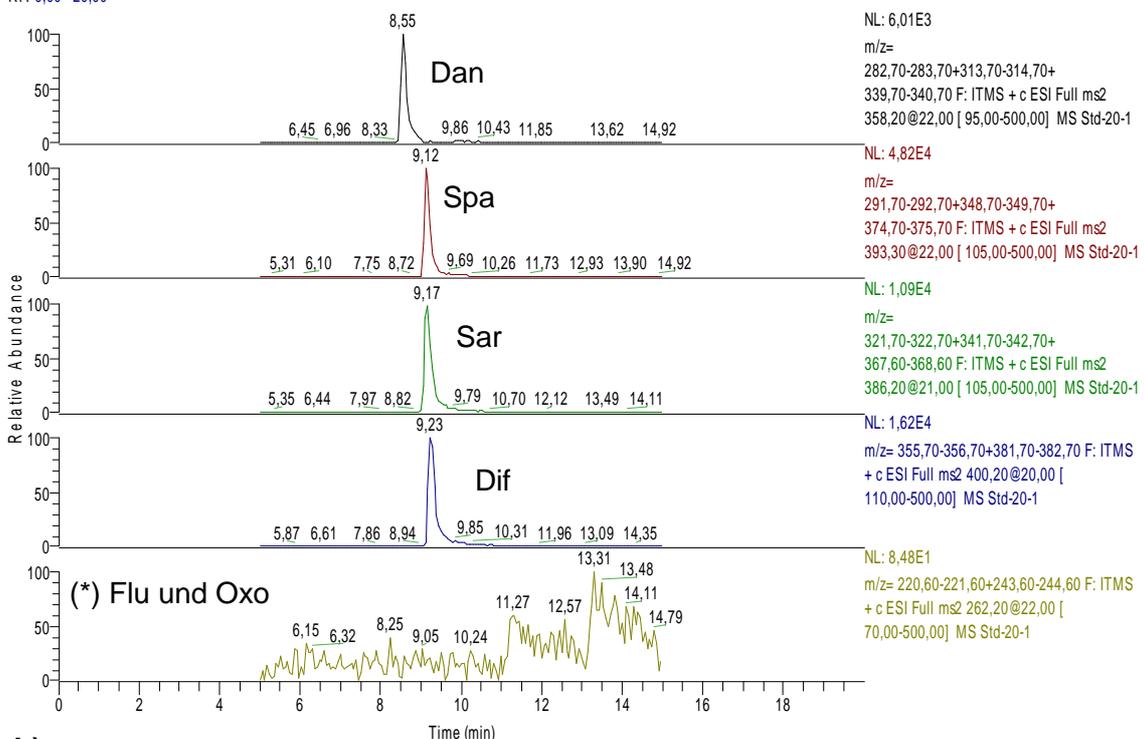


Abb. 71: MS-Chromatogramme **a)** & **b)** (MS²-Fullscan-Modus) einer Mischstandardlösung verschiedener Fluorchinolone (20 µg/L); (*): nicht nachweisbar; LTQ, 20 min Gradient vgl. Tab. 31

8 Ergebnisse und Diskussion

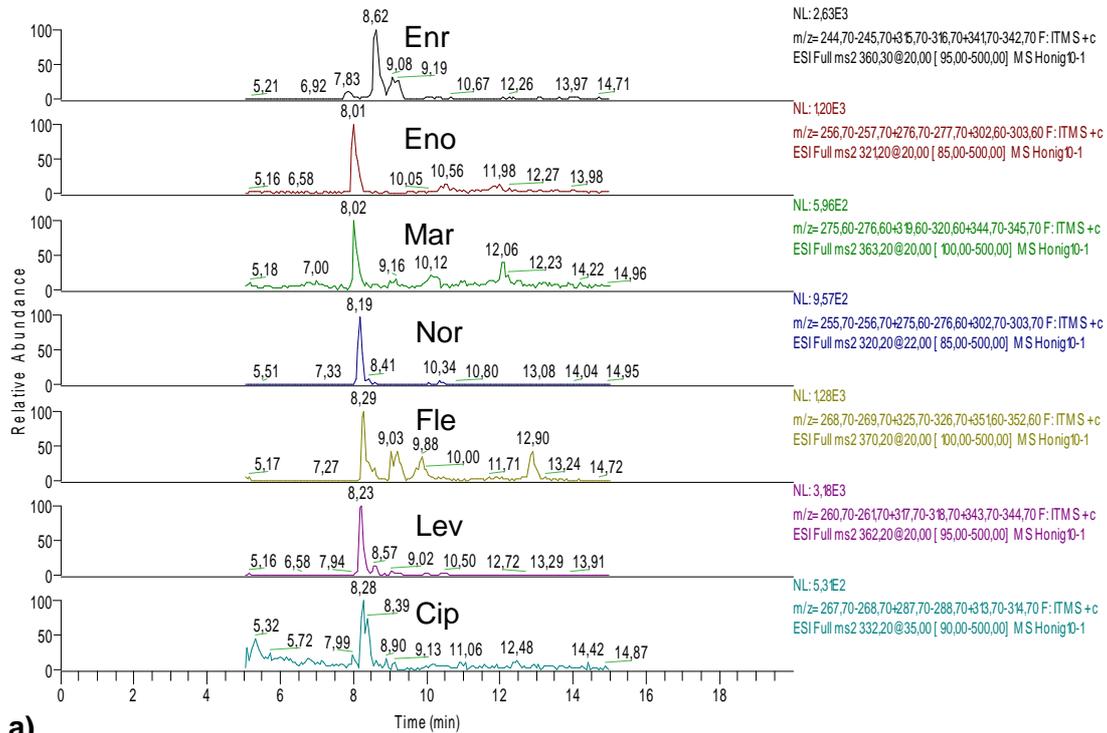
C:\Daten\...2008\Aug08\060808\Honig10-1

06.08.2008 14:46:47

Honig-10-1

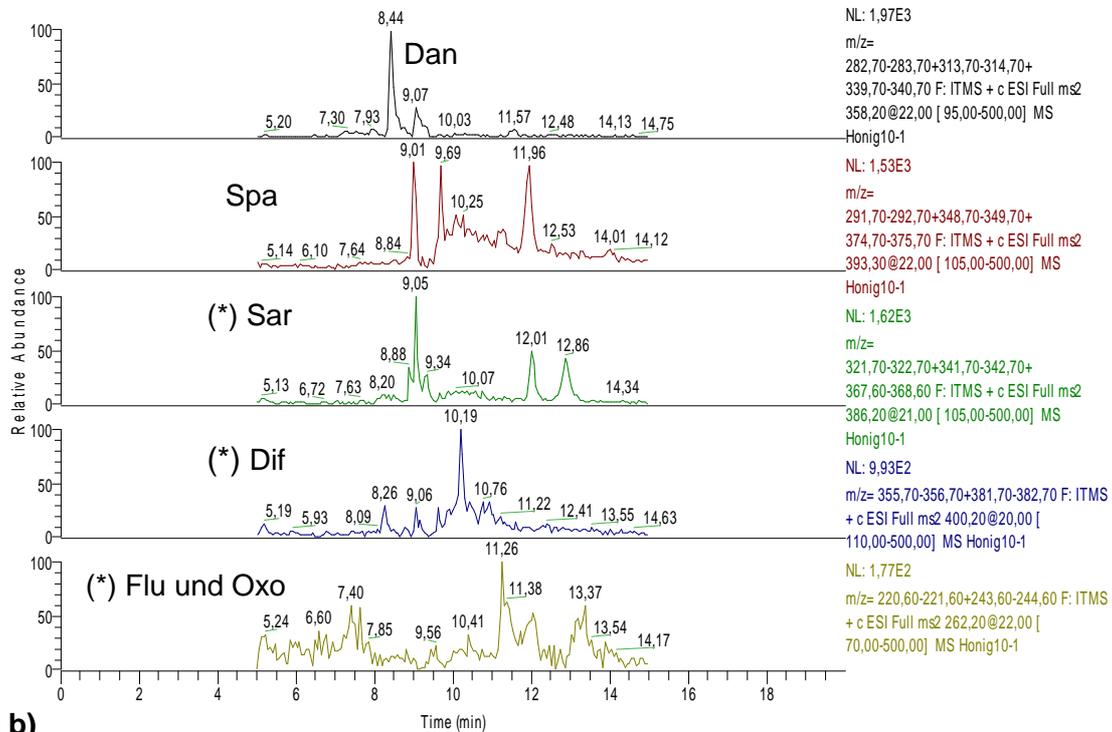
C:\Daten\Fluorchinolone\Methode\Fluochinolone050808.meth

RT: 0,00 - 20,00



a)

RT: 0,00 - 20,00



b)

Abb. 72: MS-Chromatogramme **a)** & **b)** (MS²-Fullscan-Modus) einer mit Fluorchinolone dotierten Honigprobe (10 µg/kg; Akazienhonig); (*): nicht nachweisbar; LTQ, 20 min Gradient vgl. Tab. 31

8.3 Validierung der entwickelten LC-MS-Verfahren

Die entwickelten Verfahren zum Nachweis von Antibiotikarückständen in Honig wurden, bevor sie für Rückstandskontrollen im Routine-Betrieb angewandt wurden, validiert. Validierung (lat. validus: stark, kräftig, gesund; engl. valid: gültig) bezeichnet eine analytische Mess- oder Prüfmethode die für die Erfüllung einer ganz bestimmten Aufgabe geeignet ist. Die Ergebnisse müssen zudem in geeigneter Weise dokumentiert werden. Laut Literatur sind eine Reihe von Definitionen für die Validierung bekannt [297]. Eine Definition wird in der europäischen Norm EN ISO 17025 genannt: "Validierung ist die Bestätigung durch Untersuchung und die Erbringung eines effektiven Nachweises, dass die jeweiligen Anforderungen eines bestimmten Verwendungszweckes erfüllt sind". Diese Begriffsdefinition wurde in der „Entscheidung 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“ zitiert [298]. Diese Entscheidung ebnete den Weg für eine einheitliche Bewertung von Prüf- und Analysemethoden, die in Laboratorien entwickelt werden. Das entwickelte Verfahren muss jedoch aus naturwissenschaftlicher Sicht nicht das „beste Verfahren“ sein. Wichtig dagegen ist, dass die Analysemethode definierte Qualitätsmerkmale beinhaltet. Dazu zählen:

- Linearität
- Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen
- Präzision
- Richtigkeit
- Robustheit
- Spezifität
- Stabilität
- Wahl des Arbeitsbereiches

Die Rahmenbedingungen zur Ermittlung dieser Qualitätsmerkmale, werden durch die entsprechende Fragestellung und die Erfordernisse des Anwenders festgelegt. Für eine Untersuchung von Honig auf Antibiotika muss zum Beispiel der Arbeitsbereich den geforderten Mindestleistungsparametern entsprechen.

Die Validierung der entwickelten LC-MS-Methoden zum Nachweis von Antibiotika in Honig wurde auf der Grundlage folgender Richtlinien, Normen und Fachliteratur durchgeführt.

- DIN ISO 17025: General requirement for the competence of calibration and testing laboratories (1999) [299]
- Entscheidung der Kommission (2002/657/EG) vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG [298]
- Entscheidung der Kommission (2003/181/EG) vom 13. März 2003 zur Änderung der Entscheidung 2002/657/EG [24,300-301]
- S. Kromidas; Handbuch der Validierung in der Analytik. Wiley VCH, Weinheim (2003) [302]
- W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert; Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie. VCH, Weinheim (1992) [303]
- K. Doerffel; Statistik in der analytischen Chemie. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1990) [304]

Die Validierung wird im Folgenden beispielhaft für die Bestimmung von Chlortetracyclin beschrieben. Die Validierungsparameter umfassen die Wahl des Arbeitsbereiches, die Linearität, Wiederfindung, Präzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen. Die Stabilität sowie die Selektivität wurden im Rahmen der Methodenentwicklung überprüft. Nur Analyseverfahren, die die Mindestleistungsgrenzen (Bsp. Trimethoprim 10 µg/kg) erreichen, sind validiert worden. Die Verfahrenskenndaten, Diagramme usw. für die weiteren Analyten sind in Anhang 3 aufgelistet

8.3.1 Wahl des Arbeitsbereiches

Je nach Anwendungsziel und möglicher technischer Umsetzung wird zu Beginn der Validierung der Arbeitsbereich gewählt. Der Arbeitsbereich für den Nachweis von Antibiotika in Honig wird durch Mindestleistungsgrenzen (MRL- und MRPL-Werte) und die Art des Analyseverfahrens festgelegt. Der Arbeitsbereich beschreibt den Konzentrationsbereich des Analyten in der zu Messprobe mit einem akzeptablen Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität. Zwischen Analytkonzentration und Messwert muss ein linearer Zusammenhang bestehen. Die Messwerte an der unteren Arbeitsbereichsgrenze müssen sich von den Messwerten des Verfahrensblindwertes signifikant unterscheiden. Die untere Arbeitsbereichsgrenze muss mindestens gleich oder größer der Nachweisgrenze sein. Die geforderte Analysenpräzision muss im gesamten Arbeitsbereich erreichbar sein. Mit steigender Analytkonzentration nimmt die Analysenunpräzision absolut zu. Ist ein großer

Arbeitsbereich notwendig, sollte der Bereich in überlappende Teilbereiche aufgeteilt werden. Weiterhin muss die Analysenpräzision über den gesamten Arbeitsbereich konstant sein. Wenn eine Varianzinhomogenität vorliegt, steigt die Unpräzision für die mit der Kalibrierfunktion ermittelten Analyseergebnisse. In diesem Fall muss der gewählte Arbeitsbereich verkleinert werden, bis die Bedingungen erfüllt sind, oder es sind andere Kalibrierungsmodelle zu wählen. Die Arbeitsbereiche für die Rückstandsanalytik von Antibiotika in Honig sind in Tab. 33 aufgeführt.

Tab. 33: Wahl der Arbeitsbereiche

Substanzklasse	Arbeitsbereich [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Tetracycline	0-100
Sulfonamide & Trimethoprim	0-100
Chloramphenicol	0-10
Nitrofurane	0-10
Fluorchinolone	0-100

8.3.2 Überprüfung der Kalibrierung

Nach Erstellung der Kalibrierfunktion und Ermittlung der Verfahrenskennndaten wird die Linearität überprüft.

Dazu können folgende statistische Verfahren angewendet werden:

- Anpassungstest nach MANDEL [305]
- Residualanalyse
- Absicherung der unteren Grenze des Arbeitsbereiches
- Überprüfung der Empfindlichkeit

8.3.2.1 Kalibrierfunktion

Um die Kalibrierfunktion zu ermitteln, wurden sieben Konzentrationen (gleichmäßig über den entsprechenden Arbeitsbereich verteilt und jeweils dreimal mittels LC-MS chromatographisch gemessen. Die allgemeine Formel für eine lineare und eine quadratische Regression lauten:

Gleichung 1: $y = ax + b$ Funktion 1. Grades

Gleichung 2: $y = ax^2 + bx + c$ Funktion 2. Grades

mit den Konstanten a: Steigung, b: y-Achsenabschnitt, c: Konstante der quadratischen Funktion, x: Messwert (Peakfläche) und y: Konzentration des Analyten in der Probe. Die Konstante b stellt den berechneten Blindwert der Kalibration dar. Die Steigung a der Funktion gibt die Empfindlichkeit des Messverfahrens wieder.

Sie wird nach folgender Formel berechnet:

Gleichung 3:
$$a = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Die Mittelwerte der Konzentrationen \bar{y} und des Detektorsignals \bar{x} ergeben sich nach folgendem Zusammenhang:

Gleichung 4:
$$\bar{y} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N y_i$$

Gleichung 5:
$$\bar{x} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_i$$

In der Abb. 73 sind die ermittelten Kalibrierfunktion, die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß R beispielhaft für das Antibiotikum Chlortetracyclin angegeben. In Anhang 3.1 sind die Geradengleichungen, das Bestimmtheitsmaß und in 3.2 die graphische Darstellung der anderen Antibiotika aufgeführt.

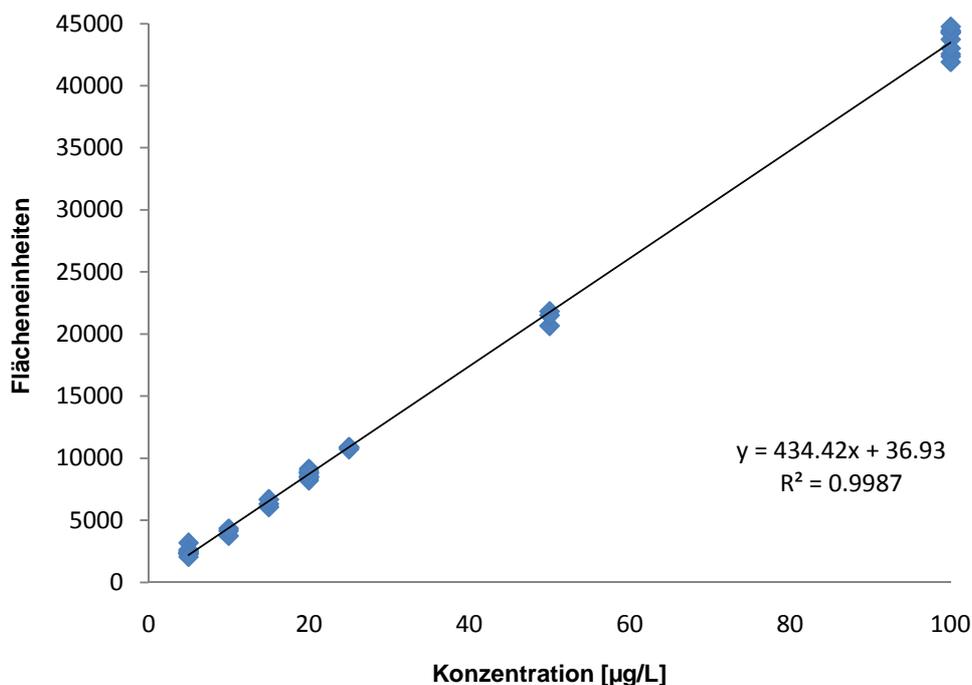


Abb. 73: Kalibrierfunktion von für die Bestimmung von Chlortetracyclin

8.3.2.2 Überprüfung der Linearität

Durch einen Anpassungstest nach MANDEL [305] wird überprüft ob es sich um einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Messwert handelt. Dazu wird neben der linearen Funktion 1. Grades die quadratische Funktion 2. Grades für die Messwerte ermittelt. Aus den zwei Reststandardabweichungen s_{y1} und s_{y2} wird die Differenz der Abweichungsvarianzen DS berechnet. Anschließend wird die Prüfgröße, PG, berechnet und dieser mit dem Tabellenwert aus der F-Tabelle (Freiheitsgrad $f_1 = 1$, $f_2 = N-3$, $P = 99\%$) verglichen. Wenn $PG \leq F$, ist die Kalibrierfunktion linear, bei $PG > F$ ist die Kalibrierfunktion in diesem Arbeitsbereich nicht linear.

Die Berechnung der Differenz der Abweichungsvarianzen ergibt sich nach folgendem mathematischen Zusammenhang:

$$\text{Gleichung 6:} \quad DS^2 = (N - 2) \cdot s_{y1}^2 - (N - 3) \cdot s_{y2}^2$$

$$\text{Gleichung 7:} \quad PG = \frac{DS^2}{s^2 y^2}$$

Die Berechnung ergibt für Chlortetracyclin: $PG = 3,21 < F = 7,33$. Die Kalibrierung ist linear. Die Berechnungen der Prüfgrößen für die weiteren Analyten befinden sich im Anhang 3.3.

Ein weiteres Mittel zur Überprüfung der Linearität der Kalibrierfunktion bietet die Residualanalyse. Als Residuen d_i bezeichnet man die vertikalen Abstände der Messwerte von der ermittelten Regressionsgerade. In einer graphischen Darstellung wird der gewählte Arbeitsbereich als x-Achse und die positive oder negative Abweichung als y-Achse verwendet. Insofern das berechnete mathematische Modell richtig ist, so herrscht eine Normalverteilung der Residuen um das Nullniveau vor. Falls dem nicht so ist, muss der Arbeitsbereich angepasst werden oder mehrere Konzentrationen zur Berechnung des mathematischen Modells herangezogen werden.

Residuen d_i :

$$\text{Gleichung 8:} \quad d_i = y_i - \hat{y}_i$$

Für $i = 1, \dots, n$

Mit y_i = Messwert der Peakfläche

\hat{y}_i = zu y_i gehöriger Schätzwert (aus der Regressionsfunktion)

Für die Bestimmung von Chlortetracyclin sind die Residuen in Abhängigkeit von der Konzentration in Abb. 84 aufgetragen. Es sind keine Trends erkennbar und die Residuen sind normalverteilt. Der lineare Ansatz ist somit als richtig anzusehen. In Anhang 3.4 sind alle weiteren graphischen Darstellungen für die restlichen Analyten zu sehen.

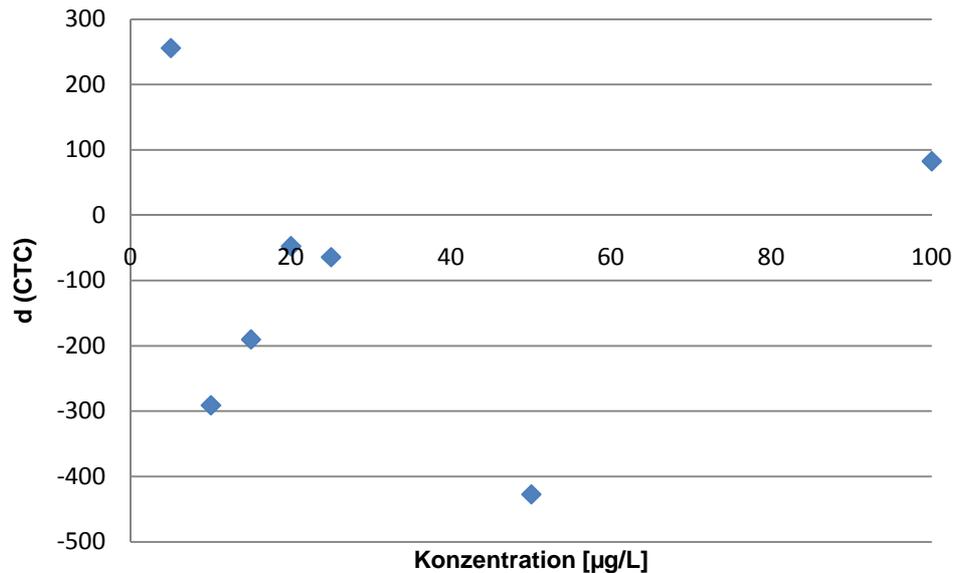


Abb. 74: Graphische Darstellung der Residuen in Abhängigkeit von der Konzentration für die Bestimmung von CTC in Honig

8.3.2.3 Überprüfung der Präzision

Als nächster Schritt muss die untere Arbeitsbereichsgrenze abgesichert werden. Eine Kalibrierfunktion ist nur dann für quantitative Analysen verwendbar, wenn sich alle später mit dieser mathematischen Funktion berechneten Analyseergebnisse signifikant von Null unterscheiden. Es wird überprüft, ob sich die untere Arbeitsbereichsgrenze signifikant von null unterscheidet. Um den Prüfwert x_p zu bestimmen, werden folgende Formeln zur Berechnung verwendet:

Gleichung 9:
$$x_p = 2VB_x (y = y_p); \quad \text{mit } t(f = N - 2, P = 95\%)$$

mit:

Gleichung 10:
$$x_p = 2 \cdot s_{x_0} \cdot t \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_p - \bar{y})^2}{a^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

mit:

Gleichung 11:
$$y_p = b + s_{y_1} \cdot t \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

Die Berechnungsformeln für den Prüfwert sind identisch mit denjenigen zur Ermittlung der Nachweisgrenze (vgl. Kap. 8.3.3).

Wenn der Prüfwert $x_p \leq x_1$ ist, so ist der gesamte Arbeitsbereich statistisch abgesichert, .d.h. die untere Grenze des Arbeitsbereichs x_1 unterscheidet sich signifikant von der Konzentration null. Wenn der Prüfwert $x_p > x_1$ ist, dann unterscheidet sich die untere Arbeitsbereichsgrenze x_1 nicht signifikant von der Konzentration null, und der gewählte

Arbeitsbereich ist somit erst für eine Analytkonzentration $> x_p$ abgesichert. In diesem Fall sind quantitative Analysen erst ab diesem Konzentrationswert möglich.

Die Empfindlichkeit einer Methode kann durch die Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} ausgedrückt werden. Die ist ein Maß für die Präzision einer Messreihe. Dazu wird die Reststandardabweichung s_{y_1} , also die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade berechnet und auf die Mitte des Arbeitsbereiches normiert (durch Division der Reststandardabweichung mit der Steigung der Regressionsgeraden). Man erhält durch diesen Normierungsschritt die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x_0} , die zur Qualitätskontrolle von routineanalytischen Verfahren benutzt wird.

Die Bestimmung der Reststandardabweichung für eine Funktion 1. und 2. Grades wird wie folgt durchgeführt:

Gleichung 12:
$$s_{y_1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$$
 Funktion 1. Grades

Gleichung 13:
$$s_{y_2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-3}}$$
 Funktion 2. Grades

Mit Gleichung 14:
$$\hat{y}_i = b + ax_i$$
 (berechnete Peakfläche)

$$y_i = \text{Mittelwert der experimentell ermittelten Peakfläche}$$

Die Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} und die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x_0} werden durch folgende Gleichungen berechnet:

Gleichung 15:
$$s_{x_0} = \frac{s_{y_1}}{a}$$

Gleichung 16:
$$V_{x_0} = \frac{s_{x_0} \cdot 100\%}{\bar{x}}$$

Die Berechnungen der Verfahrenskenndaten sind beispielhaft für das Chlortetracyclin in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Alle weiteren Daten sind im Anhang 3.5 aufgelistet.

Tab. 34: Verfahrenskenndaten der Kalibrierfunktion für Chlortetracyclin im Konzentrationsbereich 5 – 100 µg/L

Name	s_y [Flächeneinheiten]	s_{x_0} [µg/L]	V_{x_0} [%]
Chlortetracyclin	586,53	1,35	3,66

8.3.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze ist nach der DIN Norm 32645 [306,307] die kleinste qualitativ noch nachweisbare Analyt-Menge in der Messprobe. Man stellt sich die Frage: Ist der Analyt vorhanden (ja/nein)? Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt 50%, das heißt zu 50% handelt es sich um einen Leerwert und zu 50% um einen Messwert. In älteren Vorschriften wird auch die Bezeichnung Nachweisvermögen benutzt. Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste noch quantifizierbare Analyt-Menge, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantitativ erfasst werden kann. Neben Nachweis- und Bestimmungsgrenze werden zudem in der DIN-Norm 32645 ein Kritischer Wert der Messgröße und die Erfassungsgrenze definiert. Der Kritische Wert der Messgröße ist definiert als der Messwert, bei dessen Überschreitung unter Zugrundelegung einer definierten Irrtumswahrscheinlichkeit erkannt wird, dass die Menge des Analyten in der Probe größer ist als diejenige in der Leerprobe. Die Erfassungsgrenze bezeichnet die Mindestmenge, die mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann. Sinngemäß identisch ist die Entscheidungsgrenze, die in der ISO 11843-1 (DIN 55359) [308] definiert wird. Die Entscheidungsgrenze ist der geringste Gehalt des Analyten, der bei tatsächlicher Anwesenheit mit angemessener statistischer Sicherheit nachgewiesen wird. Die Erfassung- bzw. Entscheidungsgrenze wird oft als zweifache Nachweisgrenze mit angegeben.

Durch die europäische Richtlinie 96/23/EG vom 12. August 2002 wurden zusätzlich zu den nationalen Vorschriften die Entscheidungsgrenze und das Nachweisvermögen definiert. Die Entscheidungsgrenze cc_{α} ist laut Begriffsbestimmung der Richtlinie: „der Grenzwert, bei und über dem mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit α bestimmt werden kann, dass eine Probe positiv ist“. Das Nachweisvermögen cc_{β} einer Analysenmethode beschreibt den „kleinsten Gehalt des Stoffs, der mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit β in einer Probe nachgewiesen, identifiziert und/oder quantifiziert werden kann“ [298].

Als Voraussetzung für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze bzw. dem Nachweisvermögen und der Entscheidungsgrenze muss der zu analysierende Analyt einwandfrei nach folgenden Kriterien identifiziert worden sein:

- Spezifität
- Vergleich der Retentionszeiten
- Absicherung durch zertifizierte Referenzsubstanzen
- Bestimmung der IP`s (Identification Points) mit Hilfe des Massendetektors
- Selektivität

Zudem muss anhand einer Stabilitätsstudie die Stabilität bei verschiedenen Lagerungsbedingungen untersucht werden und bei den Routineanalysen berücksichtigt werden.

Zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wird aus der Vielzahl der Definitionen und Berechnungsverfahren nach der DIN Norm 32645 [306] vorgegangen, die auch von Kromidas [297,302,309], Funk [303] und Neitzel [310,311] beschrieben werden. Als Vergleich dazu werden die berechneten Analyt-Konzentrationen nach der europäischen Richtlinie mit aufgeführt. Zur Berechnung wird unter anderem die Software Valoo verwendet. Grundlage zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze bilden die Kalibrationsgeraden für die einzelnen Antibiotika. Dazu wurden zum einem Standardlösungen mit Analyt-Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze gemessen und zum anderen unbelastete Honigproben mit Gehalten dotiert die um den Wert der spezifischen Leistungsparameter (MRL, MRPL-Wert) liegen. Die so dotierten Proben werden nach den jeweiligen Arbeitsvorschriften aufgearbeitet und mit LC-MS gemessen.

Für die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 werden folgende Gleichungen herangezogen:

$$\text{Gleichung 17:} \quad \text{NWG} = \frac{3,3 \cdot s_{y1}}{s}$$

$$\text{Gleichung 18:} \quad \text{BG} = \frac{10 \cdot s_{y1}}{s}$$

Zur Bestimmung der Entscheidungsgrenze und des Nachweisvermögens nach der Richtlinie 96/23/EG werden die folgenden Definitionen verwendet:

Leerwertmaterial wird in gleichmäßigen Schritten in der Konzentration der geforderten Mindestleistungsgrenze und höheren Konzentrationen dotiert und analysiert. Das Signal wird gegen die zugesetzte Konzentration aufgetragen. Die entsprechende Konzentration am y-Abschnitt plus das 2,33fache (1,64fache bei Stoffen mit zulässigem Grenzwert) der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit des Achsenabschnitts ist gleich der Entscheidungsgrenze cc_{α} [294].

cc_{α} = Grenzwert, bei dem falsch positive Befunde mit 99 %iger (verbotene Stoffe $\alpha = 1$ %) 95 %iger (MRL-Subst. $\alpha = 5$ %) Sicherheit auszuschließen sind.

Leerwertmaterial wird in gleichmäßigen Schritten in der Konzentration der geforderten Mindestleistungsgrenze und höheren Konzentrationen dotiert und analysiert. Das Signal wird gegen die zugesetzte Konzentration aufgetragen.

Die entsprechende Konzentration am y -Abschnitt plus das 1,64fache der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit des mittleren gemessenen Gehaltes an der Entscheidungsgrenze ist gleich dem Nachweisvermögen cc_{β} [298].

cc_{β} = Ausschluss von falsch negativen Ergebnissen mit 95 %iger Sicherheit
(verbotene Stoffe und MRL-Subst. $\beta = 5\%$)

Die Tabelle 37 gibt die berechneten Konzentrationen für Chlortetracyclin wieder. Alle weiteren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind im Anhang 3.6 aufgeführt.

Tab. 35: NWG, BG, cc_{α} , cc_{β} für die Bestimmung von Chlortetracyclin in Honig

Abk.	NWG [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	BG [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	cc_{α} [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	cc_{β} [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Chlortetracyclin	2,00	6,70	0,99	1,63

Auf eine Stabilitätsstudie der Antibiotika unter verschiedenen Lagerungsbedingungen wurde verzichtet, da im Routinebetrieb die Stammlösungen im 4 Wochen Rhythmus frisch angesetzt werden.

8.3.3.1 Spezifität

Unter Spezifität versteht man die Fähigkeit einer Methode, *eine Substanz oder eine Substanzklasse* ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Matrixkomponenten zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren. Geeignete Identifizierungstests sollten in der Lage sein, zwischen Substanzen mit eng verwandter Struktur zu unterscheiden. Hierfür eignet sich die Kopplung von HPLC mit einem massenselektiven Detektor sehr gut.

Signale, die vermeintlich Positivbefunde darstellen können, werden anhand von Signalen, die durch zertifizierte Referenzmaterialien (sofern vorhanden) erzeugt wurden, verglichen. Dabei wird zunächst die Retentionszeit berücksichtigt und die Auflösung von Nachbarpeaks bewertet. Eine viel genauere Zuordnung bietet die Massendetektion. Stimmen MS- und MS²-Spektren des Signals in der Probe mit dem Signal des Referenzmaterials überein, kann man mit großer Sicherheit von den gleichen Substanzen ausgehen. Bei Isomeren/Epimeren/Tautomeren muss gegebenenfalls ein MS³-Scan herangezogen werden, um eine eindeutige Identifizierung zu gewährleisten. Durch die europäische Richtlinie 96/23/EG ist ein System von Identification Points (IP) eingeführt worden, welches den einzelnen Scans und MS-Experimenten eine verschiedene Anzahl von Punkten zuweist und eine Mindestzahl von Gesamtpunkten vorgibt, um eine Identifizierung vornehmen zu können [298]. Im Kapitel 8.3.3.2 werden diese Aspekte näher beschrieben.

8.3.3.2 Selektivität

Die Selektivität beschreibt die Fähigkeit einer Analysenmethode, *verschieden, nebeneinander zu bestimmende Komponenten* ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren. Nach der IUPAC-Definition [297] wird Spezifität als ultimativer Grad an Selektivität definiert. Wichtigstes Indiz für eine spezifische bzw. selektive Methode ist der Nachweis einer fehlenden Beeinflussung des Messergebnisses. Dies ist eine essentielle Voraussetzung für die Richtigkeit und damit kritische Grundlage des Verfahrens. Ist somit die Richtigkeit nachgewiesen worden, gilt das Analysenverfahren selektiv und systematische Fehler werden ausgeschlossen. Im Falle eines LC-MS-Verfahrens wird im ersten Schritt die Retentionszeit in einer dotierten Probe und einer Kalibrierstandardkonzentration verglichen. Die Abweichung der Zeiten darf 5% nicht überschreiten. Als zweiten Schritt werden die relativen Intensitäten der Produkt-Ionen miteinander verglichen. Die relative Skala der Intensität bezieht sich auf das intensivste MS-Signal. Die Toleranz der relativen Intensitäten darf $\pm 50\%$ nicht überschreiten.

Das in Kapitel 8.3.3.1 erwähnte Punktesystem zur Identifizierung liefert für ein LC-MS Verfahren mit MS²-Scans 4 Punkte (1 Precursor- und 2 Produktionen). Ein MS³-Verfahren liefert 5,5 Punkte (1 Precursor-, 1 Produkt, und 2 Produktionen des MS²-Scans) Zur Bestätigung von Stoffen der Gruppe A des Anhangs I der Richtlinie 96/23/EG werden mindestens 4 Identifizierungspunkte benötigt. Zur Bestätigung von Stoffen in Gruppe B von Anhang I der Richtlinie 96/23/EG werden mindestens 3 Identifizierungspunkte benötigt [298]. Der Einsatz eines HPLC-MS²-Verfahrens liefert somit genug Identifizierungspunkte zur sicheren Charakterisierung der zu bestimmenden Analyten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Selektivität durch Vergleich der Retentionszeiten, der MS-Spektren und der Produkt-Ionen-Intensitäten überprüft. In den Kapiteln 8.2.1-8.2.7 sind Tabellen dargestellt, die Informationen über Retentionszeit und den weiteren massenspektrometrischen Parametern geben. Am Beispiel der Bestimmung von Chlortetracyclin wird das Punktesystem erläutert.

Chlortetracyclin besitzt im positiven ESI-Modus ein Precursor-Ion mit dem m/z-Verhältnis 479,1 (vgl. Kap. 8.2.1). Der MS²-Scan liefert zwei Produkt-Ionen: 444,0 m/z und 462,0 m/z. Ein Punkt erhält man für das Precursor-Ion und jeweils 1,5 Punkte für die beiden Produktionen. Benötigt werden für die Identifizierung werden 3 Punkte der Gruppe B bzw. 4 Punkte für Stoffe der Gruppe A des Anhangs I der Richtlinie 96/23/EG. Das LC-MS Verfahren zum Nachweis von Chlortetracyclin in Honig liefert 4 Punkte. Die eindeutige Identifizierung ist hinreichend gesichert unter Beachtung europäischer Richtlinien.

8.3.4 Präzision

Die Präzision ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander oder anders formuliert: das Maß für die Streuung von Analysenergebnissen. Als Maß für die Präzision wird die Standardabweichung s , die relative Standardabweichung s_{rel} (identisch mit dem Variationskoeffizient V_k) und die Varianz s^2 verwendet.

Gleichung 19:	$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$	Standardabweichung
Gleichung 20:	$V_k = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$	Variationskoeffizient (relative Standardabweichung s_{rel})

x_i Einzelwert
 \bar{x} Mittelwert
 n Anzahl der Messungen

In der instrumentellen Analytik gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche Gründe für eine Streuung von Ergebnissen. Zum einen können das Analysengerät selbst und zum anderen die Methode verantwortlich für die Streuung sein. Man spricht im ersten Fall von der Messpräzision (Geräte- bzw. Systempräzision) und im anderen Fall von der Methodenpräzision. Darüber hinaus können weitere Präzisionen unter verschiedenen Wiederholbedingungen berechnet werden. Bei der Wiederholpräzision wird laut DIN 51848, ISO 5725 [312] mit demselben Verfahren an identischen Proben, in demselben Labor, durch denselben Mitarbeiter und mit derselben Geräteausrüstung in kurzen Zeitabständen durchgeführt, um voneinander unabhängige Analysenergebnisse zu erhalten. Bei der Vergleichspräzision werden wie bei der Wiederholpräzision die meisten Parameter beibehalten, nur die Mitarbeiter, das Labor und die Geräteausrüstung sind verschieden. Seltener wird von der Präzision von Serie zu Serie (intra day precision) berichtet. Diese Präzision wird ähnlich wie die Wiederholpräzision bestimmt mit der Ausnahme, dass verschiedene Serien der Analysen betrachtet werden. Die Tag-zu-Tag-Präzision (interday precision) beschreibt die Wiederholpräzision an aufeinander folgenden Tagen [297].

Zur Überprüfung der Präzision wurden die Mess- und Methodenpräzision der LC-MS-Methoden bestimmt. Die Messpräzision der LC-MS Bestimmung von Antibiotikarückständen in Honig wird durch zehnfache-Injektion von drei unterschiedlich konzentrierten Antibiotika-Standard-Lösungen bestimmt. Zur Bestimmung der Methodenpräzision von Realproben, also mit Matrixeinfluss, wurden zwei unbelastete Akazienhonige unterschiedlich mit Antibiotika dotiert und zehnfach mittels LC-MS untersucht. In Tab. 36 sind die Standardabweichungen, die relativen Standardabweichungen (Variationskoeffizient) für das Chlortetracyclin aufgelistet. Sowohl in Standardlösung als auch in dotierten Honigen sind die

Variationskoeffizienten kleiner als 5 %. Nur bei einer Konzentration von 5 µg/L beträgt der Variationskoeffizient 12,22 %. Die weiteren Daten sind dem Anhang 3.5 zu entnehmen.

Tab. 36: Vergleich der Messpräzision von Standard-Lösungen und dotierten Honigproben (n= 10); in Klammern sind die Konzentrationen bezogen auf einen dotierten Honig angegeben zur besseren Vergleichbarkeit untereinander

Konzentration CTC	Standardabweichung [Flächeneinheiten]	Variationskoeffizient [%]
5 µg/L	301,33	12,22
20 µg/L (10 µg/kg)	286,41	3,30
100 µg/L (50 µg/kg)	1023,20	2,35
10 µg/kg	837,87	3,46
50 µg/kg	908,92	1,77

8.3.5 Richtigkeit

Richtigkeit ist laut Definition das Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermitteltem Wert und einen als richtig angesehenen Wert. Man bezieht den ermittelten Wert (Analytkonzentration in der Probe) auf ein zertifiziertes Referenzmaterial (Antibiotikastandardlösung). Die Beziehung wird Wiederfindung genannt, die relative Angabe in Prozent Wiederfindungsrate. Die zertifizierten Referenzmaterialien müssen eine definierte Reinheit und Homogenität vorweisen, um in analytischen Methoden zur Überprüfung der Richtigkeit verwendet zu werden. Die Zertifizierung wird durch Institutionen wie das BAM (Bundesinstitut für Materialforschung und -prüfung) nach eingehender Strukturaufklärung und Überprüfen der Stabilität, Homogenität, Reinheitsgrad usw. vergeben. Eine Trennmethode wird als richtig klassifiziert, wenn diese selektiv ist und die Wiederfindung bestimmt worden ist. Im Falle der Bestimmung von Antibiotikarückständen in Honig wird aufgrund der komplexen Matrixzusammensetzung (vgl. Kap. 2) die Richtigkeit durch Wiederfindungsexperimente ermittelt.

Die Wiederfindung ist per Definition das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe.

Gleichung 21:

$$W = \frac{\bar{x}_f}{x_R} \cdot 100\%$$

W Wiederfindungsrate in %
 \bar{x}_f gemessener Mittelwert
 x_R richtiger Wert

Die Wiederfindung für Chlortetracyclin ist in Tab. 37 dargestellt. Der Mehrbefund über 100% kann einerseits durch Matrixeffekte (Matrixexpression) oder durch Umwandlung der Isomere/Epimere in das Chlortetracyclin erklärt werden. In Anhang 3.7 sind die Wiederfindungen für alle weiteren Analyten aufgelistet.

Tab. 37: Wiederfindung (n=3) für verschiedene Dotierungslevel von Chlortetracyclin in Honig

Dotierung [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Wiederfindung [%]
5	122
10	92
25	114
50	118
Mittelwert	111

8.3.6 Zusammenfassung der Validierungsergebnisse

Die Identifizierung und Quantifizierung von Chloramphenicol, Fluorchinolonen, Nitrofurantolonen, Tetracyclinen, Sulfonamiden, und Trimethoprim in Honig mit LC-MS wurde nach aktuellen und gültigen Validierungsrichtlinien validiert. Die Selektivität und Spezifität wurden im Rahmen der Methodenentwicklung untersucht und gegebenenfalls angepasst. In Kapitel 8.3 wurden anhand des Chlortetracyclins exemplarisch der Ablauf und die Ergebnisse der Validierung erläutert. Alle weiteren Daten zu den Analyten sind in Anhang 3 aufgeführt. In den Kapitel 8.2.1 bis 8.2.7 wurde die Leistungsfähigkeit der entwickelten LC-MS Methoden anhand der Validierungsdaten im Vergleich zu Literaturdaten bewertet. Nachfolgend sind diese Daten in zwei Tabellen zusammengefasst dargestellt.

In Tab. 38 sind Literaturdaten von Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG), Nachweisvermögen cc_{α} und Erfassungsgrenze cc_{β} , sowie die Wiederfindung für die Rückstandsanalytik der Antibiotika in Honig dargestellt. Im Vergleich dazu sind in Tab. 39 die Daten der entwickelten Methoden des Monitoringsystem zusammenfassend aufgeführt. Die Ausführliche Darstellung ist in Anhang 3 zu finden. Die Berechnung der Wiederfindung erfolgte über matrixkalibrierte Standardlösungen. Die Daten von cc_{α} und cc_{β} wurden über die relative Standardabweichung am MRL/MRPL-Wert berechnet. Zum Beispiel beträgt für Tetracyclin der interne MRPL-Wert $10 \mu\text{g}/\text{kg}$. Anhand von drei dotierten Honigen ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$) wurde die relative Standardabweichung bestimmt und anschließend das Nachweisvermögen bzw. die Erfassungsgrenze berechnet.

Tab. 38: Literaturangaben zu Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und Wiederfindung von Antibiotikarückständen in Honig (k.A.: keine Angaben)

Substanzgruppe	NWG/cc _α [µg/kg]	BG/cc _β [µg/kg]	Wiederfindung [%]	Literatur
Aminoglykoside	1,0-2,0/ 3,0-40,5	3,0-6,0/ 4,7-52,1	59-108	190,313,314, 315
Chloramphenicol	0,05-0,2/ 0,003-0,11	0,1-0,6/ 0,007-0,14	64-110	63,155,157, 159,160,162
Fluorchinolone	1,0-3,0	5,0	85-127	230
Makrolide & Lincosamide	0,01-3,0/ <3,0	1,5-9,0/ <5,0	84-108	194,196,202, 204,205,207
Nitrofurantolone	0,25/ 0,07-0,46	k.A. 0,12-0,56	83-112	39,316,317
Sulfonamide &Trimethoprim	0,5-25,0/ 3,0-40,5	2,0-5,0/ 4,7-52,1	35-115	130,131,132, 137,138,150 151,152,153 318
Tetracycline	0,05-49,3/ 20,0-21,0	25,0-100,0/ k.A.	55-107	71,95,96, 99,109,110, 117,123

Tab. 39: Nachweisvermögen, Erfassungsgrenze und Wiederfindung der entwickelten Methoden zum Nachweis von Antibiotikarückständen in Honig (n.b.: nicht bestimmt)

Substanzgruppe	NWG/cc _α µg/kg]	BG/cc _β [µg/kg]	Wiederfindung [%]
Aminoglykoside	n.b.	n.b.	n.b.
Chloramphenicol	2,3/ 0,13	7,4/ 0,22	89
Fluorchinolone	1,6-5,3/ 1,2-3,7	5,3-17,3/ 1,9-6,1	88-107
Makrolide & Lincosamide	n.b.	n.b.	n.b.
Nitrofurantolone	0,4-5,2/ 0,04-0,11	1,1-21,8/ 0,06-0,18	92-98
Sulfonamide & Trimethoprim	2,2-8,0/ 0,39-7,64	7,4-20,4/ 0,64-12,53	91-123
Tetracycline	1,6-6,1/ 0,17-3,04	5,3-19,9/ 0,20-4,99	18-125

8.4 Das Monitoring-System

Das Monitoring-System zum Nachweis von Antibiotikarückständen erfasst insgesamt 63 Substanzen. Die Mindestleistungsgrenzen (MRL, MRPL) konnten für 48 Rückstände mit den validierten LC-MS Methoden erreicht werden (vgl. Kap 8.3.6 und Anhang 3).

Die Wirkstoffklassen umfassen die Tetracycline, Sulfonamide, Nitrofurantolone, Fluorchinolone und die Einzelsubstanzen Chloramphenicol sowie Trimethoprim. Die LC-MS Methoden zum Nachweis von Aminoglykosiden und Makroliden sind zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Arbeit noch nicht routinefähig und werden daher nicht in das Monitoringsystem mit einbezogen. In Abb. 75 ist das System mit den einzelnen Komponenten abgebildet. Für die Analyse einer Honigprobe benötigt man je nach Analyten unterschiedlich viel Zeit für die Probenvorbereitung und LC-MS-Analyse. Die Probenvorbereitung für Sulfonamide, Trimethoprim und den Tetracyclinen kann gemeinsam durchgeführt werden, die Analyse erfolgt mit den jeweiligen massenspektrometrischen Methoden. Die Probenvorbereitung der Nitrofurantolone nimmt die meiste Zeit in Anspruch, da die Derivatisierung mit Nitrobenzaldehyd (über Nacht) 16 Stunden bei 37 °C benötigt. In Abb. 76 ist beispielhaft ein Fließschema zur Probenvorbereitung von Honigen zum Nachweis von Tetracyclinen aufgeführt. Alle weiteren SOP's (Standard Operation Procedure) befinden sich in Anhang 2.

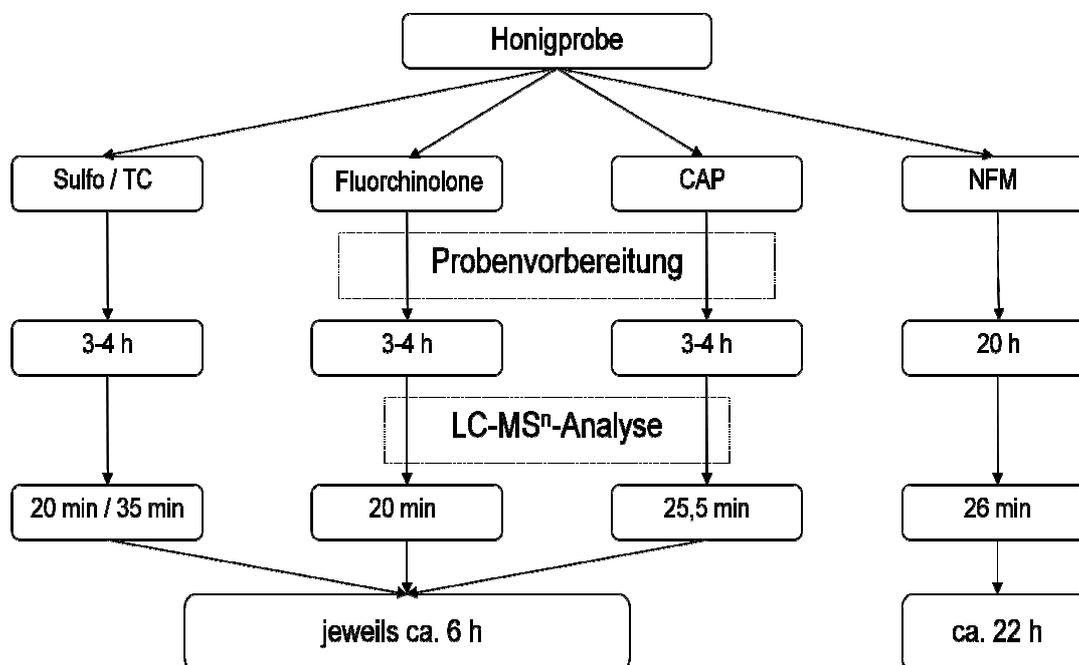


Abb. 75: Schematische Darstellung des Monitoringsystems zum Nachweis von Antibiotikarückständen in Honig (Sulfo: Sulfonamide, TC: Tetracycline, CAP: Chloramphenicol, NFM: Nitrofurantolone)

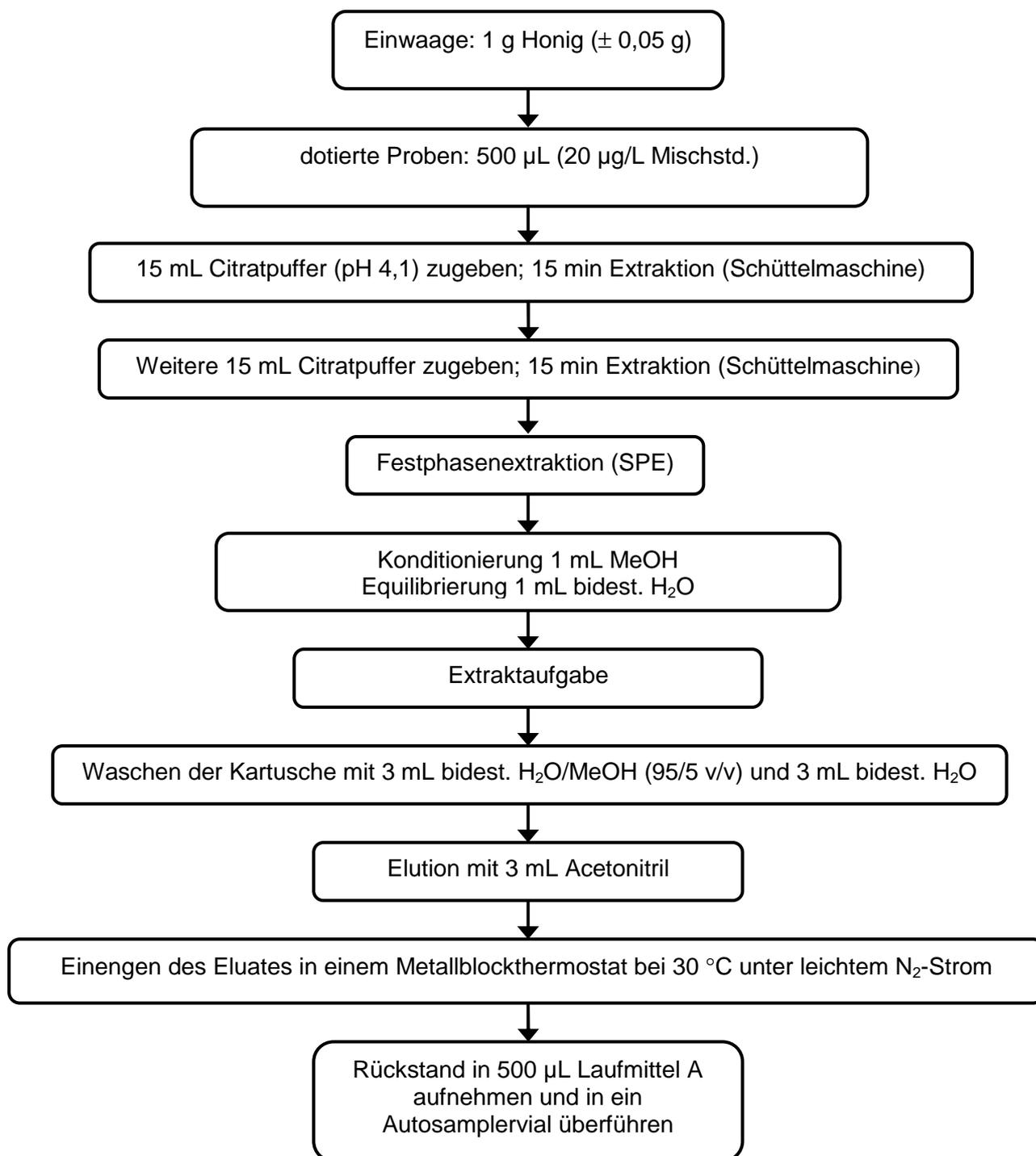


Abb. 76: Fließschema der Probenvorbereitung für Tetracycline

8.5 Anwendung des Monitoring-Systems in einer Marktstudie

Das entwickelte „Monitoring-System“ wurde nach Abschluss der Validierung durch Analyse von Honigen verschiedener Herkunft und Tracht auf Routinetauglichkeit getestet. Es konnten keine Rückstände in den untersuchten 70 Proben festgestellt werden. In Rohhonigen hingegen wurden Antibiotika aus verschiedenen Substanzklassen nachgewiesen. Eine Übersicht mit den untersuchten Honigen ist in Tabelle 40 aufgeführt. Die Honige sind fertige Honigmischungen, die im Handel erhältlich sind. Einige sind reine Sorten-Honige mit bekannter Herkunft wie zum Beispiel Wildblütenhonig aus Chile oder Orangenblütenhonig aus Spanien. In den Abbildungen 77-82 sind die MS-Chromatogramme der mit Antibiotikarückständen belasteten Honige dargestellt. Es handelte sich bei den Rückständen um Sulfonamide, Trimethoprim, Chloramphenicol und Tetracycline. Die Identifizierung der Analyten erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten und MS²-Spektren. Die Quantifizierung wurde anhand von matrixkalibrierten Referenzstandards vorgenommen.

Tab. 40: Untersuchte Honige im Rahmen einer Marktstudie (N=70)

Sorte	Anzahl
Akazie	8
Blüte	12
Cremiger Honig	8
Eukalyptus	1
Gebirgsblüte	5
Kirschblüte	1
Klee	1
Linde	4
Orangenblüte	3
Pinie	1
Raps	3
Sonnenblume	2
Wald	13
Sonstige	8
Summe	70

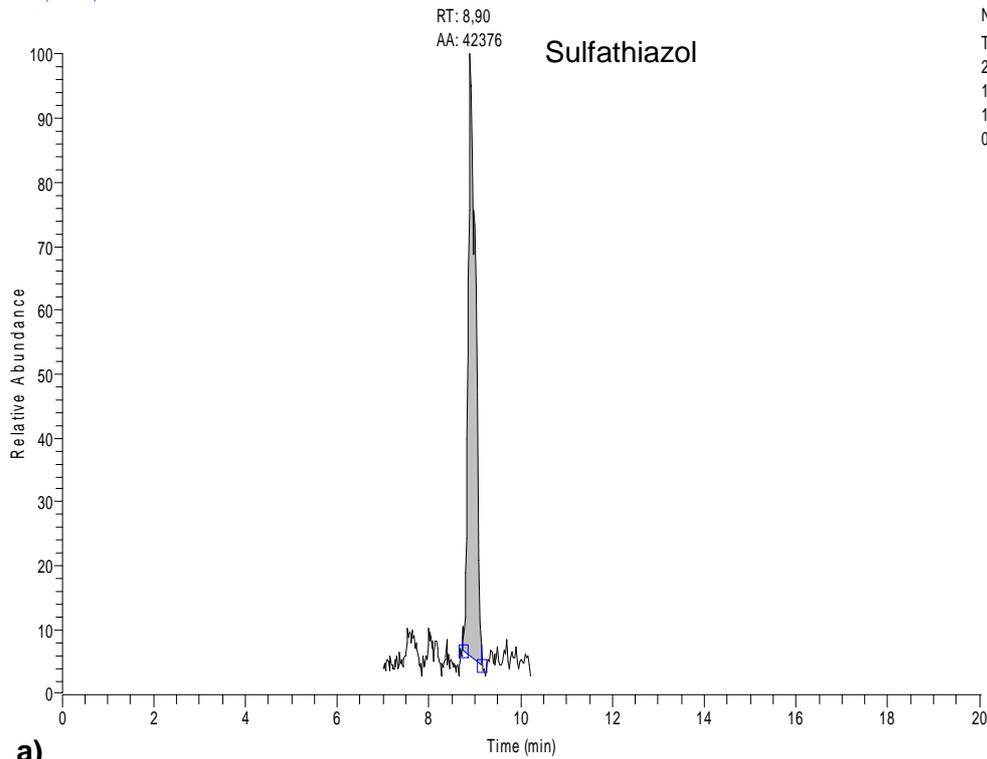
8 Ergebnisse und Diskussion

C:\DatenL...\Ok06\181006\051006-30min-1

18.10.2006 09:31:49

051006-30min-1

RT: 0,00 - 20,02



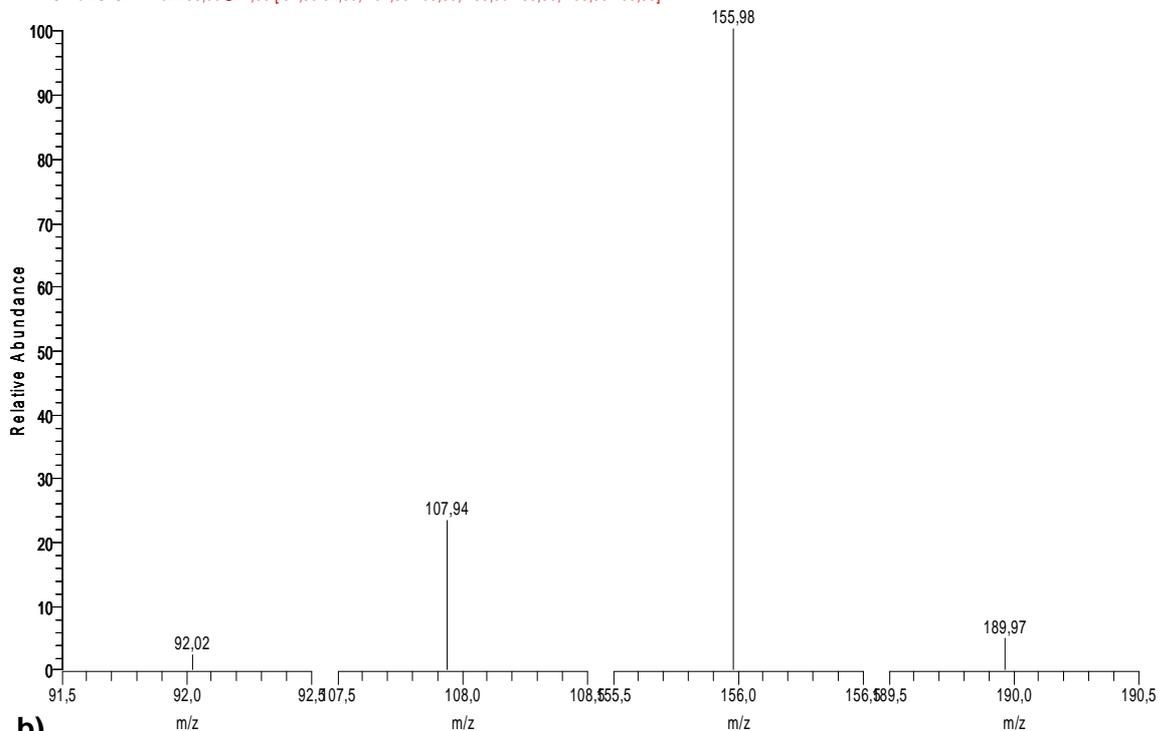
NL: 4,03E3

TIC F: ITMS + c ESI SRM ms2
256,00@21,00 [91,50-92,50;
107,50-108,50; 155,50-156,50;
189,50-190,50] MS ICIS
051006-30min-1

a)

051006-30min-1 #2084 RT: 8,93 AV: 1 NL: 2,95E3

F: ITMS + c ESI SRM ms2 256,00@21,00 [91,50-92,50; 107,50-108,50; 155,50-156,50; 189,50-190,50]



b)

Abb. 77: MS-Chromatogramm **a)** und Massenspektrum (SRM-Modus) **b)** eines mit Sulfathiazol belasteten Rohhonigs ($50 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 2 \mu\text{g}/\text{kg}$); Eingangsnr.:116137; Identifizierungsdaten vgl. Tab. 21 bzw. Abb. 48

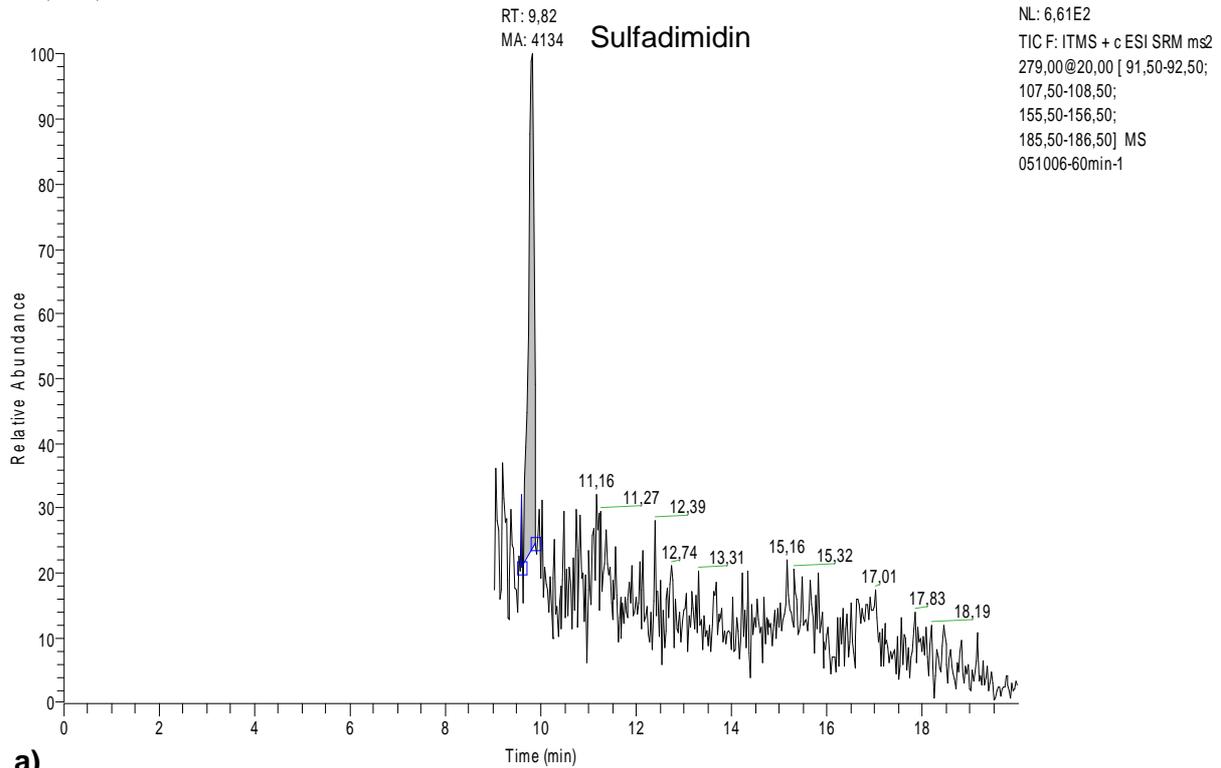
8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...\Ok06\181006\051006-60min-1

18.10.2006 10:33:52

051006-60min-1

RT: 0,00 - 20,00



051006-60min-1 #2318 RT: 9,82 AV: 1 NL: 5,18E2

F: ITMS + c ESI SRM ms2 279,00@20,00 [91,50-92,50; 107,50-108,50; 155,50-156,50; 185,50-186,50]

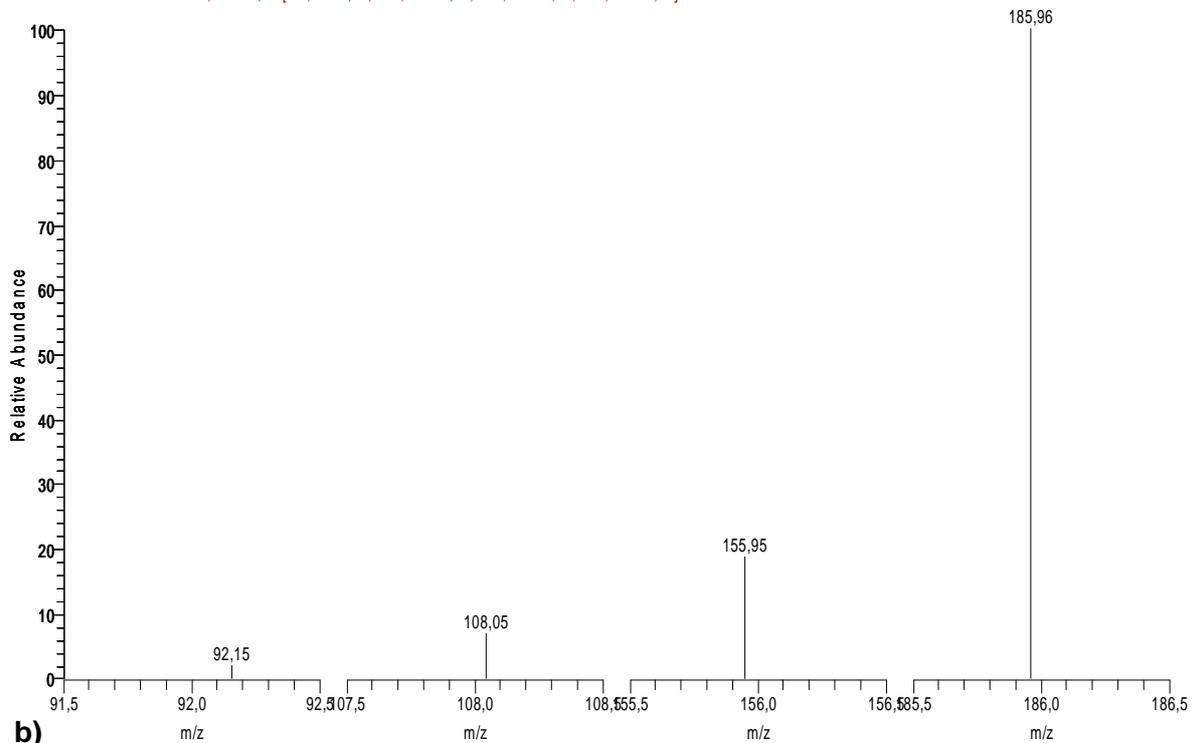


Abb. 78: MS-Chromatogramm **a)** und Massenspektrum (SRM-Modus) **b)** eines mit Sulfadimidin belasteten Rohhonigs (qualitativ nachgewiesen, ca. 0,5 µg/kg ± 0,03 µg/kg); Eingangsnr.116137; Identifizierungsdaten vgl. Tab. 21 bzw. Abb. 48

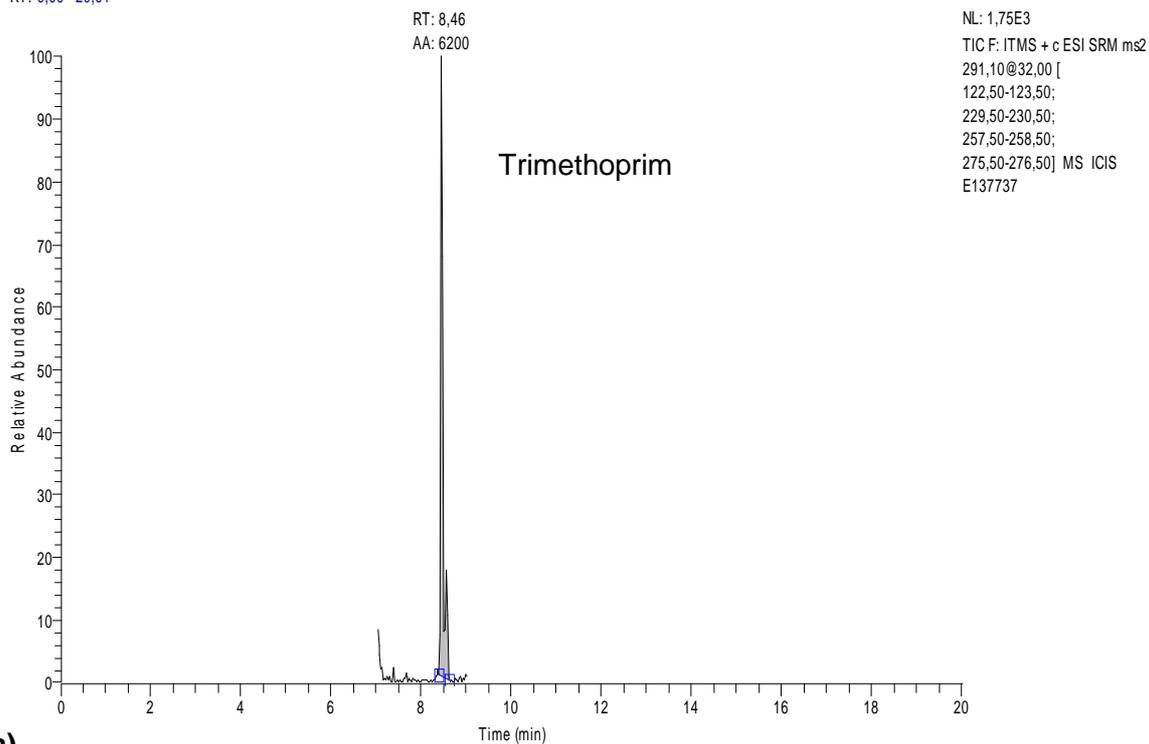
8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...2007\Juli07\100707E137737

11.07.2007 11:44:23

E137737

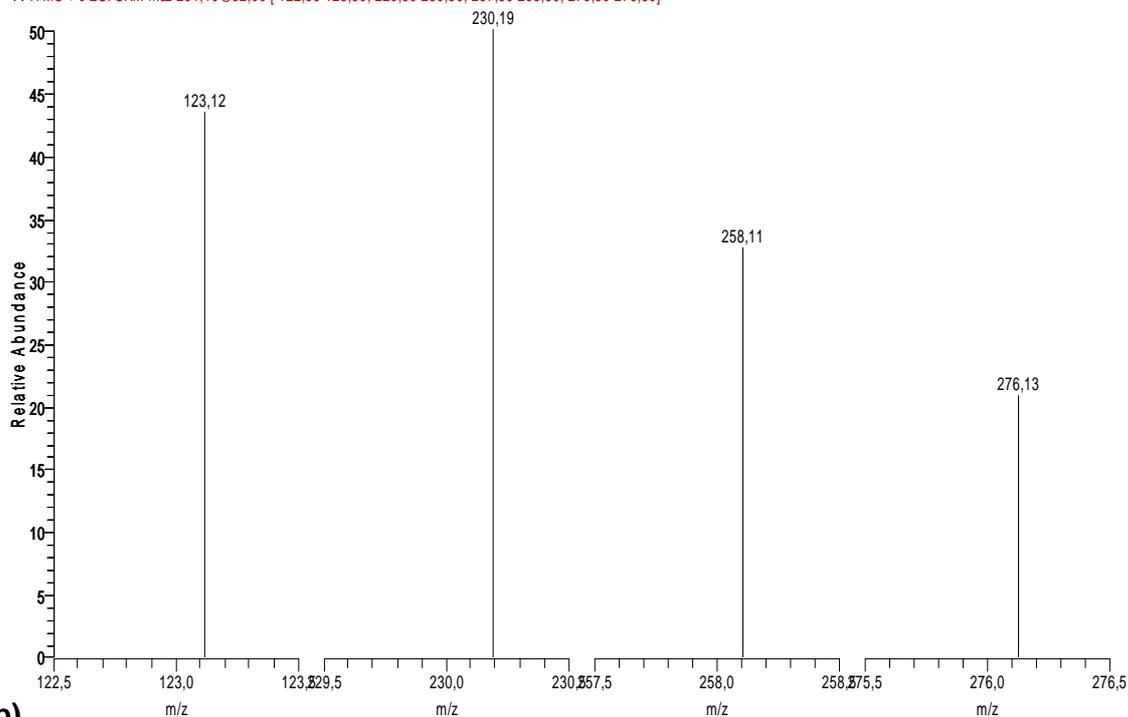
RT: 0,00 - 20,01



a)

E137737 #1863 RT: 8,49 AV: 1 NL: 6,06E2

F: ITMS + c ESI SRM ms2 291,10@32,00 [122,50-123,50; 229,50-230,50; 257,50-258,50; 275,50-276,50]



b)

Abb. 79: MS-Chromatogramm **a)** und Massenspektrum (SRM-Modus) **b)** eines mit Trimethoprim belasteten Rohhonigs (12 µg/kg ± 1,2 µg/kg); Eingangs.: 137737; Identifizierungsdaten vgl. Tab. 22 bzw. Abb. 51

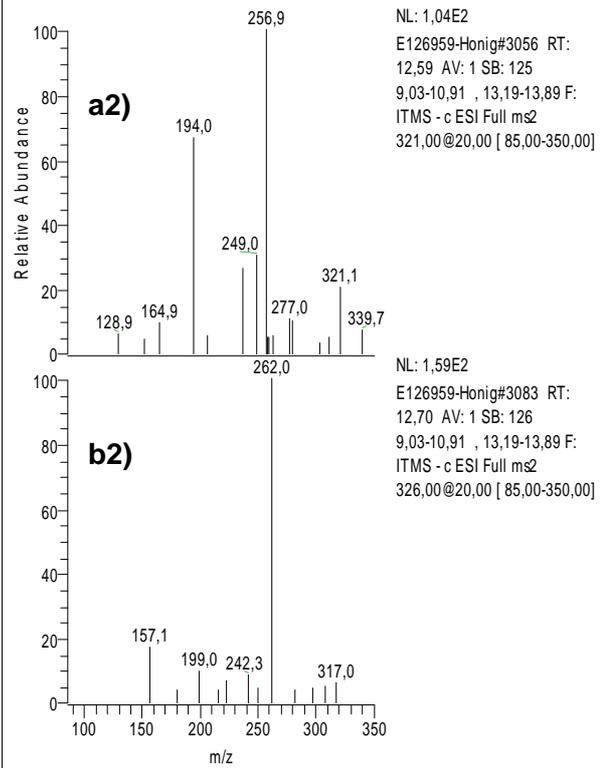
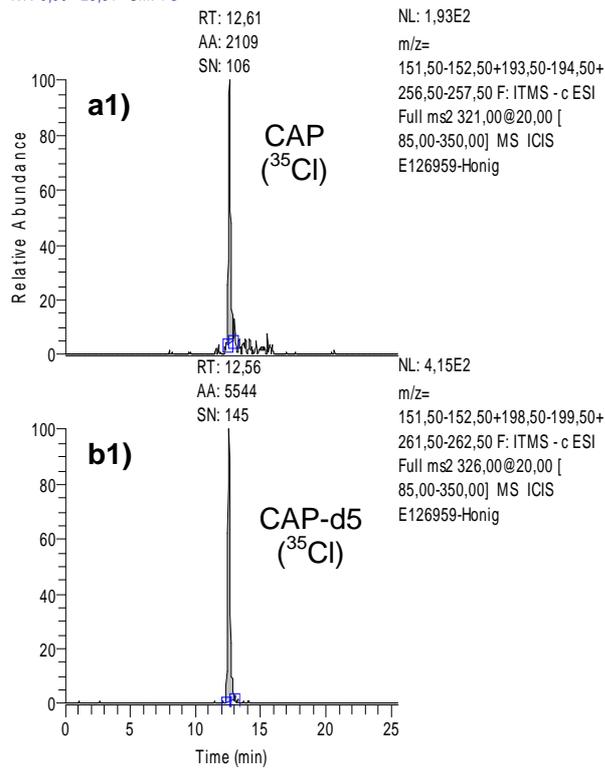
8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten...\Feb07\020207\E126959-Honig

02.02.2007 18:08:06

E126959-Honig

RT: 0,00 - 25,51 SM: 7G



RT: 0,00 - 25,51

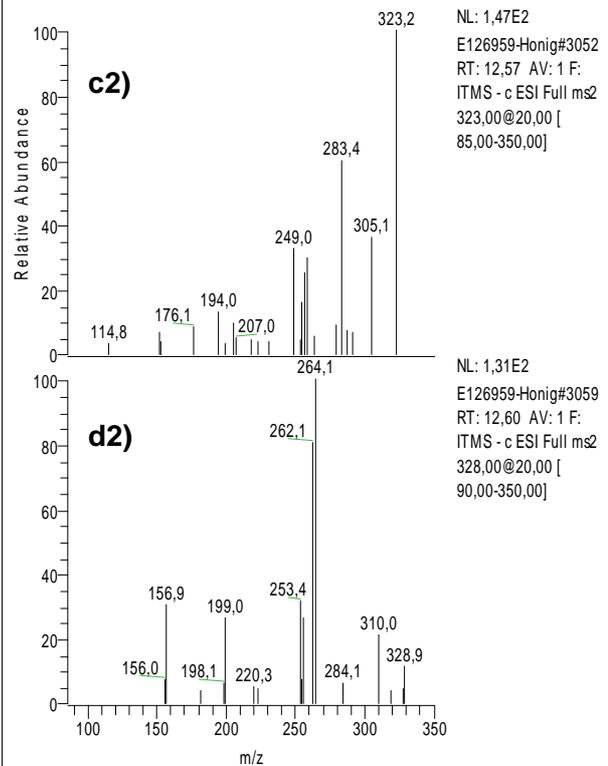
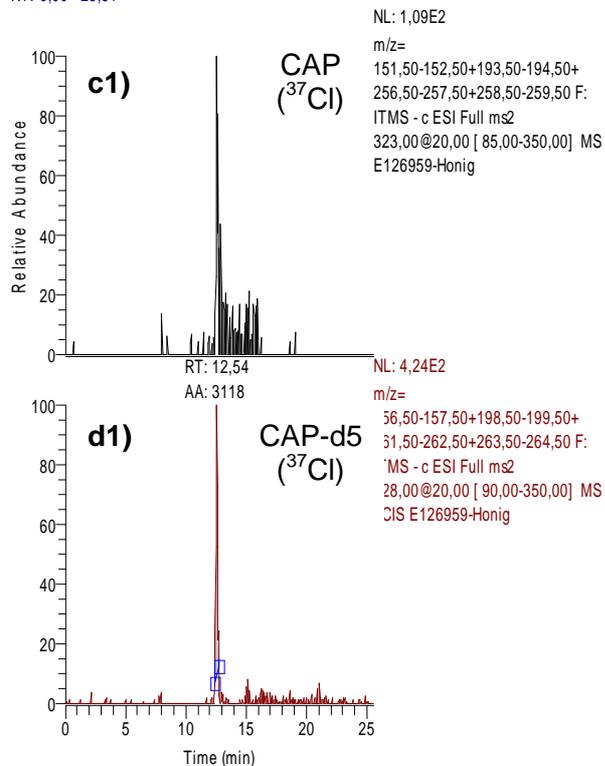


Abb. 80: MS-Chromatogramme **a1) - d1)** und Massenspektren (MS²-Fullscan-Modus) **a2) - d2)** eines mit Chloramphenicol belasteten Rohhonigs (qualitativ nachgewiesen; Eingangs. 126959, 05.02.07); Identifizierungsdaten vgl. Tab. 24 bzw. Abb. 53

8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...Jan07\240107\T6-06-86-vB

24.01.2007 13:37:44

T6-06-86-vB

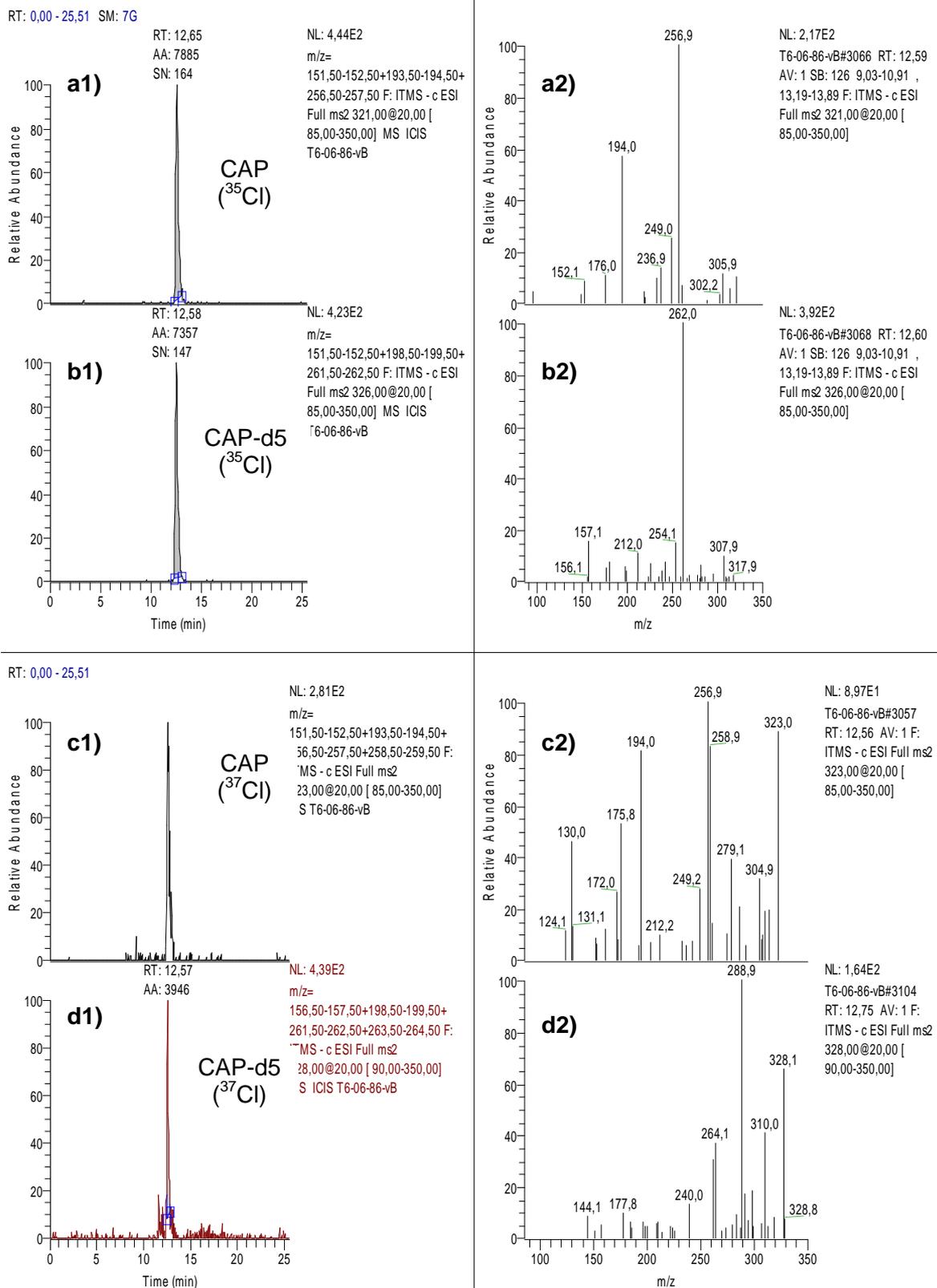


Abb. 81: MS-Chromatogramme **a1) - d1)** und Massenspektren (MS²-Fullscan-Modus) **a2) - d2)** eines mit Chloramphenicol belasteten Rohhonigs (qualitativ nachgewiesen; T6-06-86-vB); Identifizierungsdaten vgl. Tab. 24 bzw. Abb. 53

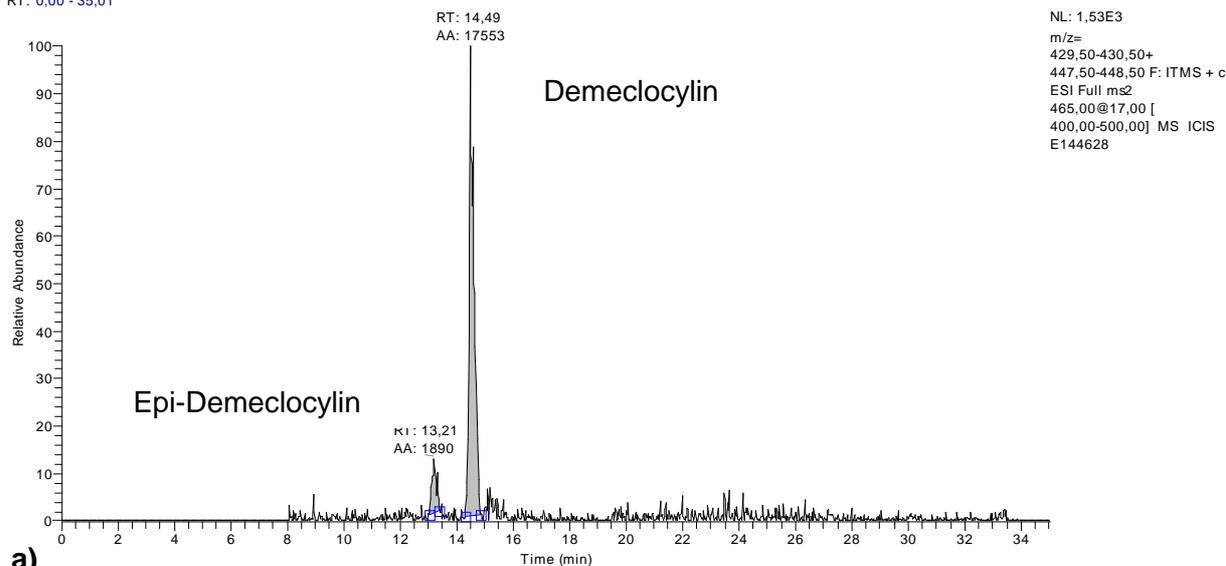
8 Ergebnisse und Diskussion

C:\Daten\...\2007\Dez07\11207\E144628

11.12.2007 22:08:38

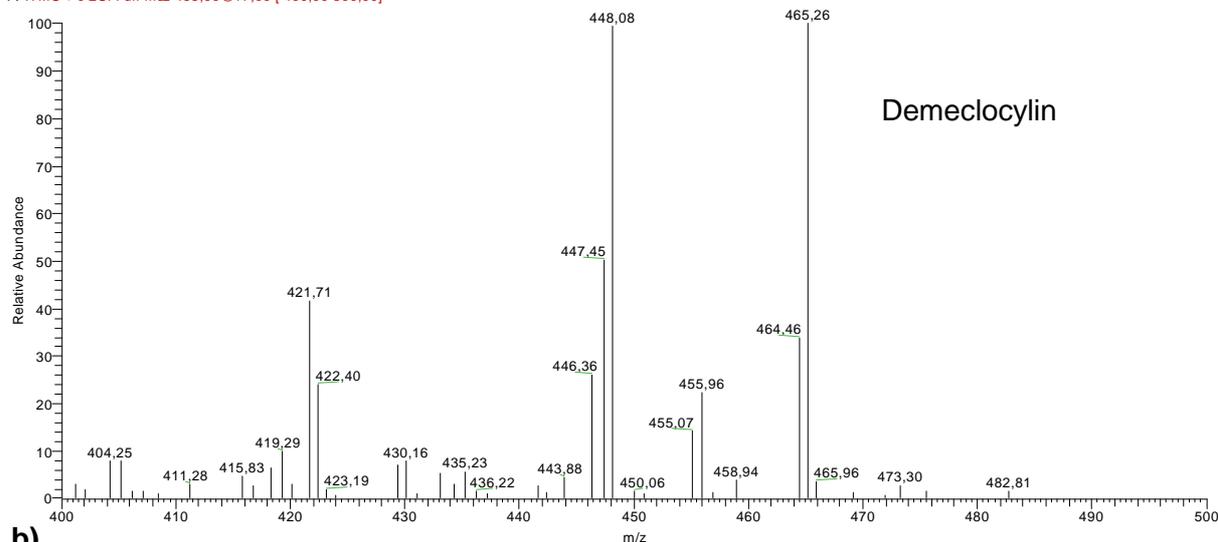
E144628

RT: 0,00 - 35,01



a)

E144628 #3292 RT: 14,57 AV: 1 NL: 9,52E2
F: ITMS + c ESI Full ms2 465,00@17,00 [400,00-500,00]



b)

Abb. 82: MS-Chromatogramm **a)** und Massenspektrum (MS2-Fullscan-Modus) **b)** eines mit Epi-Demecloxylin und Demecloxylin belasteten Rohhonigs (3 µg/kg ± 0,3 µg/kg); Eingangs.: 144628; Identifizierungsdaten vgl. Tab. 19 bzw. Abb. 43

Die wenigen Positivbefunde entsprechen dem rückläufigen Trend von Antibiotikarückständen in Honig, den das BfR in Rahmen des durchgeführten Rückstandskontrollplanes (vgl. Kap. 1) festgestellt hat [13,14]. Durch Entwicklung immer empfindlicherer Analysensysteme und stetes Erweitern des Analytenspektrums konnte die Aufklärungsquote kontaminierter Honige erheblich gesteigert werden. Dies hat vermutlich einen nicht zu unterschätzenden Effekt bei den Herstellern auf die Anwendung von Antibiotika in der Imkerei. Wird ein Rohhonig positiv auf Antibiotika getestet, muss das Produkt entsorgt werden und die Kosten trägt der Hersteller. Eine höhere Aufklärungsquote sorgt für ein Umdenken der Produzenten und führt zu einem geringeren Einsatz von Veterinärpharmaka. Durch Inkrafttreten immer niedriger Grenzwerte (MRL, MRPL) seitens der staatlichen Stellen, wird dieser Trend weiter forciert.

Die Anwendung von Antibiotika als Leistungsförderer und zur prophylaktischen Anwendung in der Veterinärmedizin wird somit unrentabel.

Die Analysendaten der Marktstudie wurden neben der Bestimmung von Antibiotikarückständen in Honig chemometrisch ausgewertet und erlauben eine Klassifizierung der Honige nach Herkunft und Tracht. Das folgende Kapitel erläutert die Ergebnisse der statistischen Auswertung.

8.6 Chemometrie / Herkunftsbestimmung („Profiling“)

Unter Chemometrie versteht man im Allgemeinen die Datenauswertung nach erfolgter Messung physikochemischer Eigenschaften einer Messprobe [283,284]. Die Datenauswertung kann eine Umwandlung/Umrechnung des Messsignals in eine andere, dem Benutzer geeignete Form beinhalten, zum Beispiel eine Normierung der Messwerte, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. In den letzten Jahrzehnten sind spezielle chemometrische Software-Anwendungen entwickelt worden, um die immer größer werdende Datenmengen neuerer Messgeräte (z. B.: Massenspektrometer) verarbeiten zu können. Die Auswertungen sind besonders auf das Klassifizieren von Messergebnissen bzw. -proben, Vorhersagen bestimmter Muster und Komprimierung der Datenmengen ausgelegt. Anwendungen dieser Chemometrie-Software Lösungen sind zum Beispiel Sortenerkennung von Wein [285], Bestimmung von Antibiotika [286,287] oder auch die Beschreibung von komplexen chemischen Wechselwirkungen [288,289]. Im Bezug auf die Honiganalytik werden vornehmlich Sorten- und Herkunftsbestimmungen durchgeführt [290-296]. Im Zuge der Globalisierung wird es für Importeure immer wichtiger zu kontrollieren, ob Waren wie Wein, Kaffee, Honig usw. tatsächlich aus der vom Exporteur genannten Region stammen. Mitunter können erhebliche Preisdifferenzen zwischen vergleichbarer Ware aus unterschiedlichen Regionen resultieren.

Bei der Wein- und Kaffeeanalytik wird das Aromaprofil bestimmt und chemometrisch ausgewertet [283]. Dieses Profil ist - ähnlich wie ein Fingerabdruck - charakteristisch für die jeweilige Sorte und das Herkunftsgebiet. In der Honiganalytik wird traditionell zur Sorten- und Herkunftsbestimmung die Pollenanalyse zur Bestimmung herangezogen. Die Chemometrische Auswertung kann bei einer hinreichend großen Datenmenge die Pollenanalyse ergänzen und somit die Zuordnung der Klassifizierung verbessern.

Durch Auswahl definierter Massenpeaks (vgl. Tab. 41) wurde eine chemometrische Auswertung aus den MS-Daten des Monitoringsystems realisiert. Die ausgewählten m/z-Verhältnisse kommen in den Spektren aller analysierten Honige unterschiedlicher Sorte und Herkunft in unterschiedlicher Signalintensität vor. Die Flächen der jeweiligen MS-Signale wurden bestimmt und mit der Software „Pirouette“ chemometrisch ausgewertet.

Tab. 41: Massenpeaks zur Klassifizierung der Honigproben (ESI-Full-Scan 50-1000 m/z); Signalintensität: 10^5 - 10^7 , vgl. Abb. 80

m/z	t _R [min]
290	3,8
490	5,3
309	5,4
146	7,9
217	8,6
639	10,8
707	11,1

Die chemometrische Auswertung wird nach folgendem Ablauf durchgeführt [292]:

- Sichten der Daten
- Normalisieren der Daten nach Bedarf
- Aufbau eines Modells
- Verifizierung des Modells
- Modell verwenden, um Voraussagen treffen zu können (Klassifizierung)
- Validierung der vorausgesagten Ergebnisse

Auf eine detaillierte Beschreibung der mathematischen Grundlagen der Chemometrie wird an dieser Stelle verzichtet. Eine ausführliche Beschreibung ist unter anderem in „Chemometrics: A practical guide“ von Beebe et al. [284] zu finden. Für die Herkunftsbestimmung der Honige wurde die so genannte PCA (Principal Component Analysis) eingesetzt. Sie ist ein leistungsstarkes Werkzeug in der explorativen Analyse, um komplexe Zusammenhänge zu visualisieren. Die Ausgangsdaten (Rohdaten der LC-MS-Rückstandsuntersuchung) werden durch Linearkombinationen auf nur noch drei Dimensionen beschränkt.

In Abb. 83 sind die MS-Chromatogramme eines Gebirgsblütenhonigs dargestellt. Als Grundlage für die Auswertung dienten die MS-Daten von 21 Honigen unterschiedlicher Herkunft und Tracht, die im Rahmen der Marktstudie auf Antibiotikaspurengehalte hin analysiert wurden.

8 Ergebnisse und Diskussion

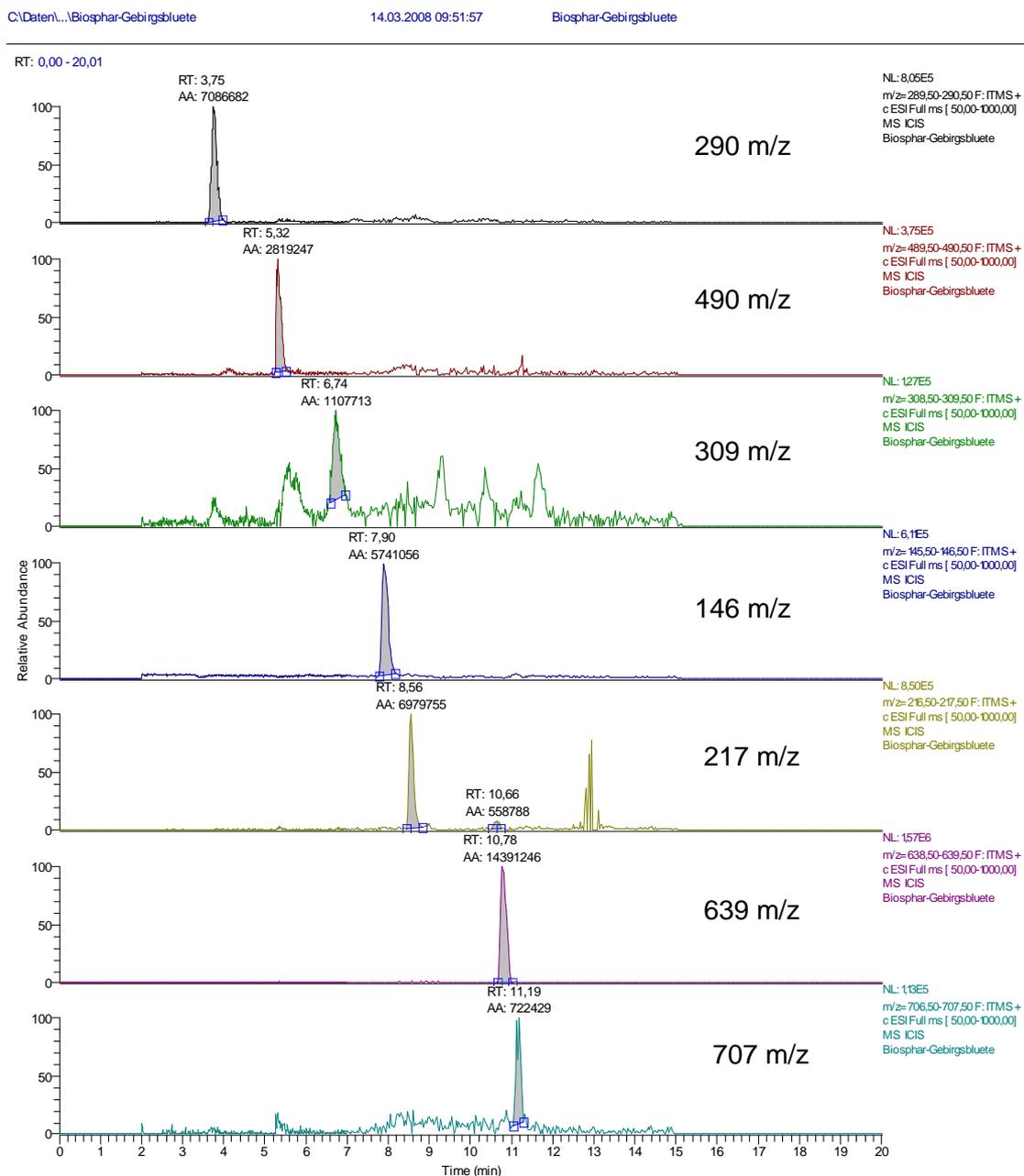


Abb. 83: MS-Chromatogramme (MS-Fullscan-Modus) eines Gebirgsblütenhonigs; m/z-Verhältnisse vgl. Tab. 34 ;LTQ, 20 min Gradient vgl. Kap. 8.2.2 Tab. 20

In Abb. 84 ist eine dreidimensionale Grafik dargestellt, die durch eine PCA (Principal Component Analysis) generiert wurde. Die MS-Signale wurden auf 3 Faktoren in Abhängigkeit von der Varianz durch Linearkombinationen reduziert.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Honig als naturbelassenes Produkt unterliegt strengen Qualitätsauflagen, die durch zahlreiche rechtliche Verordnungen geregelt sind. Dazu zählt unter anderem, dass Honig frei von Antibiotikarückständen sein muss. In der EU ist der Einsatz von Antibiotika in der Imkerei verboten. Um die europäische Nachfrage zu decken, wird ein großer Anteil des Honigs aus Ländern importiert, in denen Antibiotika zum Einsatz kommen. Antibiotikarückstände in Honig und allgemein in Lebensmitteln können u.a. allergische Reaktionen nach dem Verzehr auslösen. Zudem wird durch das ubiquitäre Vorliegen von Antibiotikarückständen in der Umwelt der Selektionsdruck auf pathogene resistente Bakterienstämme erhöht und dadurch die Resistenzbildung forciert. Aus humanmedizinischer Sicht und im Sinne des Verbraucherschutzes ist es also eminent wichtig, Antibiotikarückstände in Lebensmitteln bzw. Honig und Honigprodukten nachzuweisen, um diese ggf. aus dem Verkehr ziehen zu können.

Nach heutigem Stand der Analytik sind lediglich zwei LC-MS Methoden [91,93] bekannt, mit denen ein breiteres Spektrum von Antibiotikarückständen in Honig nachweisbar ist. Mit den anderen publizierten Methoden wird jeweils nur eine bestimmte Substanzklasse der Antibiotika erfasst und relevante Hauptmetabolite gar nicht. Die Notwendigkeit, Analysemethoden zum simultanen Nachweis einer größtmöglichen Anzahl antibiotisch wirksamer Stoffe in Honig zu entwickeln, ist offenkundig. Diese sollten so empfindlich sein, dass die gesetzlichen Grenzwerte (MRL, MRPL) und Labor-interne Mindestleistungskriterien erfüllt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, ein routinetaugliches Monitoringsystem zu entwickeln, das die angeführten Anforderungen erfüllt. Diese Arbeit beschreibt daher die Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitung und die Identifizierung und Quantifizierung der Analyte mit LC-MS-Verfahren. Die Analyten gehören zu den Antibiotika-Substanzklassen der Aminoglykoside, Tetracycline, Sulfonamide, Makrolide, Fluorchinolone, Nitrofurane. Mit den Einzelwirkstoffen Trimethoprim und Chloramphenicol waren somit insgesamt 63 Substanzen in das Monitoringsystem zu integrieren. Die Methodik der Entwicklungsarbeiten umfasste die Optimierung der MS-Messparameter (Tunen der Substanzen im MS-Detektor), Entwickeln und Anpassen der chromatographischen Trennbedingungen sowie Anpassung der Festphasen-Extraktionsbedingungen an die physiko-chemischen Eigenschaften der Analyten. Die manuelle Festphasenextraktion sollte durch Implementierung eines Online-SPE Moduls automatisiert werden, um bessere Reproduzierbarkeiten und eine Kostenreduktion zu erreichen. Die Routinetauglichkeit waren anhand einer Marktstudie von Fertigwarenmustern aus regionalen Supermärkten zu überprüfen. Die gewonnenen Daten

waren außerdem chemometrisch auszuwerten, um geographische und botanische Klassifizierungen von Honigen vornehmen zu können.

Zunächst wurde für die Sulfonamide und Tetracycline eine Online-Festphasenextraktions-Methode entwickelt. Grundlegende Arbeiten zur Implementierung der Online-SPE-Technik in das LCQ-Ionenfallen-System, die eine Basis für weitere Entwicklungsarbeiten darstellte, wurden erfolgreich durchgeführt. Die damit erreichten Wiederfindungen sind jedoch im Vergleich zu Literaturdaten etwas geringer, die Reproduzierbarkeit mit 3,2 % (Sulfadimidin) bis 7,4 % (Sulfadimethoxin) aber auf ähnlichem Niveau.

Die LTQ-Ionenfallen-Einzelmethode wurden zu einem Monitoringsystem vereint und die entwickelten Methoden nach europäischen Richtlinien validiert. Die Wiederfindung, das Nachweisvermögen und die Erfassungsgrenze für Komponenten der Fluorchinolone, Tetracycline, Sulfonamide, Nitrofurantolone und der Einzelsubstanzen Chloramphenicol und Trimethoprim liegen für fast alle Analyten in den geforderten Bereichen der MRL/MRPL-Werte. Die Wiederfindungen betragen für Chloramphenicol 89 %, für die Fluorchinolone 88 % bis 107%, für die Nitrofurantolone 92 % bis 98 % und für die Sulfonamide 91 % bis 123 %. Rückstände von Trimethoprim werden zu 97 % wiedergefunden. Einige Tetracycline weisen auffällig niedrige Wiederfindungen auf, wie z. B. das α -Apo- (18 %) und das β -Apo-Oxytetracyclin (28 %), für andere Tetracycline wurden Werte zwischen 37 % und 125 % erreicht. Bestimmungsgrenzen (BG) bzw. Erfassungsgrenzen (cc_{β}) sind - bis auf Sulfamethoxazol, Sulfamethizol und Sparfloxacin - unterhalb der jeweiligen geforderten Mindestleistungskriterien. Die ermittelten Variationskoeffizienten liegen für alle Analyten unterhalb von 15 %, bis auf Chloramphenicol (35 %) und Semicarbazid (72 %).

Im Vergleich zu den bisher veröffentlichten Methoden zur Rückstandsuntersuchung von Honig deckt das in dieser Arbeit entwickelte Monitoringsystem ein größeres Spektrum antibiotisch aktiver Stoffe ab. Insbesondere der Nachweis von Tetracyclinen inklusive Wirkstoff-Epimeren, Isomeren und weiterer Metabolite bzw. Abbau- und Umwandlungsprodukte bietet die umfangreichste Methodik im Vergleich zu literaturbekannten LC-MS-Methoden. Dabei werden im Gegensatz zu anderen Multikomponentenmethoden (z.B. von Lopez et al. [93] und Hammel et al. [91]) europäische Leistungskriterien erfüllt. In einigen Fällen ist die Empfindlichkeit des entwickelten Monitoringsystems sogar höher. Im Vergleich zu optimierten Einzelmethode sind Wiederfindungen, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und Erfassungsgrenzen des Systems auf einem gleich hohen analytischen Leistungsniveau. Damit wurde die zentrale Zielsetzung dieser Arbeit erreicht, d.h. die Entwicklung eines leistungsstarken, routinefähigen Monitoringsystems zum Nachweis von Antibiotikarückständen in Honig.

Innerhalb einer Marktstudie (70 Honigproben) wurden mit den entwickelten Methoden keine Rückstände von Antibiotika in Honig nachgewiesen, bei der Kontrolle von Rohhonigen jedoch Sulfonamide ($50 \pm 2 \mu\text{g/kg}$ Sulfathiazol, $0,5 \pm 0,03 \mu\text{g/kg}$ Sulfadimidin), Tetracycline ($3 \pm 0,3 \mu\text{g/kg}$ Demeclocyclin) und in zwei Proben Chloramphenicol. Die gewonnenen Daten der Marktstudie flossen in eine chemometrische Auswertung ein, um Aussagen über Herkunft und Sorte zu machen. Die Aussagekraft des erstellten PCA (Principal Component Analysis, Hauptkomponentenanalyse)-Modells ist schon bei geringer Probenanzahl relativ genau. So konnten Sortenhonige (Akazie, Gebirgsblüte, Raps, Wald) anhand der LC-MS Analysendaten in Gruppen eingeordnet werden. Die chemometrische Auswertung der Rückstandsmessdaten kann somit – in Ergänzung zur Pollenanalyse - eine genauere Klassifizierung der Honige ermöglichen.

Die Positivbefunde an Antibiotika zeigen, dass eine Kontrolle notwendig ist, um im Sinne des Verbraucherschutzes belastete Ware aus dem Verkehr ziehen zu können. Der allgemein rückläufige Trend von Positivbefunden bei Rückstandskontrollen belegt aber, dass zurzeit das Risiko einer Aufnahme von Antibiotikarückständen über den Honig für den Verbraucher als relativ gering einzustufen ist – vermutlich ein Erfolg der in den letzten verbesserten spurenanalytischen Nachweismethoden! Dennoch sollte zukünftig das Monitoringprogramm ständig aktualisiert werden, um weitere, bislang noch nicht berücksichtigten (illegal eingesetzten) Antibiotika-Wirkstoffe und Metabolite mit hoher Empfindlichkeit zu detektieren. Nur so ist zu gewährleisten, dass Honig und Honigprodukte keine relevanten Eintragsquellen für antibiotisch wirksame Stoffe in die Nahrungsmittelkette darstellen und damit langfristig auch keine Risikofaktoren bei der Bildung von Antibiotikaresistenzen.

10 Experimenteller Teil

10.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die im Rahmen der Analysen und der verschiedenen Probenvorbereitungen eingesetzten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind alphabetisch aufgeführt:

Aceton (p.a.; Merck/Darmstadt)
Acetonitril (HPLC-Grade; Merck/Darmstadt)
Acetonitril (Chromasolv; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Ameisensäure (LC-MS-Grade; Sigma-Aldrich/Steinheim)
1-Aminohydantoin Hydrochlorid (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Ammoniumacetat (p.a.; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Ammoniumformiat 99,995% (Sigma-Aldrich/Steinheim)
AMOZ (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
AMOZ-d5 (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Anhydrochlortetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics/Geel (Belgien))
Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics/Geel (Belgien))
AOZ (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
AOZ-d4 (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
 α -Apo-Oxytetracyclin (Acros Organics/Geel (Belgien))
 β -Apo-Oxytetracyclin (Acros Organics/Geel (Belgien))
Bakerbond Octadecyl (C18) 40 μ m Prep LC Packing
Chloramphenicol (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
(+/-)-Chloramphenicol-d5 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc./Andover (USA))
Chlortetracyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Clarithromycin CRS (European Pharmacopeia/Strasbourg (France))
Clindamycin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Citronensäure-Monohydrat (p.a.; Merck/Darmstadt)
Danofloxacin (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Demeclocyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Difloxacin Hydrochlorid (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Dihydrostreptomycin Sulfat CRS (European Pharmacopeia/Strasbourg (France))
Dimethylsulfoxid (HPLC-grade; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (p.a.; Merck/Darmstadt)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (p.a.; Merck/Darmstadt)

Doxycyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich/Steinheim)
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz Dihydrat (p.a.; Merck/Darmstadt)
Enoxacin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Enrofloxacin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Erythromycin A-Dihydrat (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Essigsäure 100 % (p.a.; Merck/Darmstadt)
Ethylacetat (Lichrosolv; Merck/Darmstadt)
4-Epianhydrochlortetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics/Geel (Belgien))
4-Epianhydrotetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics/Geel (Belgien))
4-Epichlortetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics/Geel (Belgien))
4-Epidemeclocyclin Hydrochlorid CRS (European Pharmacopeia/Strasbourg (France))
6-Epidoxycyclin Hydrochlorid CRS (European Pharmacopeia/Strasbourg (France))
4-Epioxytetracyclin (Acros Organics/Geel (Belgien))
4-Epitetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics/Geel (Belgien))

Festphasenkartuschen:

Bakerbond C18 (Mallinckrodt Baker Germany/Griesheim)
Bond Elut LRC C18 (Varian, Inc./ Middelburg (Netherland))
Bond Elut LRC SCX (Varian, Inc./ Middelburg (Netherland))
Oasis HLB 6cc (Waters GmbH/Eschborn)
Oasis HLB 3cc (Waters GmbH/Eschborn)

Fleroxacin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Flumequin (Pestanal; Sigma-Aldrich/Steinheim)

HPLC-Trennsäulen:

Säulen:

Hypersil Gold 3 µm 100 x 2,1 mm (ThermoFisher Scientific/Dreeich)
Hypersil BDS 5 µm 125 x 2, 1mm (ThermoFisher Scientific/Dreeich)
Luna HILIC 3 µm 100 x 2 mm (Phenomenex/Aschaffenburg)
Monochrom MS 5 µm 150 x 2 mm (Varian, Inc./Middelburg (Netherland))
RSC-C18-AQ 3 µm 50 x 2,1 mm (R. Sauerbrey/Reinhardshagen)
Synergi Polar-RP 4 µm 250 x 2,5mm (Phenomenex/Aschaffenburg)
YMC ODS-AM 5 µm 150 x 3 mm (YMC Europe GmbH/Dinslaken)

Vorsäulen:

Hypersil BDS C18 5 µm 10 x 2mm (ThermoFisher Scientific/Dreeich)
Metaguard Monochrom MS 5 µm 2 mm (Varian, Inc./Middelburg (Netherland))
Luna HILIC 4 x 2,0 mm (Phenomenex/Aschaffenburg)
Polar-RP 4 x 2 mm (Phenomenex/Aschaffenburg)
YMC ODS-AM 5 µm 20 x 3 mm (YMC Europe GmbH/Dinslaken)

1-Heptansulfonsäure Natriumsalz (Scharlau Chemie S.A/Barcelona (Spanien))
Isochlortetracyclin Hydrochlorid (Acros Organics/Geel (Belgien))
Josamycin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Koffein (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Leucomycin Hydrat (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Levofloxacin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Lincomycin Hydrochlorid Hydrat (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Marbofloxacin (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Met-Arg-Phe-Ala (Research Plus, Inc.; Manasquan (USA))
Methacyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Methanol (Chromasolv; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Minocyclin Hydrochlorid CRS (European Pharmacopeia/Strasbourg (France))
Natriumacetat (wasserfrei, p.a.; Merck/Darmstadt)
Natriumcarbonat (wasserfrei; Merck/Darmstadt)
Natriumchlorid 99,99 % (Merck/Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (wasserfrei, Suprapur; Merck/Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat (p.a.; Merck/Darmstadt)
Natriumhydroxid (p.a.; Merck/Darmstadt)
Neomycin Trisulfat x Hydrat (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
2-Nitrobenzaldehyd (LC-MS-grade; Merck/Darmstadt)
Norfloxacin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Ortho-Phosphorsäure 85 % (p.a; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Oxytetracyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Oxolinsäure (Sigma-Aldrich/Steinheim)
2,2,3,3,3-Pentafluorpropionsäure (Merck/Darmstadt)
Reserpin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Rolitetracyclin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Roxithromycin CRS (European Pharmacopeia/Strasbourg (France))
Salzsäure 1 mol/L (p.a.; Merck/Darmstadt)
Sarafloxacin Hydrochlorid (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Semicarbazid Hydrochlorid (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sparfloxacin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Spectinomycin Dihydrochlorid Pentahydrat (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Spiramycin (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Streptomycin Sulfat (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfanilamid (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfachinoxalin (Pestanal; Sigma-Aldrich/Steinheim)

Sulfachloropyridazin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfadiazin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfadimethoxin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfadoxin (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfaguanidin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfamerazin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfamethazin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfameter (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfamethizol (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfamethoxazol (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfamethoxyipyridazin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfamoxazol (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfanitran (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfapyridin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfasalazin (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfasomidin (Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfathiazol (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Sulfisoxazol (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Tetracyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Tilmicosin (Mischung von Isomeren; Vetranal; Sigma-Aldrich/Steinheim)
Titriplex III, Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA (p.a.; Merck/Darmstadt)
Trifluoressigsäure (Merck/Darmstadt)
Trimethoprim (Sigma-Aldrich/Steinheim)
Tylosin CRS (European Pharmacopeia/Strasbourg (France))
Ultramark (Alfa Aesar Lancaster/Pelham (Great Britain))
Wasser (bidest, Lichrosolv; Merck/Darmstadt)

10.2 Geräte

10.2.1 LCQ dreidimensionale Iontrap

HPLC-System

HPLC-System Spectra SYSTEM

Degasser:	SCM 1000 Vakuum Membrane Degasser
Pumpe:	P 4000 Gradient Pumpe
Injektionsautomat:	AS 3000, Autosampler (gekühlt, 10 °C) mit integriertem Säulenofen (temperiert: 30 °C)
Detektor:	UV 6000 LP
Messbereich:	190 – 800 nm
Säulenschaltventil	STUW-Trapping

Massenspektrometer

LCQ-Advantage Ionenfallen-Massenspektrometer (Fa. Thermo Finnigan/Egelsbach)



Abb. 85: LCQ-Advantage: Dreidimensionale Ionenfalle (Iontrap)

Ionisierungsmethode: Elektrospray Ionisation (ESI), positiv Modus $[M+H]^+$,
Bestätigung durch MS-MS- Stoßexperimente (He)

Tune-Page-Parameter

Mass Range:	80 – 2000 [m/z]
Sheat Gas Flow Rate:	47 [arb]
Auxillary Gas Flow Rate:	0 [arb]
Ion Spray Voltage:	5 [kV]
Capillary Temperature:	250 [°C]
Capillary Voltage:	9 [V]
Tube Lens Offset:	- 5,0 [V]
Multipole 1 Offset:	- 1,5 [V]
Lens Voltage:	- 32 [V]
Multipole 2 Offset:	- 5,5 [V]

Online-SPE

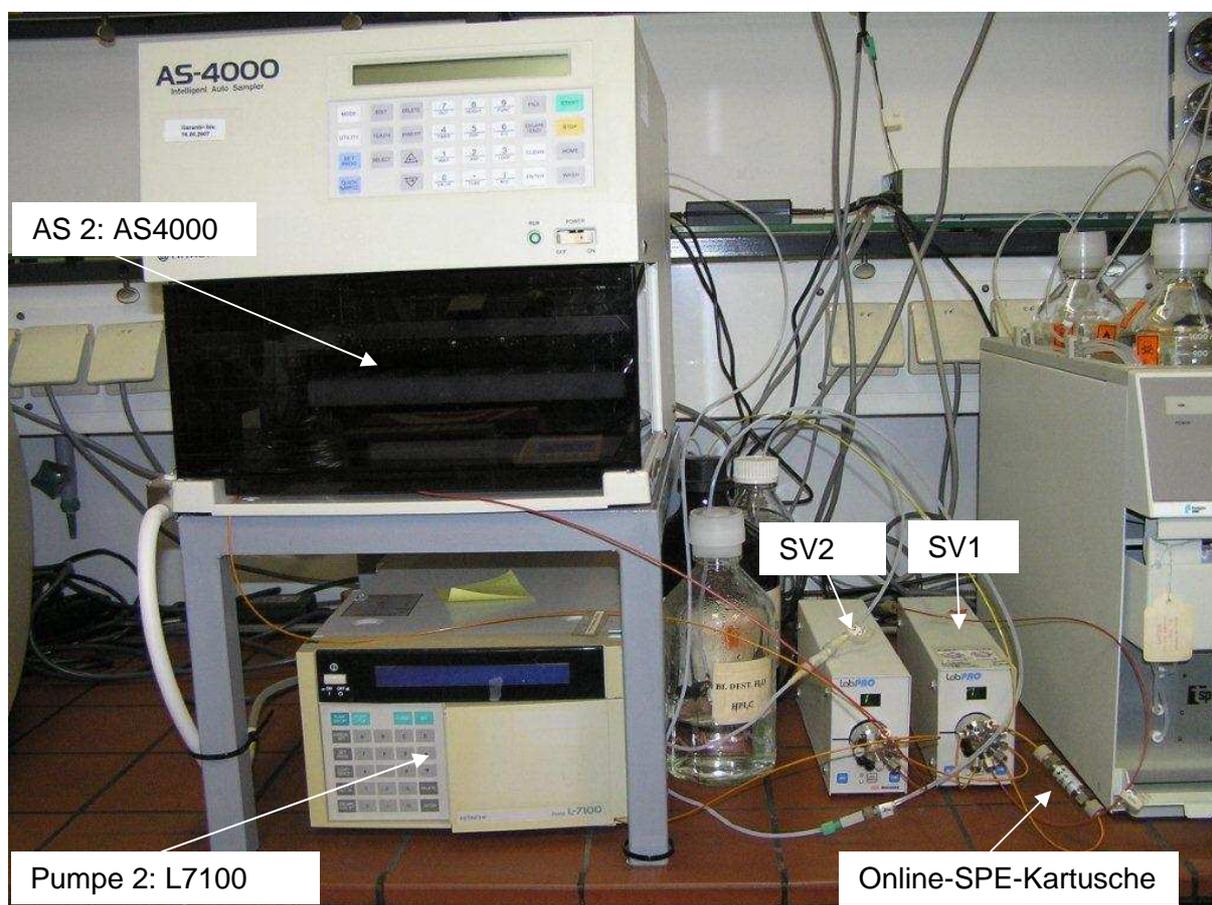


Abb. 86: Online-SPE-System bestehend aus einem Autosampler (AS2), Pumpe (Pumpe 2), Online-SPE-Kartusche und zwei Schaltventilen (SV1/2)

Injektionsautomat (AS2):	AS 4000, Autosampler (gekühlt, 10 °C) mit integrierten Säulenofen (temperiert 30 °C)
Pumpe 2:	L-7100 Gradient Pumpe Merck-Hitachi
2 Schaltventile (SV):	LabPro 10-Port Schaltventil

10.2.2 LTQ lineare Iontrap

HPLC-System

Pumpe:	Surveyor MS Pump Plus
Injektionsautomat:	Surveyor Autosampler Plus(gekühlt, 10 °C) mit integriertem Säulenofen (temperiert: 30 °C)
Detektor:	PDA Detector Plus
Messbereich:	190 – 800 nm

Massenspektrometer

LTQ 34000 lineare Ion Trap-Massenspektrometer (Fa. ThermoFisher)



Abb. 87: LTQ: lineare Ionenfalle (Iontrap)

Ionisierungsmethode:	Elektrospray Ionisation (ESI), positiv Modus $[M+H]^+$, negativ Modus $[M-H]^-$, Bestätigung durch MS^n - Stoßexperimente (n= 2 - 10),(He)
----------------------	--

Tune-Page-Parameter:

Mass Range:	50 – 2000 [m/z]
Sheat Gas Flow Rate:	29 [arb]
Auxillary Gas Flow Rate:	0 [arb]
Ion Spray Voltage:	5 [kV]
Capillary Temperature:	300 [°C]
Capillary Voltage:	-31 -39 [V]
Tube Lens Offset:	-72,5 - 95 [V]
Multipole 1 Offset:	-3 - 5 [V]
Lens Voltage:	-66 - 54 [V]
Multipole 2 Offset:	-4,5 - 13 [V]

Online-SPE

SP2000 Online SPE-Modul (Fa. Applica/Bremen)

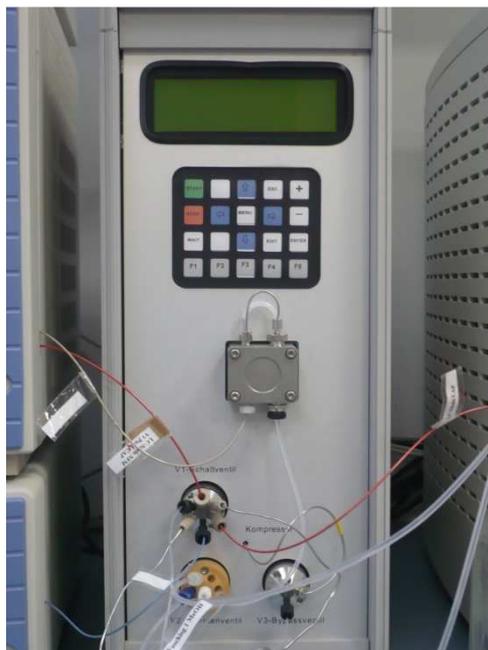


Abb. 88: SP2000: Online-SPE-System (Fa. Applica/Bremen)

10.2.3 Sonstige Laborgeräte

Thermostat	VLM EC 1
Magnetrührer	IKA RH basic 2
pH-Meter	Knick pH-Meter 766 Calimatie
SPE-Vakuumblock	Merck LiChrolut
Zentrifuge	Hettich Rotofix 32 Heraeus Biofuge primo
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex
Waage	Kern& Söhne GmbH ABJ
Schüttler	IKA-Labortechnik KS 501 digital Edmund Bühler SM-30 control
Trockenschrank	Heraeus T-5042

10.3 Lösungen

10.3.1 Mobile Phasen

Sulfonamide, Tetracycline, Trimethoprim und Fluorchinolone

Laufmittel A (Acetonitril / Wasser / Ameisensäure 10/89,9/0,1 (v/v/v))

Laufmittel B (Acetonitril / Wasser / Ameisensäure 60/39,9/0,01 (v/v/v))

Laufmittel A: In einem Becherglas werden 200 mL Acetonitril, 1,8 L bidestilliertes Wasser und 2 mL Ameisensäure (98-100%) zusammen gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt.

Laufmittel B: In einem Becherglas werden 1,2 L Acetonitril, 800 mL bidestilliertes Wasser und 2 mL Ameisensäure (98-100%) zusammen gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt.

Makrolide und Lincosamide

Laufmittel A (Acetonitril / Wasser / Ameisensäure 10/89,9/0,1 (v/v/v))

Laufmittel B (Acetonitril / Wasser / Ameisensäure 60/39,9/0,01 (v/v/v))

Laufmittel A: In einem Becherglas werden 200 mL Acetonitril, 1,8 L bidestilliertes Wasser und 2 mL Ameisensäure (98-100%) zusammen gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt.

Laufmittel B: In einem Becherglas werden 1,2 L Acetonitril, 800 mL bidestilliertes Wasser und 2 mL Ameisensäure (98-100%) zusammen gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt.

Aminoglykoside

Laufmittel A: (Ammoniumformiat / Acetonitril / Ameisensäure 9,8/90/0,2 (v/v/v))

Laufmittel B:(Ammoniumformiat / Acetonitril / Ameisensäure 89,2/10/0,2 (v/v/v))

Laufmittel A: In einem Becherglas werden 1,8 L Acetonitril, 200 mL Ammoniumformiatlösung (0,1 M) und 2 mL Ameisensäure (98-100%) zusammen gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt.

Laufmittel B: In einem Becherglas werden 200 mL Acetonitril, 1,8 L Ammoniumformiatlösung (0,1 M) und 2 mL Ameisensäure (98-100%) zusammen gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt.

Nitrofurantolol

Laufmittel A: Wasser (0,01 % Ameisensäure(v/v))

Laufmittel B: Methanol (0,01 % Ameisensäure (v/v))

Laufmittel A: In einem Becherglas werden 1000 mL bidestilliertes Wasser und 100 µL Ameisensäure (98-100%) zusammen gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt.

Laufmittel B: In einem Becherglas werden 1000 mL Methanol und 100 µL Ameisensäure (98-100%) zusammen gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt.

Chloramphenicol

Laufmittel A: bidest. Wasser

Laufmittel B: Methanol

10.3.2 Antibiotika-Stammlösungen

1000 mg/L-Stammlösungen:

10 mg des entsprechenden Antibiotikums werden in einem 10 mL Messkolben eingewogen und mit Methanol oder bidest. Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

10 mg/L-Mischstandardlösungen:

100 μ L der einzelnen 1000 mg/L-Antibiotikastammlösungen werden in einen 10 mL Messkolben pipettiert und mit Methanol oder bidest. Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Aus den Mischstandardlösungen werden vor jeder Messreihe die verdünnten Arbeitslösungen frisch vorbereitet

10.3.3 Pufferlösungen

Citratpuffer (pH 4,1): In einem Becherglas wurden 620 mL 0,1 mol/L Citronensäure mit 380 mL einer 0,2 mol/L Natriumhydrogenphosphatlösung gemischt. In dieser Lösung wurde 37,244 g Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz Dihydrat (0,1 mol/L) gelöst.

- 0,1 mol/L Citronensäure: 21,014 g Citronensäure Monohydrat wurde in 1000 mL bidestilliertem Wasser gelöst.
- 0,2 mol/L Natriumhydrogenphosphat: 35,6 g Di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat wurde in 1000 mL bidestilliertem Wasser gelöst.

0,1 M Ammoniumformiatlösung (pH 3,2): 6,31 g Ammoniumformiat werden in 900 mL bidest. Wasser gelöst und in einem 1L-Messkolben auf 1000 mL aufgefüllt. Abschließend werden 10,5 mL Ameisensäure (98 %) hinzugefügt und die Lösung gemischt.

Carbonatpuffer (pH 9): In einem Becherglas werden 100 mL einer 0,01 M Natriumcarbonatlösung mit 20 mL einer 0,01 M Natriumhydrogencarbonatlösung gemischt.

- 0,1 mol/L Natriumcarbonat: 10,6 g Natriumcarbonat (wasserfrei) wurde in 100 mL bidestilliertem Wasser gelöst.
- 0,1 mol/L Natriumhydrogencarbonat: 1,7g Natriumhydrogencarbonat wurde in 20 mL bidestilliertem Wasser gelöst.

HSA-Phosphatpuffer (pH 2): 10,15 g 1-Heptansulfonsäure Natriumsalz (50 mmol/L) wird mit 3 g Natriumhydrogenphosphat (25 mmol/L) in 900 mL bidestilliertem Wasser gelöst und in einem 1L- Messkolben auf 1000 mL aufgefüllt. Abschließend wird die Lösung mit ortho-Phosphorsäure (85 %) auf pH 2 eingestellt.

Phosphatpuffer (pH 8): 13,8 g Natriumphosphat Monohydrat werden in 900 mL bidest. Wasser gelöst, auf 1000 mL aufgefüllt und mit 10 N NaOH auf pH 8 eingestellt.

10.3.4 Sonstige Chemikalien

2-Nitrobenzaldehyd (0,05 M): In einem 20 mL-Messkolben werden 151,2 mg 2-NBA eingewogen, mit Dimethylsulfoxid gelöst und bis zum Eichstrich aufgefüllt.

Natriumchlorid-Lösung 4% (m/v): In einem 100 mL-Messkolben werden 4 g NaCl eingewogen und mit bidestilliertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt

HSA-Lösung (0,1 M): 20,2 g 1-Heptansulfonsäure Natriumsalz werden in 900 mL bidestilliertem Wasser gelöst und in einem 1L- Messkolben auf 1000 mL aufgefüllt.

Ammoniumacetatlösung (0,1 M): 7,7 g Ammoniumacetat werden in 900 mL bidestilliertem Wasser gelöst und auf 1000 mL aufgefüllt.

10.4 Validierung der Analysemethoden

Die theoretischen Grundlagen und die Ergebnisse der Validierung wurden bereits in Kapitel 8.3 dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden am Beispiel des Chlortetracyclins die Validierung vorgestellt. Alle weiteren Daten zur Validierung der anderen Analyten sind in Anhang 3 dargestellt.

Zur Bestimmung des linearen Bereiches und der Ermittlung der Kalibrationsgerade wurden Antibiotika-Standard-Lösungen zu Mischstandardlösungen mit folgenden Konzentrationen verdünnt: 5 µg/L, 10 µg/L, 15 µg/L, 20 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L und 100 µg/L. Ausnahme bildeten die Validierungen der Verfahren zur Bestimmung von Nitrofurantolol und Chloramphenicol, die um Faktor 10 geringere Konzentrationen beinhalten. Die Konzentrationen 5 µg/L, 20 µg/L und 100 µg/L wurden 10mal analysiert, alle weiteren je 3mal.

Die Messpräzision wurde anhand von 3 Standardlösungen und 2 dotierten Honigproben bestimmt. Die Honigproben wurden mit 10 µg/kg bzw., 50 µg/kg (für NFM und CAP Faktor 10 geringer) der entsprechenden Analyten dotiert und für die Messung vorbereitet. Die Standardlösungen und dotierten Proben wurden jeweils 10fach analysiert.

Zur Ermittlung der Wiederfindung wurde ein Akazienhonig in 12 Aliquote aufgeteilt und mit je 3mal mit 5 µg/kg, 10 µg/kg, 25 µg/kg und 50 µg/kg der entsprechenden Analyten dotiert. Die Proben wurden je einfach injiziert. Zusätzlich wurde eine Probe undotiert analysiert.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden nach DIN 32645 über die Kalibrationsgeraden (7 Konzentrationen, n=3) berechnet. Das Nachweisvermögen und die Erfassungsgrenze wurden über die Standardabweichung von drei dotierten Honigproben (1 µg/kg bzw. 10 µg/kg, n=1) ermittelt.

11 Literatur

- [1] Honigverordnung (HonigV) Geltung ab 29.01.2004 V. v. 16.01.2004 BGBl. I S. 92; zuletzt geändert durch Artikel 9 V. v. 08.08.2007 BGBl. I S. 1816.
- [2] Deutscher Berufs und Erwerbs Imker Bund (DBIB); *Umdenken in der Landwirtschaft – Positionspapier 12/2008*. www.berufsimker.de.
- [3] H. Horn, C. Lüllmann; *Das große Honigbuch - Entstehung, Gewinnung, Gesundheit und Vermarktung*. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, Stuttgart (2006).
- [4] Richtlinie 2001/110/EG des Rates vom 20. Dezember 2001 über Honig, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften.
- [5] Verordnung (EWG) Nr. 470/2009 des Rates vom 6. Mai 2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates und zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments.
- [6] Kurzfassung des Vortrages von Prof. Dr. H. Steinhart, Hamburg: Bedeutung von Schadstoffen und Rückständen in tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln (Antibiotika, Pestizide, Insektizide, Schwermetalle etc.); <http://www.bdem.de/tagungen/tagung2/rueckstaende.pdf>; letzter Zugriff am 23.11.2009.
- [7] Definition Apikultur: <http://www.duden.de/definition/apikultur>. letzter Zugriff am 23.11.2009.
- [8] P. Martin; *Veterinary drug residues in honey*. *APIACTA*, **38**, (2003), 21-23.
- [9] BfR: *BfR-Positionspapier zu Nulltoleranzen in Lebens- und Futtermitteln*. http://www.bfr.bund.de/cm/208/nulltoleranzen_in_lebens_und_futtermitteln.pdf, (2007); letzter Zugriff am 23.11.2009.
- [10] M. Grote; *Antibiotika in der Umwelt und in Nahrungsmitteln. Ein Risiko für Konsumenten?* *Internist. Prax.*, **47**, (2007), 919-926.
- [11] G. Yim, H. Huimi, J. Davies; *The truth about antibiotics*. *International J. Med. Microbiol.*, **296**, (2006), 163-170.
- [12] E. B. Goh; *Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics*. *PNAS*, **99**, (2002), 17025-17030, <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.252607699>; letzter Zugriff am 23.11.2009.
- [13] BfR: *Jahresbericht 2007 zum Nationalen Rückstandskontrollplan*. http://www.bfr.bund.de/cm/208/bewertung_der_ergebnisse_des_nationalen_rueckstandskontrollplans_2006.pdf, (2007); letzter Zugriff am 23.11.2009.
- [14] BfR: *Jahresbericht 2008 zum Nationalen Rückstandskontrollplan*. http://www.bvl.bund.de/cln_027/nn_493680/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit_Kontrollen/04__NRKP/01__berichte_nrkp/03__NRKP__ErgaenzendeDokumente__2008/nrkp_bericht_2008.html#doc1330186bodyText15; letzter Zugriff am 30.01.2010.
- [15] BVL: *Archiv der Berichte zum Nationalen Rückstandskontrollplan*. http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_493680/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit_Kontrollen/04__NRKP/01__berichte_nrkp/00__berichte_gesamtuebersicht/nrkp_gesamtuebersicht__berichte.html; letzter Zugriff am 23.11.2009.

- [16] M. Dettenkoffer, M. Ackermann, M. Eikenberg, H. Merkel; *Auswirkungen des Einsatzes von Antibiotika und Substanzen mit antibiotischer Wirkung in der Landwirtschaft und im Lebensmittelsektor. Ein Literatur-Review*. Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene am Universitätsklinikum Freiburg, (2004).
- [17] S. Bogdanov; *Projekt Antibiotikarückstände in Honig aus landwirtschaftlichen Verschmutzungsquellen. Stand Februar 2003: Situationsanalyse. Internal Report*. Bern, Swiss BeeResearch Centre, (2003).
- [18] S. Bogdanov; *Qualität der Bienenprodukte und die Verschmutzungsquellen*. Schweizerisches Zentrum für Bienenforschung (2003).
- [19] D. Brasse; *Stellungnahme der BBA zum Streptomycin-Problem. Teil 2 Bewertung der Rückstandswerte im Honig*. Allgemeine Deutsche Imkerzeitung, **35**, (2001), 24-25.
- [20] T. Grünewald; *Honig als Lebensmittel*; Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs. Tierärztliche Fakultät der LMU München.
- [21] S. Bogdanov, P. Fluri; *Honigqualität und Antibiotikarückstände*. Schweizerische Bienen-Zeitung, **123(7)**, (2000), 407-410.
- [22] S. Bogdanov; *Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products*. APIACTA, **38**, (2003), 190-197.
- [23] Apfelbaum befallen mit Feuerbranderreger: <http://de.wikipedia.org/wiki/Feuerbrand>; letzter Zugriff am 30.01.2010.
- [24] Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch – LFGB; *Anhang 13. Gesetzliche Bestimmungen im Zusammenhang mit Honig (BRD), § 10 Stoffe mit pharmakologischer Wirkung*. 1 September 2005 (BGBl. I S. 2618), ber. durch BGBl. I S. 3007.
- [25] 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.
- [26] Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG.
- [27] Codex Alimentarius; *Revised codex standard for honey*. Codex Stan 12-1981, Rev. 1 (1987), Rev. 2(2001)1.
- [28] Entscheidung der Kommission vom 13. März 2003 zur Änderung der Entscheidung 2002/657/EG hinsichtlich der Festlegung von Mindestleistungs-grenzen (MRPL) für bestimmte Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2003) 764) (Text von Bedeutung für den EWR) (2003/181/EG).
- [29] Entscheidung der Kommission vom 11. Januar 2005 zur Festlegung einheitlicher Normen für die Untersuchung von aus Drittländern eingeführten Erzeugnissen tierischen Ursprungs auf bestimmte Rückstände (Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2004) 4992) (Text von Bedeutung für den EWR) (2005/34/EG)
- [30] Verordnung (EG) Nr. 396/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Februar 2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs und zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG des Rates (Text von Bedeutung für den EWR)
- [31] Konsolidierte Fassung der in die Anhänge I bis IV der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates aufgenommenen Stoffe; Stand: 23. Juni 2008.
- [32] Rückstands-Höchstmengen-Verordnung (RHmV): Verordnung über Höchstmengen an Rückständen von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln,

- Düngemitteln und sonstigen Mitteln in oder auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen) In der Fassung vom 21.10.1999, zuletzt geändert durch Dritte Verordnung zur Änderung der Rückstands-Höchstmengenverordnung und zur Änderung der Futtermittelverordnung vom 20.2.2009.
- [33] R. J. Carman, M. A. Simon, H. Earl Petzold III, R. F. Wimmer, M- R. Batra, A. Haydée Fernández, M. A. Miller, M. Bartholomew; *Antibiotics in the human food chain: Establishing no effect levels of tetracycline, neomycin, and erythromycin using a chemostat model of the human colonic microXora*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, **43**, (2005), 168-180.
- [34] H. Nau, P. Steinberg, M. Kietzmann; *Lebensmitteltoxikologie - Rückstände und Kontaminanten: Risiken und Verbraucherschutz*. Pary Buchverlag, Berlin (2003).
- [35] EMEA/CVMP/234/01; *Revised guideline on the safety evaluation of antimicrobial substances regarding the effects on human gut flora*. (2002).
- [36] Joint FAO/WHO expert committee on food additives; *Seventieth meeting (Residues of veterinary drugs)*. Geneva, 21–29 October 2008 www.fao.org/ag/agn/jecfa/index_en.stm, www.who.int/pcs/jecfa/jecfa.htm.
- [37] U. Banasiak, H. Heseke, C. Sieke, C. Sommerfeld, C. Vohmann; *Abschätzung der Aufnahme von Pflanzenschutzmittel-Rückständen in der Nahrung mit neuen Verzehrsmengen für Kinder*. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz, Springer Verlag, **48**, (2005), 84-98.
- [38] M. S. Díaz-Cruz, M. J. López de Alda, D. Barceló; *Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge*. Trends in Analytical Chemistry, **22(6)**, (2003), 340-351.
- [39] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese; *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products*. Trends in Analytical Chemistry, **24 (7)**, (2005), 704-733.
- [40] M. Petrović, M. D. Hernando, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló; *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review*. Journal of Chromatography A, **1067**, (2005), 1-14.
- [41] M. Grote, C. Schwake-Anduschus, R. Michel, H. Stevens, W. Heyser, G. Langenkämper, T. Betsche, M. Freitag; *Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil*. Landbauforschung Völkenrode - FAL Agricultural Research, **57(1)**, (2007), 25-32.
- [42] M. Grote, C. Schwake-Anduschus, H. Stevens, R. Michel, T. Betsche, M. Freitag; *Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden - Ergebnisse eines Modellversuchs*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, **1**, (2006), 38-50.
- [43] M. Grote, M. Freitag, D. H. Yolcu, H. Hayen, T. Betsche; *Screening zum Antibiotika-Transfer aus dem Boden in Getreide in Regionen Nordrhein-Westfalens mit großen Viehbeständen*. J. Verbr. Lebensm., **3**, (2008), 174-185.
- [44] H. Oka, Y. Ito, H. Matsumoto; *Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods*. Journal of Chromatography A, **882**, (2000), 109-133.
- [45] Purdue University: *CAFOs and public health: The fate of unabsorbed antibiotics*. <http://www.ces.purdue.edu/extmedia/ID/cafo/ID-348%20HTML/ID-348.html>; letzter Zugriff am 23.11.2009.
- [46] B. Halling-Sørensen, S. Nors Nielsen, P. F. Lanzky, F. Ingerslev, H. C. Holten Lützhøf, S. E. Jørgensen; *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review*. Chemosphere, **36(2)**, (1998), 357-393.

- [47] K. Kümmerer; *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*. 1 Auflage, Springer Verlag, Berlin, (2001).
- [48] Wirkung von Antibiotika: http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/bilder/lfig11_1.GIF; letzter Zugriff am 23.11.2009.
- [49] Verbrauchsmengen von Antibiotika in Europa: <http://www.fedesa.be/>; letzter Zugriff am 23.11.2009.
- [50] Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung.
- [51] Bundestierärztekammer zur Fachanhörung: *Verbraucher schützen - Antibiotika-Einsatz in der Tierhaltung minimieren*. Nummer 10/01 26. Oktober 2001.
- [52] GERMAP 2008: *Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch; Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland*. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Berlin, 1. Auflage (2008), http://www.bvl.bund.de/cln_007/DE/08_PresseInfothek/00_doks_downloads/Germap_2008.html; letzter Zugriff am 23.11.2009.
- [53] DANMAP 2007. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. <http://www.danmap.org>; letzter Zugriff am 23.11.2009.
- [54] D. Adam, K. Thoma; *Antibiotika Neuere Wirkstoffe und Darreichungsformen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1994.
- [55] Helmholtzzentrum München; *Antibiotika und Antibiotikaresistenzen*. FLUGS Fachinformationsdienst, Neuherberg, (2007), <http://www.helmholtz-muenchen.de/flugs>.
- [56] M. Kresken, D. Hafner and the study group bacterial resistance of the Paul-Ehrlich Society for chemotherapy. *Infection* **27**, Suppl. 2, (1999), 2-8 (http://www.p-eg.org/ag_resistenz/).
- [57] I. Feuerpfeil, J. López-Pila, R. Schmidt, E. Schneider, R. Szewzyk; *Antibiotika-resistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt*. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch- Gesundheitsschutz, Springer Verlag, **42**, (1999), 37-50.
- [58] R. Roissant, C. Werner, B. Zwissler; *Die Anästhesiologie*. Springer Verlag, (2008), 1620.
- [59] Antibiotikaresistenzmechanismen: <http://riboworld.com/antib/antiresistenz.shtml>. letzter Zugriff am 23.11.2009.
- [60] *Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard*. The EFSA Journal, **765**, (2008), 1-87.
- [61] Dr. Wilke; *Einsatz von Antibiotika Empfehlungen zur Verminderung von Resistenzentwicklung – Beitrag der Veterinärmedizin, Stand: 1999*. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz, Springer-Verlag, **43**, (2000), 234.
- [62] D. Adam; *Antibiotika – Neuentwicklungen Überflüssig, notwendig oder gar unverzichtbar?* Internist., Springer-Verlag, **39**, (1998), 788-793.
- [63] D. Ortelli, P. Edder, C. Corvi; *Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Chromatographia*, **59(1/2)**, (2004), 61-64.

- [64] H. J. Roth, H. Fenner; *Pharmazeutische Chemie III: Arzneistoffe Struktur - Bioreaktivität - Wirkungsbezogene Eigenschaften*. Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York (1988) 39-90.
- [65] W. Dürckheimer; *Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen*. Angewandte Chemie, **21**, (1975), 751-784.
- [66] Diplomarbeit R. Michel; *Bestimmung von Arzneistoffrückständen aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung in Boden und Pflanzen mit LC-MS-MS*. Universität Paderborn, Anorganische und Analytische Chemie (2005).
- [67] C. J. Coulson; *Molecular mechanism of drug action*. Taylor & Francis Ltd., London, (1994).
- [68] R. M. Evans; *The chemistry of the antibiotics used in medicine*. Pergamon Press Ltd., Oxford (1965).
- [69] O. G. Othersen, H. Lanig, and T. Clark; *Systematic surface scan of the most favorable interaction sites of magnesium ions with tetracycline*. J. Med. Chem., **46**, (2003), 5571-5574.
- [70] J. M. Wessels, W. E. Ford, W. Szymczak, S. Schneider; *The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with Mg^{2+} and Ca^{2+} : A spectroscopic Study*. J. Phys. Chem. B, **102**, (1998), 9323-9331.
- [71] A. Pena, N. Pelantova, C. M. Lino, M. I. N. Silveira, P. Solich; *Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection*. J. Agric. Food Chem., **53**, (2005), 3784-3788.
- [72] A. Pena, C. M. Lino, M. I. N. Silveira; *Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using postcolumn derivatization with fluorescence detection*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int., **82**, (1999), 55-60.
- [73] D. G. Kennedy, R. J. McCracken, M. P. Carey, W. J. Blanchflower, S. A. Hewitt; *Iso- and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg*. Journal of Chromatography A, **812**, (1998), 327-337.
- [74] M. Grote, A. Vockel, D. Schwarze, A. Mehlich, M. Freitag; *Investigation on the fate of antibiotics used in pig farming in food chain and environment (Part 1)*. Fresenius Environmental Bulletin - FEB, **13 (11b)**, (2004), 1216 – 1224.
- [75] Y. Liang, M. Bonner Denton, R. B. Bates; *Stability studies of tetracycline in methanol solution*. Journal of Chromatography A, **827**, (1998), 45-55.
- [76] J. R. D. McCormick, S. M. Fox, L. L. Smith, B. A. Bitler, J. Reichenthal, V. E. Origoni, W. H. Müller, R. Winterbottom, A. Dobrschujk; *Studies of the reversible epimerization occurring in the tetracycline family. The preparation, properties and proof of structure of some 4-epi-tetracyclines*. Contribution from the chemical process improvement department, Lederle laboratories division, American Cyanamid co. (1957) 2849-2857.
- [77] M.-L. Loke, S. Jespersen, R. Vreeken, B. Halling-Sørensen, J. Tjørnelund; *Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems*. Journal of Chromatography B, **783**, (2003) 11-23.
- [78] M. Cherlet, P. De Backer, S. Croubels; *Control of the keto-enol tautomerism of chlortetracycline for its straightforward quantitation in pig tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1133**, (2006) 135-141.
- [79] M. Petz, G. Zurhelle, E. Müller-Seitz; *Automated residue analysis of tetracyclines and their metabolites in whole egg, egg white, egg yolk and hen's plasma utilizing a modified ASTED system*. Journal of Chromatography B, **739**, (2000), 191-203.

- [80] Dissertation A. Vockel; *Bestimmung von Chlortetracyclinrückständen in biologischen Proben aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung mit HPLC-UV-MS/MS – Methodenentwicklung und Anwendung in Medikationsstudien*. Universität Paderborn, Anorganische und Analytische Chemie (2005).
- [81] A. Leitner, P. Zöllner, W. Lindner; *Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **939**, (2001) 49-58.
- [82] R. J. McCracken, D. G. Kennedy; *Determination of furazolidone in animal feeds using liquid chromatography with UV and thermospray mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, **771**, (1997), 349-354.
- [83] A. Conneely, A. Nugent, M. O’Keeffe, P. P. J. Mulder, J. A. van Rhijn, L. Kovacsics, A. Fodor, R. J. McCracken, D. G. Kennedy; *Isolation of bound residues of nitrofurantoin drugs from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection*. Analytica Chimica Acta, **483**, (2003), 91-98
- [84] M. O’Keeffe, A. Conneely, K. M. Cooper, D. G. Kennedy, L. Kovacsics, A. Fodor, P. P.J. Mulder, J. A. van Rhijn, G. Trigueros; *Nitrofurantoin antibiotic residues in pork The FoodBRAND retail survey*. Analytica Chimica Acta, **520**, (2004) 125-131.
- [85] K. Simon, W. Krüpe; *Streptomycin – Dihydrostreptomycin. II. Mitteilung. Über toxikologische und pharmakologische Eigenschaften beider Präparate*. Zeitschrift f. d. gesamte experimentelle Medizin, **117**, (1950), 123-132.
- [86] D. Adam, K. Thoma; *Antibiotika – Neuere Wirkstoffe und Darreichungsformen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, (1994).
- [87] Pharmazeutische Zeitung online; *Antibiotika einsparen*. http://www.pharmazeutischezeitung.de/index.php?id=pharm5_10_2002; letzter Zugriff am 30.01.2010.
- [88] Chemotherapie Journal; *Bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin)*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Heft **3** (1999), 8. Jahrgang, 89-109; <http://www.p-e-g.org/publikationen/ctj/0399/UEBER.PDF>; letzter Zugriff am 30.01.2010.
- [89] Chemotherapie Journal; *Neuere Fluorchinolone im Vergleich*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Supplement **20** (2002), 11. Jahrgang, 1-81; http://www.wissenschaftliche-verlagsgesellschaft.de/CTJ/CTJ2002/Supl_20.pdf; letzter Zugriff am 30.01.2010.
- [90] W. Graninger; *Chinolone in der Veterinärmedizin*. Antibiotika Monitor, tom. XXII, **6**, (2006), 91-96; http://www.antibiotikamonitor.at/06_6/pdf/06_6_03.pdf; letzter Zugriff am 30.01.2010.
- [91] Y.-A. Hammel, R. Mohamed, E. Gremaud, M.-H. LeBreton, P. A. Guy; *Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1177**, (2008), 58-76.
- [92] R. Salter Charm II System - *Comprehensive residue analysis system for honey*. Apiacta, **38**, (2003), 198-206.
- [93] M. I. Lopez, J. S. Pettis, I. Barton Smith, P. Chu; *Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS*. J. Agric. Food Chem., **56**, (2008), 1553-1559.
- [94] G. Zurhelle, M. Petz, E. Mueller-Seitz, E. Siewert; *Metabolites of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline and their distribution in egg white, egg yolk, and hen plasma*. J. Agric. Food Chem., **48**, (2000), 6392-6396.

- [95] G. Alfredsson, C. Branzell, K. Granelli, Å. Lundström; *Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS*. *Analytica Chimica Acta*, **529**, (2005), 47-51.
- [96] A. Carrasco-Pancorbo, S. Casado-Terrones, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez; *Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet and electrospray time-of-flight mass spectrometry on-line detection for the separation of eight tetracyclines in honey samples*. *J. Chromatogr. A*, **1195(1-2)**, (2008) 107–116.
- [97] H. de Ruyck, H. de Ridder; *Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, (2007), 1511-1520.
- [98] A. K. Lykkeberg, B. Halling-Sørensen, C. Cornett, J. Tjørnelund, S. Honoré Hansen; *Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **34**, (2004), 325-332.
- [99] S.-P. Khong, Y.-A. Hammel, P. A. Guy; *Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, (2005), 493-502
- [100] M. E. Lindsey, M. Meyer, E. M. Thurman; *Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry*. *Anal. Chem.* **73**, (2001), 4640-4646.
- [101] H. Nakazawaa, S. Inoa, K. Katoa, T. Watanabea, Y. Itob, H. Oka; *Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B*, **732**, (1999), 55-64.
- [102] H. Oka, Y. Itoa, Y. Ikai, T. Kagamia, K. Harada; *Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods*. *Journal of Chromatography A*, **812**, (1998), 309-319.
- [103] V. H. Vartanian, B. Goolsby, J. S. Brodbelt; *Identification of tetracycline antibiotics by electrospray ionization in a quadrupole ion trap*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **9**, (1998), 1089-1098.
- [104] Y. Zhenfeng, Q. Yueming, L. Xiuyun, J. Caini; *Determination of multi-residues of tetracyclines and their metabolites in milk by high performance liquid chromatography-tandem positive-ion electrospray ionization mass spectrometry*. *Chin. J. Anal. Chem.*, **34(9)**, (2006), 1255-1259.
- [105] T. Goto, Y. Ito, S. Yamadaa, H. Matsumoto, H. Oka; *High-throughput analysis of tetracycline and penicillin antibiotics in animal tissues using electrospray tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring transition*. *Journal of Chromatography A*, **1100(2)**, (2005), 193-199.
- [106] S. Skúlason, E. Ingólfsson, T. Kristmundsdóttir; *Development of a simple HPLC method for separation of doxycycline and its degradation products*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **33**, (2003), 667-672.
- [107] A. Aszalos; *Fast determination of tetracycline antibiotics in different media by high-performance liquid chromatography*. *Chromatographia*, **20(5)**, (1985), 313-322.
- [108] P. Viñas, N. Balsalobre, C. López-Erroz, M. Hernández-Córdoba; *Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey*. *Journal of Chromatography A*, **1022**, (2004), 125-129.
- [109] H. Oka, Y. Ikai, N. Kawamura, K. Uno, M. Yamada; *A simple method for residual tetracyclines analysis in honey using a tandem cartridge clean-up system*. *Journal of Chromatography*, **389**, (1987), 417-426.

- [110] H. Oka, Y. Ikai, N. Kawamura, K. Uno, M. Yamada ; *Simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey*. Journal of Chromatography, **400**, (1987), 253-261.
- [111] J. Diana, L. Vandenbosch, B. De Spiegeleer, J. Hoogmartens, E. Adams; *Evaluation of the stability of chlortetracycline in granular premixes by monitoring its conversion into degradation products*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **39(3-4)**, (2005) 523–530.
- [112] K. Meindl, T. Clark; *Conformations and tautomers of 5a,6-anhydrotetracycline*. J. Phys. Chem. B, **109**, (2005), 4279-4284.
- [113] W. Naidong, E. Roets, J. Hoogmartens; *Quantitative analysis of demeclocycline by highperformance liquid chromatography*. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, **7(12)**, (1989), 1691-1703.
- [114] C. R. Anderson, H. S. Rupp, W.-H. Wu; *Complexities in tetracycline analysis-Chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, **1075**, (2005), 23–32.
- [115] H.-T Lu, Y. Jiang, H.-B. Li, F. Chen, M.-H. Wong; *Simultaneous determination of oxytetracycline, doxycycline, tetracycline and chlortetracycline in tetracycline antibiotics by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Chromatographia, **60(5/6)**, (2004), 259-264.
- [116] M. J. Schneider, S. E. Braden, I. Reyes-Herrera, D. J. Donoghue; *Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection*. Journal of Chromatography B, **846**, (2007), 8-13.
- [117] S. Casado-Terrones, A. Segura-Carretero, S. Busi, G. Dinelli, A. Fernández-Gutiérrez; *Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection*. Electrophoresis, **28**, (2007), 2882-2887.
- [118] Y. M. Li, A. van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens; *Analysis of demeclocycline by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **740**, (1996), 119-123.
- [119] M. O. Schmitt, S. Schneider; *Spectroscopic investigation of complexation between various tetracyclines and Mg^{2+} or Ca^{2+}* . Phys. Chem. Comm., **9**, (2000), 1-13.
- [120] R. K. Sharma, S. Joseph; *Formation constants and molecular modeling studies of metal ion-tetracycline complexes*. Indian Journal of Chemistry, **35**, (1996), 639-642.
- [121] H. F. dos Santos, W. B. de Almeida, M. C. Zerner; *Conformational analysis of the anhydrotetracycline molecule: A toxic decomposition product of tetracycline*. Journal of Pharmaceutical Sciences, **87(2)**, (1998), 190-195.
- [122] R. A. Figueroa, A. Leonard, A. A. Mackay; *Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays*. Environ. Sci. Technol., **38**, 2004476-483.
- [123] S. Huq, M. Garriques, K. M. R. Kallury; *Role of zwitterionic structures in the solid-phase extraction based method development for clean-up of tetracycline and oxytetracycline from honey*. Journal of Chromatography A, **1135**, (2006), 12-18.
- [124] C. Gu, K. G. Karthikeyan; *Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides*. Environ. Sci. Technol., **39**, (2005), 2660-2667.
- [125] N. Pastor-Navarro, S. Morais, A. Maqueira, R. Puchades; *Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues. Application to honey samples*. Analytica Chimica Acta, **594(2)**, (2007), 211-218.
- [126] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi; *A liquid chromatography-mass spectrometry assay for analyzing sulfonamide antibacterials in cattle and fish muscle tissues*. Anal. Chem., **75**, (2003), 1798-1804.
- [127] M. Silvia Díaz-Cruz, M. Jesús García-Galán, Damià Barceló; *Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in*

- environmental waters by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1193**, (2008), 50-59.
- [128] G. A. Grant, S. L. Frison, P. Sporns; *A sensitive method for detection of sulfamethazine and N⁴-acetylsulfamethazine residues in environmental samples using solid phase immunoextraction coupled with MALDI-TOF MS*. J. Agric. Food Chem., **51**, (2003), 5367-5375.
- [129] M. Y. Haller, S. R. Müller, C. S. McArdell, A. C. Alder, M. J.-F. Suter; *Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **952**, (2002), 111-120.
- [130] A. Kaufmann, S. Roth, B. Ryser, M. Widmer, D. Guggisberg; *Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey*. Journal of AOAC International, **85(4)**, (2002), 853-861.
- [131] A. Kaufmann, A. Kaenzig; *Contamination of honey by the herbicide asulam and its antibacterial active metabolite sulfanilamide*. Food Additives and Contaminants, **21(6)**, (2004), 564-571.
- [132] A. Krivohlavek, Z. Šmit, M. Baštinac, I. Žuntar, F. Plavšic-Plavšic; *The determination of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography - mass spectrometry method (LC/MS)*. J. Sep. Sci., **28**, (2005), 1434-1439.
- [133] D.-H. Kim, D. W. Lee; *Comparison of separation conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides*. Journal of Chromatography A, **984**, (2003), 153-158.
- [134] K. Kishida, N. Furusawa; *Application of shielded column liquid chromatography for determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their N⁴-acetyl metabolites in milk*. Journal of Chromatography A, **1028**, (2004), 175-177.
- [135] T. A.M. Msagati, M. M. Nindi; *Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection*. Talanta, **64**, (2004), 87-100.
- [136] B. Shao, D. Dong, Y. Wu, J. Huc, J. Meng, X. Tu, S. Xu; *Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, **546(2)**, (2005), 174-181.
- [137] T. S. Thompson, D. K. Noot; *Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, **551**, (2005), 168-176.
- [138] L. Verzegnassi, M.-C. Savoy-Perroud, R. H. Stadler; *Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey*. Journal of Chromatography A, **977**, (2002), 77-87.
- [139] S. Ye, Z. Yao, G. Na, J. Wang, D. Ma; *Rapid simultaneous determination of 14 sulfonamides in wastewater by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. J. Sep. Sci., **30**, (2007), 1-11.
- [140] M. Lamshöft, P. Sukul, S. Zühlke, M. Spiteller; *Metabolism of ¹⁴C-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs*. Anal. Bioanal. Chem., **388**, (2007), 1733-1745.
- [141] T. Pfeifer, J. Tuerk, K. Bester, M. Spiteller; *Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry*. Rapid. Commun. Mass Spectrom., **16**, (2002), 663-669.

- [142] G. Balizs, L. Benesch-Girke, S. BijrneC, S.A. Hewittb; *Comparison of the determination of four sulphonamides and their N⁴-acetyl metabolites in swine muscle tissue using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectral detection.* Journal of Chromatography B, **661**, (1994), 75-84.
- [143] V. Ascalone; *Assay of trimethoprim, sulfadiazine and its N⁴-acetyl metabolite in biological fluids by normal-phase high-performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography, **224**, (1981), 59-66.
- [144] V. K. Balakrishnan, K. A. Terry, J. Toito; *Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods.* Journal of Chromatography A, **1131**, (2006), 1-10.
- [145] N. Furusawa, T. Mukai; *Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of residual sulphamonomethoxine, sulphadimethoxine and their N⁴-acetyl metabolites in foods of animal origin.* Journal of Chromatography A, **677**, (1994), 81-85.
- [146] R. Gochin, I. Kanfer, J. M. Haigh; *Simultaneous determination of trimethoprim, sulphamethoxazole and N⁴-acetyl sulphamethoxazole in serum and urine by high-performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography. **223**, (1981), 139-145.
- [147] O. Gyllenhaal, B. Näslund, P. Hartvig; *Electron-capture gas chromatography of sulphapyridine and its N⁴-acetyl metabolite in serum after extractive methylation.* Journal of Chromatography, **156** (1978) 330-334.
- [148] D. Von Baer, A. Momberg, M. E. Carrera, R. Arriagadat, M. R. Smyths; *Liquid chromatography with amperometric detection of some sulphonamides and their N⁴-acetylmetabolites in serum and urine.* Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, **9(10-12)**, (1991), 925-928.
- [149] G. Font, A. Juan-García, Y. Picó; *Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis-mass spectrometry as an improved methodology for the determination of sulfonamide residues in meat.* Journal of Chromatography A, **1159**, (2007), 233-241.
- [150] J. Sherma, W. Bretschneider, M. Dittamo, N. DiBiase D. Huh; *Spectrometric and thin-layer chromatographic quantification of sulfathiazole residues in honey.* Journal of Chromatography, **463**, (1989), 229-233.
- [151] K. E. Maudens, G.-F. Zhang, W. E. Lambert; *Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection.* Journal of Chromatography A, **1047**, (2004), 85-92.
- [152] H. B. Sheth, V. A. Yaylayan, N. H. Low, M. E. Stiles, P. Sporns; *Reaction of reducing sugars with sulfathiazole and importance of this reaction to sulfonamide residue analysis using chromatographic, colorimetric, microbiological, or ELISA methods.* J. Agric. Food Chem., **38**, (1990), 1125-1130.
- [153] R. Mohamed, Y.-A. Hammel, M.-H. LeBreton, J.-C. Tabet, L. Jullien, P. A. Guy; *Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques.* Journal of Chromatography A, **1160**, (2007), 194-205.
- [154] 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, **807**, (2004), 343-356.

- [155] 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*, **529**, (2005), 257–263.
- [156] A. Kaufmann, P. Butcher; *Quantitative liquid chromatography/tandem mass-spectrometry determination of chloramphenicol residues in food using sub-2mm particulate high-performance liquid chromatography columns for sensitivity and speed*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, (2005), 3694-3700.
- [157] H. T. Rønning, K. Einarsen, T. N. Asp; *Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC*. *Journal of Chromatography A*, **1118**, (2006), 226-233.
- [158] C. Schirmer, H. Meisel; *Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the selective solid-phase extraction of chloramphenicol from honey*. *Journal of Chromatography A*, **1132**, (2006), 325-328.
- [159] R. Sheridan, B. Policastro, S. Thomas, D. Rice; *Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis*. *J. Agric. Food Chem.*, **5**, (2008), 3509-3516.
- [160] K. Vivekanandan, M. G. Swamy, S. Prasad, R. Mukherjee; *A simple method of isolation of chloramphenicol in honey and its estimation by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, (2005), 3025-3030.
- [161] H. M. Ashwin, S. L. Stead, J. C. Taylor, J. R. Startin, S. F. Richmond, V. Homer, T. Bigwood, M. Sharman; *Development and validation of screening and confirmatory methods for the detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide using SPR biosensor and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, **529**, (2005), 103-108.
- [162] L. Rodziewicz, I. Zawadzka; *Rapid determination of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry and the validation of method based on 2002/657/EC*. *APIACTA*, **42**, (2007), 25-30.
- [163] Verzegnassi L., Royer D., Mottier P. *Analysis of chloramphenicol in honeys of different geographical origin by liquid chromatographic coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Food Addit. Contam.*, **20**, (2003), 335-342.
- [164] 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*, **535**, (2005), 43-48.
- [165] B. Boyd, H. Björk, J. Billing, O. Shimelis, S. Axelsson, M. Leonora, E. Yilmaz; *Development of an improved method for trace analysis of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers*. *Journal of Chromatography A*, **1174**, (2007), 63-71.
- [166] S. Weigel, R. Gatermann, W. Harder; *Screening of honey for residues of antibiotics by an optical sensor*. *Apiacta*, **40**, (2005), 63-69.
- [167] K.-P. Raezke; *Direct determination of antibiotics in honey through SPE-LC-coupling*. *GIT Labor-Fachzeitschrift*, **9**, (2000), 1021-1022, 1024.
- [168] R. Draisci, L. Giannetti, L. Lucentini, L. Palleschi, G. Brambilla, L. Serpe, P. Gallo; *Determination of nitrofurans residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, **777**, (1997), 201-211.

- [169] J. K. Finzi, J. L. Donato, M. Sucupira, G. de Nucci; *Determination of nitrofuran metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, **824**, (2005) 30-35
- [170] J. J. Laurensen, J. F. M. Nouws; *Simultaneous determination of nitrofuran derivatives in various animal substrates by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography, **472**, (1989), 321-326.
- [171] A. S. Pereira, L. C. Pampana, J. L. Donato, G. de Nucci; *Analysis of nitrofuran metabolic residues in salt by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, **514**, (2004), 9-13.
- [172] S. Szilagyi, B. de la Calle; *Development and validation of an analytical method for the determination of semicarbazide in fresh egg and in egg powder based on the use of liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, **572**, (2006), 113-120.
- [173] P. Mottier, S.-P. Khong, E. Gremaud, J. Richoz, T. Delatour, T. Goldmann, P. A. Guy; *Quantitative determination of four nitrofuran metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1067**, (2005), 85-91.
- [174] T. G. Díaz, A. G. Cabanillos, M. I. A. Valenzuela, C. A. Correa, F. Salinas; *Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. Journal of Chromatography A, **764**, (1997), 243-248.
- [175] K. M. Cooper, J. V. Samsonova, L. Plumpton, C. T. Elliott, D. Glenn Kennedy; *Enzyme immunoassay for semicarbazide-The nitrofuran metabolite and food contaminant*. Analytica Chimica Acta, **592**, (2007) 64-71.
- [176] M. M. L. Aerts, W. M. J. Beek; *On-Line combination of dialysis and column-switching liquid-chromatography as a fully automated sample preparation technique for biological samples determination of nitrofuran residues in edible products*. Journal of Chromatography, **500**, (1990), 453-468.
- [177] R. Nagel, A. Chan; *Mistranslation and genetic variability The effect of streptomycin*. Mutation Research, **601**, (2006), 162-170.
- [178] P. Viñas, N. Balsalobre, M. Hernández-Córdoba; *Liquid chromatography on an amide stationary phase with post-column derivatization and fluorimetric detection for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in foods*. Talanta, **72(2)**, (2007), 808-812.
- [179] J. M. Serrano, M. Silva; *Rapid and sensitive determination of aminoglycoside antibiotics in water samples using a strong cation-exchange chromatography non-derivatization method with chemiluminescence detection*. Journal of Chromatography A, **1117**, (2006), 176-183.
- [180] P. Edder, A. Cominoli, C. Corvi; *Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection*. Journal of Chromatography A, **830**, (1999), 345-351.
- [181] E. G. Galanakis, N. C. Megoulas, P. Solich, M. A. Koupparis; *Development and validation of a novel LC non-derivatization method for the determination of amikacin in pharmaceuticals based on evaporative light scattering detection*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **40**, (2006), 1114-1120.
- [182] A. K. Sarri, N. C. Megoulas, M. A. Koupparis; *Development of a novel method based on liquid chromatography–evaporative light scattering detection for the direct determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in raw materials, pharmaceutical formulations, culture media and plasma*. Journal of Chromatography A, **1122**, (2006), 275-278.

- [183] P. Penido Maia, J. Amaya-Farfán, S. Rath, F. G. Reyes; *Simultaneous determination of streptomycin and oxytetracycline in agricultural antimicrobials by CZE after an experimental design*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **43(2)**, (2007), 450-456.
- [184] Y. Bang-Ce, L. Songyang, Z. Peng, L. Xiao-hong; *Simultaneous detection of sulfamethazine, streptomycin, and tylosin in milk by microplate-array based SMM-FIA*. Food Chemistry, **106**, (2008), 797-803.
- [185] D. Löffler, T. A. Ternes; *Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1000**, (2003), 583-588.
- [186] M. X. Guo, L. Wrisley, E. Maygoo; *Measurement of tobramycin by reversed-phase high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection*. Analytica Chimica Acta, **571**, (2006), 12-16.
- [187] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, A. Laganá, M. Mele, M. Nazzari; *Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography – tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1067** (2005) 93-100.
- [188] O. Granados, G. Meza; *A direct HPLC method to estimate streptomycin and its putative ototoxic derivative, streptidine, in blood serum: Application to streptomycin-treated humans*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **43(2)**, (2007), 625–630.
- [189] C.-Y. Lu, C.-H. Feng; *Micro-scale analysis of aminoglycoside antibiotics in human plasma by capillary liquid chromatography and nanospray tandem mass spectrometry with column switching*. Journal of Chromatography A, **1156**, (2007) 249-253.
- [190] M. Van Bruijnsvoort, S. J. M. Ottink, K. M. Jonker: E. de Boer; *Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1058**, (2004), 137-142.
- [191] L. G. McLaughlin, J. D. Henion; *Determination of aminoglycoside antibiotics by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography coupled with pulsed amperometry and ion spray mass spectrometry*. Journal of Chromatography, **591**, (1992), 195-206.
- [192] R. Oertel, U. Renner, W. Kirch; *Determination of neomycin by LC-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **35**, (2004), 633-638.
- [193] H. Achenbach, W. Karl; *Massenspektrometrische Untersuchungsmethoden zur Strukturaufklärung von Makrolid-Antibiotika*. Chem. Ber., **108**, (1975), 772-779.
- [194] J. Wang, D. Leung; *Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, **21**, (2007), 3213-322
- [195] S. Abuin, R. Codony, R. Compañó, M. Granados, M. D. Prat; *Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1114**, (2006), 73-81.
- [196] C. Benetti, N. Dainese, G. Biancotto, R. Piro, F. Mutinelli; *Unauthorised antibiotic treatments in beekeeping. Development and validation of a method to quantify and confirm tylosin residues in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection*. Analytica Chimica Acta, **520**, (2004) 87-92.

- [197] H. Berrada, F. Borrull, G. Font, J. C. Moltó, R. M. Marcé; *Validation of a confirmatory method for the determination of macrolides in liver and kidney animal tissues in accordance with the European Union regulation 2002/657/EC*. Journal of Chromatography A, **1157**, (2007), 281-288.
- [198] S. K. Chitneni, C. Govaerts, E. Adams, A. van Schepdael, J. Hoogmartens; *Identification of impurities in erythromycin by liquid chromatography-mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, **1056**, (2004), 111-120.
- [199] M. J. G. de la Huebra, U. Vincent, G. Bordin, A. R. Rodríguez; *Characterisation of dirithromycin and spiramycin using high performance liquid chromatography and direct infusion mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, **503**, (2004), 247-256.
- [200] G. Hamscher, S. Limsuwan, N. Tansakul, M. Kietzmann; *Quantitative analysis of tylosin in eggs by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry: residue depletion kinetics after administration via feed and drinking water in laying hens*. J. Agric. Food Chem., **54(24)**, (2006), 9017-9023.
- [201] M. Hu, C.-Q. Hu; *Identification of the components of 16-membered macrolide antibiotics by LC/MS*. Analytica Chimica Acta, **535**, (2005), 89-99.
- [202] M. J. N. Nalda, J. L. B. Yagüe, M. T. M. Gómez, J. J. J. Sevilla, J. B. del Nozal, M. H. Pascual; *Trace analysis of antibacterial tylosin A, B, C and D in honey by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry*. J. Sep. Sci., **29**, (2006), 405-413.
- [203] E. Scheuch, J. Spieker, M. Venner, W. Siegmund; *Quantitative determination of the macrolide antibiotic tulathromycin in plasma and broncho-alveolar cells of foals using tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, **850**, (2007), 464-470.
- [204] T. S. Thompson, D. K. Noot, J. Calvert, S. F. Pernal; *Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1020**, (2003), 241-250.
- [205] T. S. Thompson, S. F. Pernal, D. K. Noot, A. P. Melathopoulos, J. P. van den Heever; *Degradation of incurred tylosin to desmycosin-Implications for residue analysis of honey*. Analytica Chimica Acta, **586**, (2007), 304-311.
- [206] D. A. Volmer, J. P. M. Hui; *Study of erythromycin A decomposition products in aqueous solution by solid-phase microextraction/liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, **12**, (1998), 123-129.
- [207] J. Wang; *Determination of five macrolide antibiotic residues in honey by LC-ESI-MS and LC-ESI-MS/MS*. J. Agric. Food Chem., **52**, (2004), 171-181.
- [208] C. Leal, R. Codony, R. Compañó, M. Granados, M. D. Prat; *Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, **910**, (2001), 285-290.
- [209] S. Yang, K. H. Carlson; *Solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices*. Journal of Chromatography A, **1038**, (2004), 141-155.
- [210] M. Skinner, R. B. Taylor, I. Kanfer; *The pH-stability and acid degradation of the macrolide antibiotic Josamycin*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, **1**, (1993), 61-72.
- [211] Y.-H. Kim, T. M. Heinze, R. Begger, J. V. Pothuluri, C. E. Cerniglia; *A kinetic study on the degradation of erythromycin A in aqueous solution*. International Journal of Pharmaceutics, **271**, (2004), 63-76.

- [212] X. Shi, S. Zhang, J. P. Fawcett, D. Zhong; *Acid catalysed degradation of some spiramycin derivatives found in the antibiotic bitespiramycin*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **36**, (2004), 593-600.
- [213] J. I. D. Wibawa, P. N. Shaw, D. A. Barrett; *Quantification of clarithromycin, its 14-hydroxy and decladinose metabolites in rat plasma, gastric juice and gastric tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. Journal of Chromatography B, **783**, (2003), 359-366.
- [214] M. J. G. de la Huebra, G. Bordin, A. R. Rodríguez; *A multiresidue method for the simultaneous determination of ten macrolide antibiotics in human urine based on gradient elution liquid chromatography coupled to coulometric detection (HPLC-ECD)*. Analytica Chimica Acta, **517**, (2004), 53-63.
- [215] K. Tobback, Y.-M. Li, N. Alberto Pizarro, I. de Smedt, T. Smeets, A. van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens; *Micellar electrokinetic capillary chromatography of macrolide antibiotics – Separation of tylosin, erythromycin and their related substances*. J. Chromatogr. A, **857**, (1999), 313-320.
- [216] J. Paesen, K. Khan, E. Roets, J. Hoogmartens; *Study of the stability of erythromycin in neutral and alkaline solutions by liquid chromatography on poly(styrene-divinylbenzene)*. International Journal of Pharmaceutics, **113**, (1994), 215-222.
- [217] J. Paesen, E. Roets, J. Hoogmartens; *Study of the stability of erythromycin in a hydrophilic crème basis by liquid chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **17**, (1998), 53-56.
- [218] P. Kurath, P. H. Jones, R.S. Egan, T. J. Perun. *Acid degradation of erythromycin A and erythromycin B*. Scientific Divisions, Abbott Laboratories, North Chicago (Illinois 60064, USA), Experientia **27(4)** (1970) 362.
- [219] J. Burhenne, M. Ludwig, M. Spittler; *Polar photodegradation products of quinolones determined by HPLC/MS/MS*. Chemosphere, **38(6)**, (1999), 1279-1286.
- [220] M. Clemente, M.P. Hermo, D. Barrón, J. Barbosa; *Confirmatory and quantitative analysis using experimental design for the extraction and liquid chromatography–UV, liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry determination of quinolones in turkey muscle*. Journal of Chromatography A, **1135**, (2006), 170-178.
- [221] M. Lolo, S. Pedreira, C. Fente, B. I. Vázquez, C. M. Franco, A. Cepeda; *Study of enrofloxacin depletion in the eggs of laying hens using diphasic dialysis extraction/purification and determinative HPLC-MS analysis*. J. Agric. Food Chem., **53**, (2005), 2849-2852.
- [222] O. Ballesteros, V. Sanz-Nebot, A. Navalón, J. L. Vilchez, J. Barbosa; *Determination of a series of quinolone antibiotic using liquid chromatography-mass-spectrometry*. Chromatographia, **59(9/10)**, (2004), 543-550.
- [223] N. Van Hoof, K. De Wasch, L. Okerman, W. Reybroeck, S. Poelmans, H. Noppe, H. De Brabander; *Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products*. Analytica Chimica Acta, **529**, (2005), 265-272.
- [224] B. Toussaint, M. Chedin, G. Bordin, A. R. Rodriguez; *Determination of (fluoro)quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry I. Laboratory-validated method*. Journal of Chromatography A, **1088**, (2005) 40-48.
- [225] N. M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg; *Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection*. Journal of Chromatography A, **1134**, (2006), 101-111.

- [226] S. Herranz, M. C. Moreno-Bondi, M. D. Marazuela; *Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluorquinolone residues in table eggs*. Journal of Chromatography A, **1140**, (2007), 63-70.
- [227] M. I. Pascual-Reguera, G. Perez Parras, A. M. Diaz; *Solid-phase UV spectrophotometric method for determination of ciprofloxacin*. Microchemical Journal, **77**, (2004), 79-84.
- [228] M. J. Schneider, S. E. Braden, I. Reyes-Herrera, D. J. Donoghue; *Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection*. Journal of Chromatography B, **846**, (2007), 8-13.
- [229] P. Schmitt-Kopplin, J. Burhenne, D. Freitag, M. Spiteller, A. Kettrup; *Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase*. Journal of Chromatography A, **837**, (1999), 253-265.
- [230] P. Mottier, Y.-A. Hammel, E. Gremaud, P. A. Guy; *Quantitative high-throughput analysis of 16 (fluoro)quinolones in honey using automated extraction by turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem., **56** (1), (2008), 35-43.
- [231] Z. Qiang, C. Adams; *Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK_a) for human and veterinary antibiotics*. Water Research, **38**, (2004), 2874-2890.
- [232] S. Mithra; *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Chemical Analysis 162; John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, (2003); 56ff; <http://books.google.de/books?id=yk1RZ9HD6hcC&pg=PT77&lpg=PT77&dq=2+ph+un+it+rule&source=bl&ots=tyO#v=onepage&q=&f=false>; letzter Zugriff am 30.01.2010.
- [233] Y. Alnouti, K. Srinivasan, D. Waddell, H. Bi, O. Kavetskaia, A. I Gusev; *Development and application of a new on-line SPE system combined with LC-MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma*. Journal of Chromatography A, **1080**, (2005) 99-106.
- [234] N. Ansermot, M. Fathi, J.-L. Veuthey, J. Desmeules, D. Hochstrasser, S. Rudaz; *Quantification of cyclosporine A in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry using a column-switching approach*. Journal of Chromatography B, **857**(1), (2007), 92-99.
- [235] K.-J. Choi, S.-G. Kim, C.-W. Kim, S.-H. Kim; *Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD*. Chemosphere, **66**, (2007), 977-984.
- [236] J. Feitosa-Felizzola, B. Temime, S. Chiron; *Evaluating on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of several classes of antibiotics in urban wastewaters*. Journal of Chromatography A, **1164**, (2007), 95-104.
- [237] F. Hernández, J. V. Sancho, O. Pozo, A. Lara, E. Pitarch; *Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub-mg/l level by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **939**, (2001), 1-11.
- [238] M. E. Koivunen., K. Dettmer, R. Vermeulen, B. Bakke, S. J. Gees, B. D. Hammock; *Improved methods for urinary atrazine mercapturate analysis-Assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a novel liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method utilizing online solid phase extraction (SPE)*. Analytica Chimica Acta, **572**, (2006), 180-189.
- [239] M. Papagiannopoulos, B. Zimmermann, A. Mellenthin, M. Krappe, G. Maioc, R. Galensa; *Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and*

- high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt.* Journal of Chromatography A, **958**, (2002), 9-16.
- [240] P Sadílek, D Šatínský, P. Solich; *Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices.* Trends in Analytical Chemistry, **26(5)**, (2007), 375-384.
- [241] A. Salvador, C. Moretton, A. Piram, R. Faure; *On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants.* Journal of Chromatography A, **1145**, (2007), 102-109.
- [242] K. Stoob, H. P. Singer, C. W. Goetz, M. Ruff, S. R. Mueller. *Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters.* Journal of Chromatography A, **1097**, (2005), 138-147.
- [243] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah; *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization.* J Am Soc Mass Spectrom, **11**, (2000), 942-950.
- [244] J. F. de la Mora, G. J. van Berkel, C. G. Enke, R. B. Cole, M. Martinez-Sanchez, J. B. Fenn; *Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry.* J. Mass Spectrom., **35**, (2000), 939-952.
- [245] S. J. Gaskell; *Electrospray: Principles and practice.* J. Mass Spectrom., **32**, (1997), 677-688.
- [246] P. Kebarle; *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry.* J. Mass Spectrom., **35**, (2000), 804-817.
- [247] R: E. March; *An Introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry.* J. Mass Spectrom., **32**, (1997), 351-369.
- [248] Z. Tozuka, H. Kaneko, T. Shiraga, Y. Mitani, M. Beppu, S. Terashita, A. Kawamura, A. Kagayama; *Strategy for structural elucidation of drugs and drug metabolites using (MS)ⁿ fragmentation in an electrospray ion trap.* J. Mass Spectrom., **38**, (2003), 793-808.
- [249] R. Willoughby, E. Sheeshan, S. Mitrovich; *A global view of LC/MS. How to solve your most challenging analytical problems.* Global View Publishing Pittsburgh, (2002).
- [250] J.-P. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. de Brabander, F. Andre, B. le Bizec; *The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis.* Analytica Chimica Acta, **529**, (2005), 129-136.
- [251] P. J. Larger, M. Breda, D. Fraier, H. Hughes, C. A. James. *Ion-suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry due to a formulation agent, a case study in drug discovery bioanalysis.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **39**, (2005), 206-216.
- [252] R. Bakhtiar, T. K. Majumdar; *Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological fluids using liquid chromatography-mass spectrometry.* Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, **55**, (2007), 262-278.
- [253] E. Chambers, D. M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J. R. Mazzeo; *Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses.* Journal of Chromatography B, **852**, (2007), 22–34.

- [254] A. Kloefer, J. B. Quintana, T. Reemtsma; *Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples*. Journal of Chromatography A, **1067**, (2005), 153-160.
- [255] E. Rogatsky, D. Stein; *Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: New parameters for validation of method development*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., **16**, (2005), 1757-1759.
- [256] M. Stüber, T. Reemtsma; *Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS*. Anal Bioanal Chem, **378**, (2004), 910-916.
- [257] J. Hajšlová, J. Zrostlíková; *Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices*. Journal of Chromatography A, **1000**, (2003), 181-197.
- [258] E. Peré-Trepat, S. Lacorte, R. Tauler; *Alternative calibration approaches for LC-MS quantitative determination of coeluted compounds in complex environmental mixtures using multivariate curve resolution*. Analytica Chimica Acta, **595**, (2007), 228–237.
- [259] R. Lindberg, P.-A. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson, M. Tysklind; *Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards*. Chemosphere, **57**, (2004), 1479-1488.
- [260] R. Hirsch, T. A. Ternes, K. Haberer, A. Mehlich, F. Ballwanz, K.-L. Kratz; *Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **815**, (1998), 213-223.
- [261] W. M. A. Niessen; *Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass Spectrometry*. Journal of Chromatography A, **812**, (1998), 53-75.
- [262] A. L. Batt, D. S. Aga; *Simultaneous Analysis of Multiple Classes of Antibiotics by Ion Trap LC/MS/MS for Assessing Surface Water and Groundwater Contamination*. Analytical Chemistry, **77(9)**, (2005), 2940-2947.
- [263] M. J. Gómez, M. Petrović, A. R. Fernández-Alba, D. Barceló; *Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters*. Journal of Chromatography A, **1114**, (2006), 224-233.
- [264] K. Granelli, C. Branzell; *Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, **586**, (2007), 289-295.
- [265] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló; *Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters*. Talanta, **70**, (2006), 678-690.
- [266] A. M. Jacobsen, B. Halling-Sørensen, F. Ingerslev, S. H. Hansen; *Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **1038**, (2004), 157-170.
- [267] W. Heering, E. Usleber, R. Dietrich, E. Märtlbauer; *Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey*. Analyst, **123**, (1998), 2759-2762.
- [268] F. Hernández, J. V. Sancho, M. Ibáñez, C. Guerrero; *Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS*. Trends in Analytical Chemistry, **26(6)**, (2007), 466-485.

- [269] M. D. Hernando, M. Mezcuua, J.M. Suárez-Barcena, A. R. Fernández-Alba; *Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutant residues in salmon*. *Analytica Chimica Acta*, **562**, (2006) 176-184.
- [270] U. Koesukwiwat, S. Jayanta, N. Leepipatpiboon; *Validation of a liquid chromatography–mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk*. *Journal of Chromatography A*, **1140**, (2007), 147-156.
- [271] J.-B. Lee, H.-H. Chung, Y.-H. Chung, K.-G. Lee; *Development of an analytical protocol for detecting antibiotic residues in various foods*. *Food Chemistry* **105(4)**, (2007), 1726–1731.
- [272] J. Morgan, M. E. Joyce-Menekse, R. T. Rowlands, I. H. Gilbert, D. Lloyd; *Rapid and sensitive quantitation of antibiotics in fermentations by electrospray mass spectrometry*. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **15**, (2001), 1229-1238.
- [273] Y. P. Patel, N. Shah, I. C. Bhoir, M. Sundaresan; *Simultaneous determination of five antibiotics by ion-pair high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, **828**, (1998) 287-290.
- [274] R. Romero-González, J. C. López-Martínez, E. Gómez-Milán, A. Garrido-Frenich, J. L. Martínez-Vidal; *Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in gilthead seabream (*Sparus Aurata*) by liquid chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B*, **857**, (2007), 142-148.
- [275] J. Tuerk, M. Reinders, D. Dreyer, T. K. Kiffmeyer, K. G. Schmidt, H.-M. Kuss; *Analysis of antibiotics in urine and wipe samples from environmental and biological monitoring-Comparison of HPLC with UV-, single MS- and tandem MS-detection*. *Journal of Chromatography B*, **831**, (2006), 72-80.
- [276] S. Yang, J. Cha, K. Carlson; *Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, **1097**, (2005), 40-53.
- [277] Y. Bang-Ce, L. Songyang, Z. Peng, L. Xiao-hong; *Simultaneous detection of sulfamethazine, streptomycin, and Tylosin in milk by microplate-array based SMM-FIA*. *Food Chemistry*, **106**, (2008), 797-803.
- [278] W. Ben, Z. Qiang, C. Adams, H. Zhang, L. Chen; *Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, **1202**, (2008), 173-180.
- [279] M. Petrović, M. D. Hernando, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló; *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review*. *Journal of Chromatography A*, **1067**, (2005), 1-14.
- [280] Diplomarbeit Mareike Busse; *Entwicklung eines Online-SPE-LC-MS Verfahrens zur Bestimmung von Sulfonamiden in Honig*. Universität Paderborn, Anorganische und Analytische Chemie, (2007).
- [281] Diplomarbeit Manuel Ewe; *Untersuchungen zur extrahierbarkeit von Pharmakaspuren aus biologischen Proben*. Universität Paderborn, Anorganische und Analytische Chemie, (2007).
- [282] Phenomenex; *Explore Luna HILIC – Beschreibung*. www.phenomenex.com.
- [283] Pirouette User Manual Version 3.11; Infometrix Inc. Woodinville.
- [284] K .R. Beebe, R. J. Pell, M. B. Seasholtz; *Chemometrics: A practical guide*. Wiley-Interscience (1998).

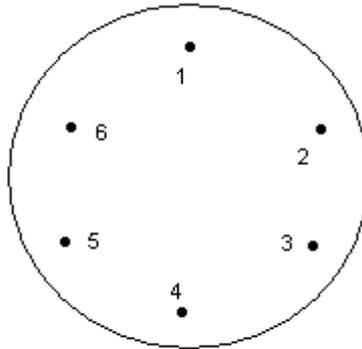
- [285] D. Cozzolino, H. E. Smyth, W. Cynkar, L. Janik, R. G. Damberg, M. Gishena; *Use of direct headspace-mass spectrometry coupled with chemometrics to predict aroma properties in australian riesling wine*. *Analytica Chimica Acta*, **621(1)**, (2008) 2-7.
- [286] A. Espinosa-Mansilla, F. Salinas, I. de Orbe Paya; *Simultaneous determination of sulfadiazine, doxycycline, furaltadone and trimethoprim by partial least squares multivariate calibration*. *Analytica Chimica Acta*, **313**, (1995) 103-112.
- [287] A. Muñoz de la Peña, N. Mora Diez, M. C. Mahedero García, D. Bohoyo Gil, F. Cañada-Cañada; *A chemometric sensor for determining sulphaguanidine residues in honey samples*. *Talanta*, **73(2)**, (2007), 304–313.
- [288] X. Lu, L. Wang, H. Liu, R. Wang, J. Chen; *Studies on the interaction between antibiotics and DNA*. *Talanta*, **73**, (2007), 444-450.
- [289] Y. Ni, L. Zhang, J. Churchill, S. Kokot; *Application of high performance liquid chromatography for the profiling of complex chemical mixtures with the aid of chemometrics*. *Talanta*, **72**, (2007), 1533-1539.
- [290] B. López, M. J. Latorre, M. I. Fernández, M. A. García, S. García, C. Herrero; *Chemometric classification of honeys according to their type based on quality control data*. *Food Chemistry*, **55(3)**, (1996), 281-287.
- [291] M. J. Latorre, R. Peña, C. Pita, A. Botana, S. García, C. Herrero; *Chemometric classification of honeys according to their type. II. Metal content data*. *Food Chemistry*, **66**, (1999), 263-268.
- [292] E. Corbella, D. Cozzolino; *Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics*. *LWT*, **39**, (2006), 534-539.
- [293] J. Lachman, D. Koliňová, D. Miholová, J. Kořata, D. Titěra, K. Kult; *Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality*. *Food Chemistry*, **101**, (2007), 973-979.
- [294] J. Devillers, M. Morlot, M.H. Pham-Delègue, J.C. Doré; *Classification of monofloral honeys based on their quality control data*. *Food Chemistry*, **86**, (2004), 305-312.
- [295] M. J. Nozal, J. L. Bernal, M. L. Toribio, J. C. Diego, A. Ruiz; *Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection*. *Journal of Chromatography A*, **1047**, (2004), 137-146.
- [296] L. P. Oddo, S. Bogdanov; *Determination of honey botanical origin: problems and issues*. *Apidologie*, **35**, (2004), 2-5.
- [297] S. Kromidas; *Validierung in der Analytik*. 1. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (1999).
- [298] Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften; *Entscheidung 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*. (2002/657/EG), 12. August 2002
- [299] Institut für Normung e.V., DIN EN ISO/IEC 17025; *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*. Beuth-Verlag GmbH, Berlin (2005).
- [300] R. W. Stephany; *Guidelines for the implementation of decision 2002/657/EC*. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General SANCO, (2004), 1-15.
- [301] J.-P. Antignac, B. Le Bizec, F. Monteau, F. Andre; *Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the "2002/657/EC" European decision: guideline and application*. *Analytica Chimica Acta*, **483**, (2003), 325-334.

- [302] S. Kromidas; *Handbuch der Validierung in der Analytik*. 1. Auflage, 2. Nachdruck Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (2003).
- [303] W. Funk, V. Dammann, G. Donnervert; *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim (1992).
- [304] K. Doerffel; *Statistik in der analytischen Chemie*. 5. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (1990).
- [305] J. Mandel; *The statistical analysis of experimental data*. Wiley Verlag, New York, (1964).
- [306] Institut für Normung e.V., DIN 32645; *Chemische Analytik Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Ermittlung unter Wiederholbedingungen. Begriffe, Verfahren, Auswertung*. Beuth-Verlag GmbH, Berlin (1996).
- [307] Institut für Normung e.V., DIN 32645; *Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze – Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung*. Entwurf (2006).
- [308] Institut für Normung e.V., DIN ISO 11843-1; *Erkennungsfähigkeit-Teil 1: Begriffe*. Beuth-Verlag GmbH, Berlin (2004).
- [309] S. Kromidas; *Qualität im analytischen Labor*. 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim (1995).
- [310] V. Neitzel; K. Middeke; *Praktische Qualitätssicherung in der Analytik – Ein Leitfaden*. 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim (1994).
- [311] V. Neitzel; *Die Kalibration von Analyseverfahren (Teil1): Lineare Kalibrierfunktionen*. CLB Chemie in Labor und Biotechnik; **53(1)**; (2002), 9-13.
- [312] Institut für Normung e.V., DIN ISO 5725-2; *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen. Teil 2: Grundlegende Methode zur Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichspräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*. Beuth-Verlag GmbH, Berlin (2002).
- [313] A. Kaufmann, P. Butcher, P. Kolbener; *Trace level quantification of streptomycin in honey with liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom., **17**, (2003), 2575-2577.
- [314] R. H. M. M. Granja, A. M. Montes Niño, R. A. M. Zucchetti, R. E. Montes Niño, R. Patel, A. G. Salerno; *Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, **637**, (2009) 64-67.
- [315] W.-X. Zhua, J.-Z. Yang, W. Wei, Y.-F. Liu, S.-S. Zhang; *Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps*. Journal of Chromatography A, **1207**, (2008), 29-37.
- [316] S. Khong, E. Gremaud, J. Richoz, T. Delatour, P.H. Guy, R.H. Stadler, P. Mottier; *Analysis of matrix-bound nitrofurans residues in worldwide-originated honeys by isotope dilution high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem., **52**, (2004), 5309-5315.
- [317] M. I. Lopez, M. F. Feldlauer, A. D. Williams, P.-S. Chu; *Determination and confirmation of nitrofurans residues in honey using LC-MS/MS*. J. Agric. Food Chem., **55(4)**, (2007), 1103-1108.
- [318] B. Casetta, R. Cozzani, A.L. Cinquina, S. Di Marzio; *Sulfamethazine, sulfathiazole and albendazole residue dosage in food products determined by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom., **10(12)**, (1996), 1497-1503.

A Anhang

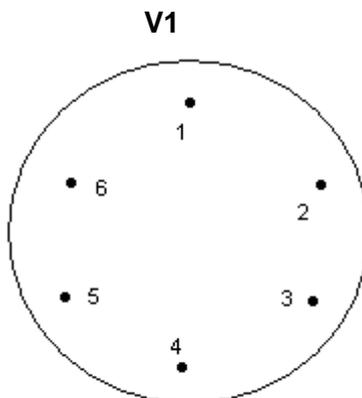
A 1 Online-SPE

Applica SP2000 Modul Einstellungen:



- 1: → 4: Loop
- 2: Nadelspülport
- 3: Waschflüssigkeit (MeOH)
- 5: Pumpe (Pumpe 1) → SP2000 Pumpe
- 6: → SP2000 (4)

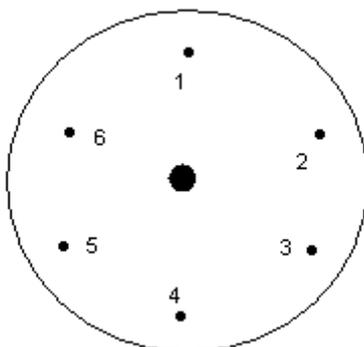
Abb. 89: Anschlüsse des LC-MS Autosamplers (AS1) und Belegung bei Verwenden des SP2000 Online SPE Moduls



- 1: → Pumpe LC (Pumpe 1)
- 2: → HPLC-Säule
- 3: → 6 inklusive SPE-Kartusche
- 4: → Autosampler AS 1 (6)
- 5: → Waste (Abfall)

Abb. 90: Anschlüsse und Belegung des Schaltventils V1 des SP2000 Online SPE Moduls

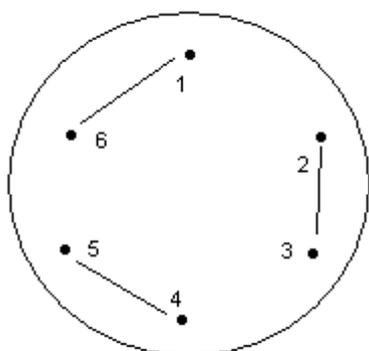
V2



1: Spülflüssigkeit MeOH
 2: Spülflüssigkeit H₂O
 Mitte V2 : LC-Pumpe (Pumpe 1)

Abb. 91: Anschlüsse und Belegung des Schaltventils V2 des SP2000 Online SPE Moduls

Position (1)



Position (0)

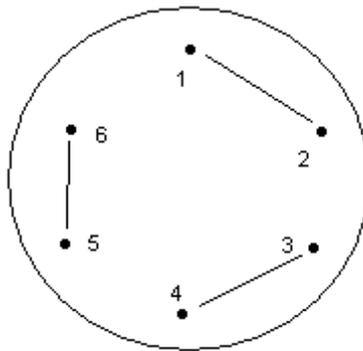


Abb. 92: Positionen des Schaltventils V1 des SP2000 Online SPE Moduls

Tab. 42: Gradientenprogramm des Online-SPE Moduls SP2000 für die Bestimmung von Chloramphenicol; Positionsbeschreibung der Ventile V1 und V2 vgl. Abb. 91,92

Zeit [min]	V1	V2	V3	C	Fluss[mL]
0,01	1	2	0	0	0,40
3,50	0	1	0	0	0,40
8,00	1	1	0	0	0,40
16,00	1	2	0	0	0,40
25,00	1	2	0	0	0,40

V1=0 oder 1

V2=1,2 (1: MeOH, 2: H₂O)

A 2 Probenvorbereitung (SOP)

In diesem Kapitel sind die Fließdiagramme der Standard Operation Procedure (SOP) für die entwickelten Methoden zum Nachweis von Antibiotikarückständen aufgeführt.

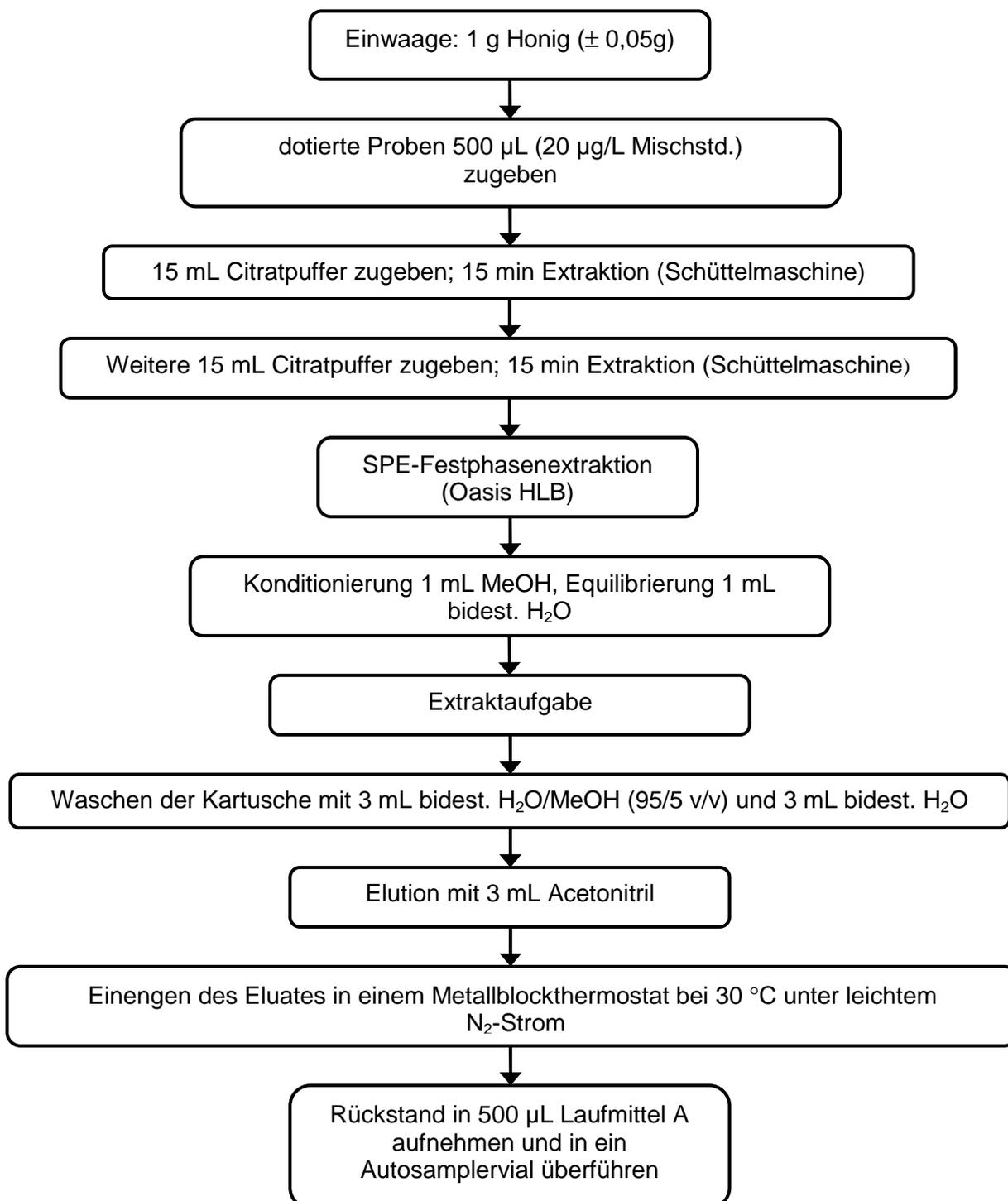
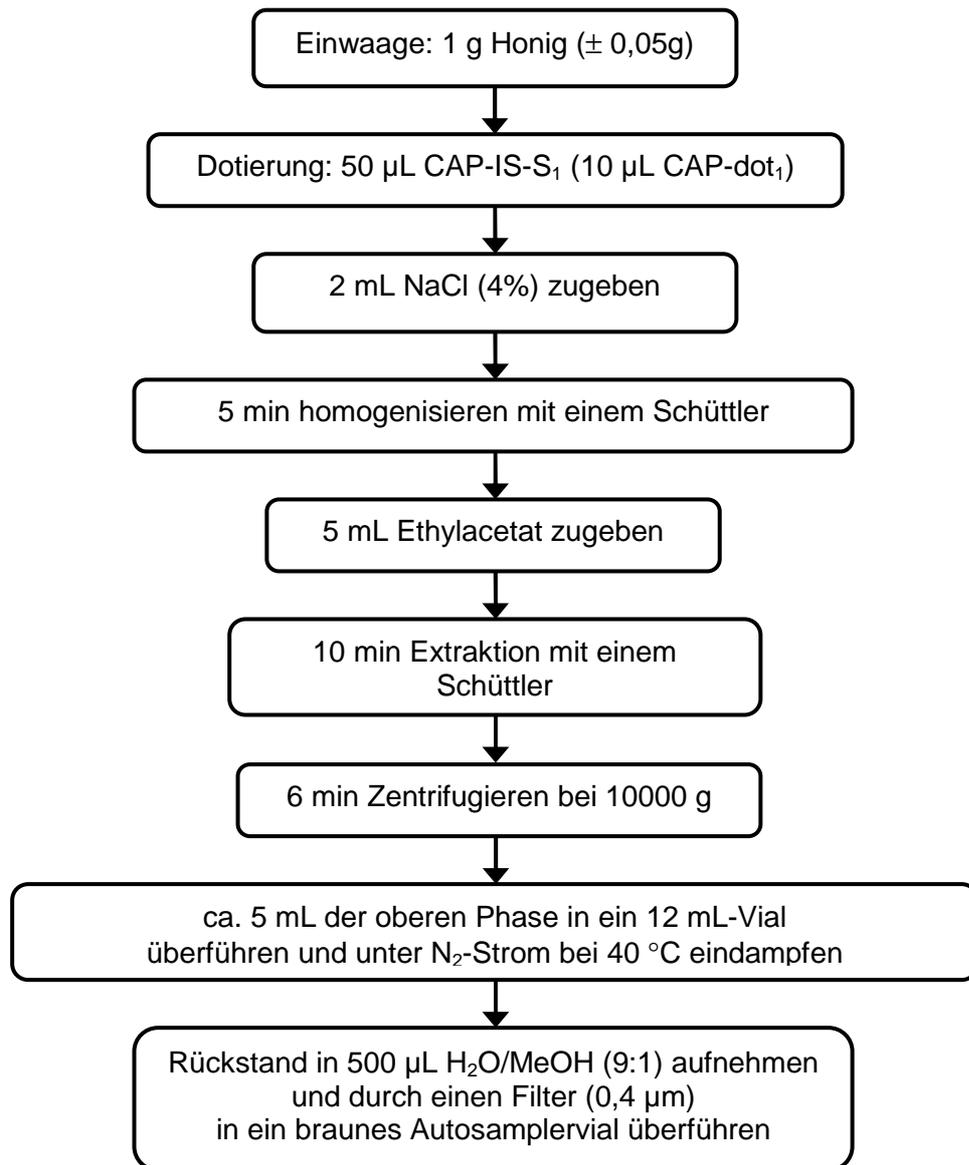
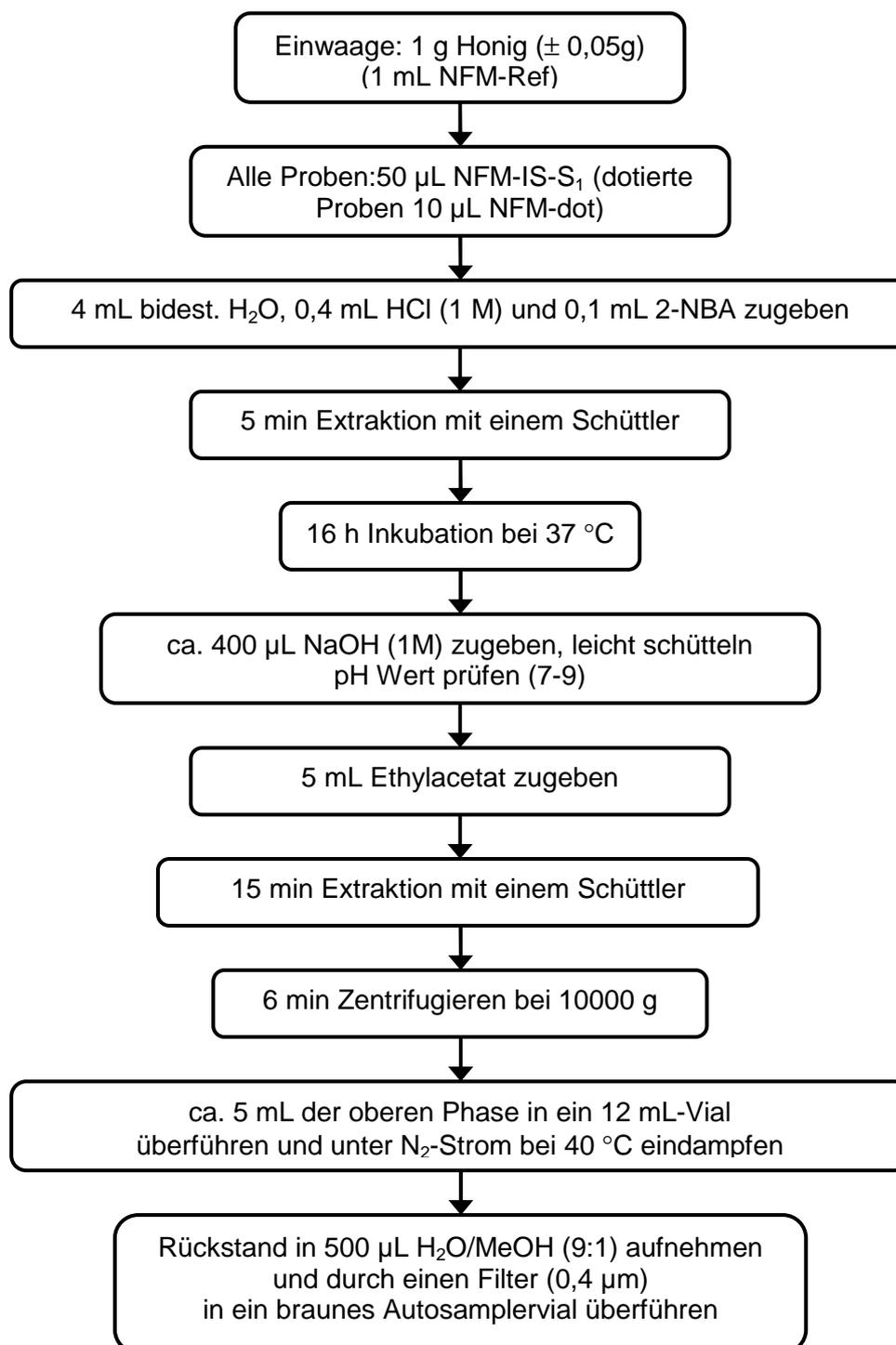


Abb. 93: Fließschema der Probenvorbereitung zur Extraktion der Sulfonamide und Trimethoprim



CAP-IS-S₁: 0,1 mg/L (Interner Standard)
CAP-dot₁: 0,1 mg/L

Abb. 94: Fließschema der Probenvorbereitung zur Extraktion von Chloramphenicol



NFM-IS-S₁: 0,1 mg/L (Interner Standard)
NFM-S₁: 1 mg/L
NFM-dot: 0,1 mg/L
NFM-Ref: 2 $\mu\text{g/L}$ Std. (10 $\mu\text{g/L}$ Istd.)

Abb. 95: Fließschema der Probenvorbereitung zur Extraktion von Nitrofuranmetaboliten

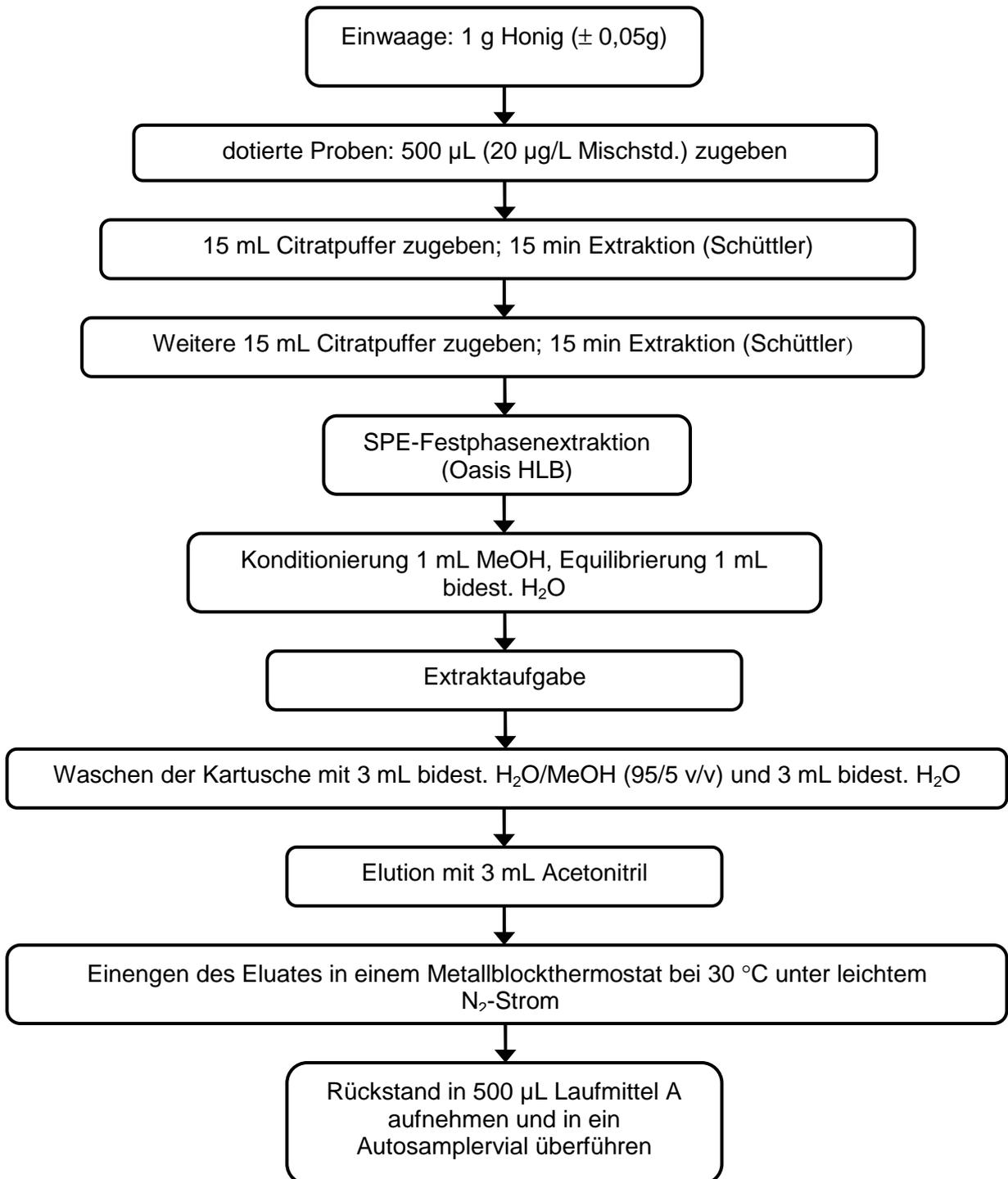


Abb. 96: Fließschema der Probenvorbereitung zur Extraktion der Fluorchinolone

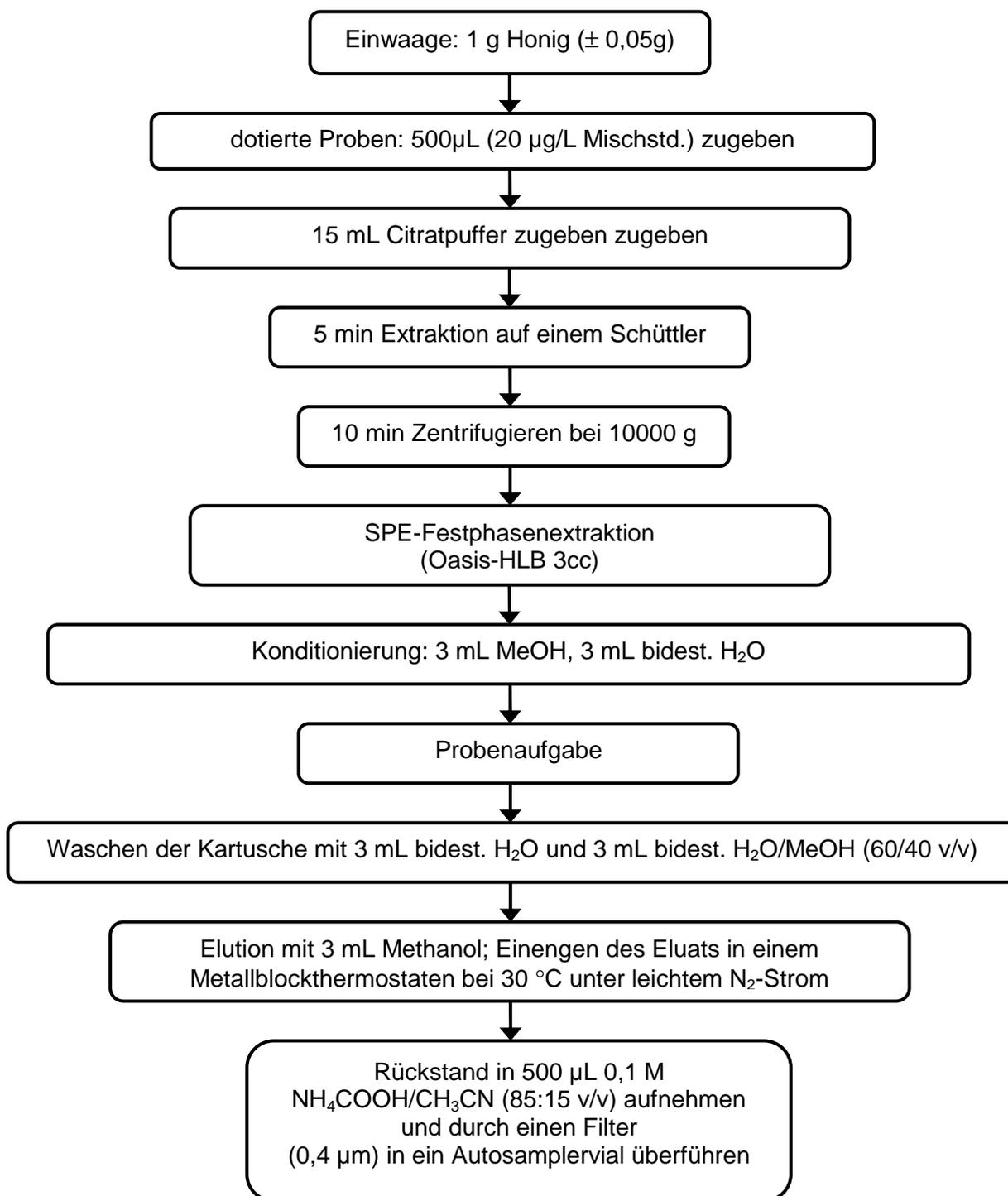


Abb. 97: Fließschema der Probenvorbereitung zur Extraktion der Makrolide

A 3 Validierungsdaten

Die Validierung der Verfahren zum Nachweis von Antibiotikarückständen in Honig wurde exemplarisch anhand des Chlortetracyclins in Kapitel 8.3 dargestellt. Nachfolgend sind die Kalibrationsgeraden, Anpassungstest nach Mandel, Residualanalysen, Verfahrenskennndaten, NWG, BG, cc_α , cc_β und die Wiederfindungsdaten für die anderen Analyten beschrieben.

A 3.1 Kalibration: Gleichungen und Bestimmtheitsmaße

Tab. 43: Tetracycline: Gleichungen der Kalibrationsgeraden 1 Grades und Bestimmtheitsmaße (Arbeitsbereich: 10-100 $\mu\text{g/L}$, 7 Konzentrationsstufen, $n=3$)

Abk.	Funktion 1. Grades $y = a+bx$	R^2
α -Apo-OTC	$y = -1325,0559 + 511,6905x$	0,9991
β -Apo-OTC	$y = -4565,7571 + 656,6554x$	0,9978
ATC	$y = -2685,8127 + 1525,5214x$	0,9992
Epi-ATC	$y = -2937,2548 + 1518,6805x$	0,9996
ACTC	$y = -8990,7036 + 1452,8126x$	0,9977
Epi-ACTC	$y = -10832,9344 + 1367,2485x$	0,9964
DC	$y = -881,3010 + 1586,1191x$	0,9994
Epi-DC	$y = -415,9185 + 2167,2907x$	0,9995
DMC	$y = -579,2603 + 894,2948x$	0,9996
Epi-DMC	$y = -537,0442 + 1054,8793x$	0,9992
CTC	$y = 36,9300 + 434,4200x$	0,9987
Iso-CTC	$y = 819,8086 + 1728,9916x$	0,9996
Epi-Iso-CTC	$y = -432,6777 + 148,8087x$	0,9943
Epi-Enol-CTC	$y = 61,0821 + 420,6810x$	0,9989
Epi-Keto-CTC	$y = 75,5956 + 358,1406x$	0,9984
MeTC	$y = -752,0640 + 1621,1469x$	0,9993
OTC	$y = -102,2403 + 137,8543x$	0,9987
Epi-OTC	$y = -110,0789 + 311,8189x$	0,9988
TC	$y = 552,8937 + 794,8668x$	0,9988
Epi-TC	$y = 1179,7667 + 1000,1747x$	0,9991

Tab. 44: Sulfonamide und Trimethoprim: Gleichungen der Kalibrationsgeraden 1 Grades und Bestimmtheitsmaße (Arbeitsbereich: 10-100 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3)

Abk.	Funktion 1. Grades $y = a+bx$	R^2
SCPD	$y = -45,3561 + 256,3787x$	0,9992
SDD	$y = 19563,6129 + 4485,7905x$	0,9981
SDM	$y = 27643,9907 + 7358,6151x$	0,9985
SDX	$y = 21988,3494 + 2674,9370x$	0,9901
SDZ	$y = 1777,5909 + 560,4240x$	0,9980
SGD	$y = -71,2487 + 108,6442x$	0,9983
SM	$y = 19524,8546 + 3605,4349x$	0,9940
SMZ	$y = 8743,2571 + 2239,3750x$	0,9972
SMOPD	$y = 11120,4768 + 3265,9619x$	0,9948
SMOAZ	$y = 968,3429 + 583,6281x$	0,9990
SMTZ	$y = 12,7287 + 139,5267x$	0,9981
SPD	$y = 13343,4578 + 2769,4379x$	0,9974
STZ	$y = 2565,5954 + 903,5439x$	0,9988
TMP	$y = 39264,2430 + 11746,2734x$	0,9991

Tab. 45: Chloramphenicol: Gleichung der Kalibrationsgerade 1 Grades und Bestimmtheitsmaß (Arbeitsbereich: 1-10 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3)

Abk.	Funktion 1. Grades $y = a+bx$	R^2
CAP	$y = 21384,3545 + 13254,6290x$	0,9262

Tab. 46: Nitrofurantolmetabolite: Gleichungen der Kalibrationsgeraden 1 Grades und Bestimmtheitsmaße (Arbeitsbereich: 1-10 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3)

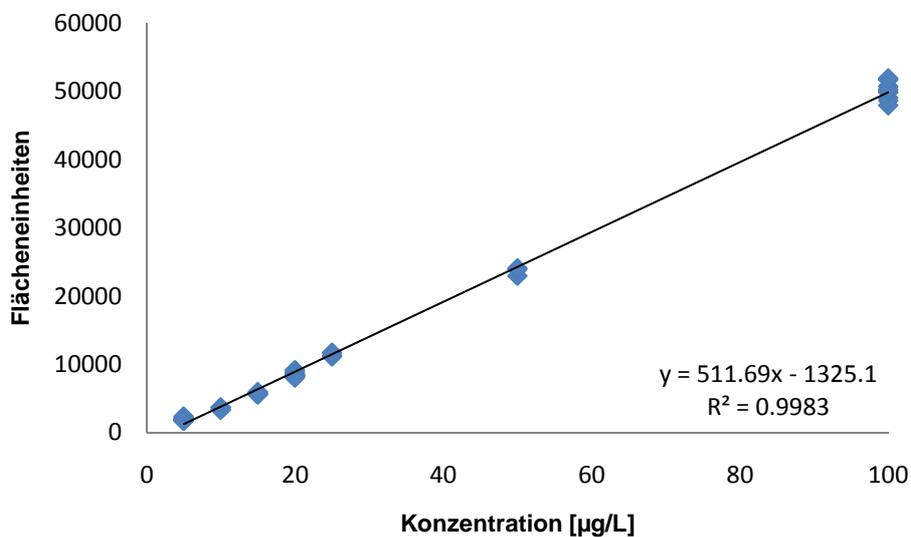
Abk.	Funktion 1. Grades $y = a+bx$	R^2
AHD	$y = 73,0254 + 193,7543x$	0,9906
AMAZ	$y = -22959,7471 + 50756,3473x$	0,9981
AOZ	$y = -820,2180 + 1872,3341x$	0,9972
SEM	$y = 1174509,0408 + 40175,2530x$	0,7639

Tab. 47: Fluorchinolone: Gleichungen der Kalibrationsgeraden 1 Grades und Bestimmtheitsmaße (Arbeitsbereich: 10-100 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3)

Abk.	Funktion 1. Grades $y = a+bx$	R^2
Cip	$y = 683,6715 + 1049,8579x$	0,9994
Dan	$y = 485,5039 + 2283,9689x$	0,9989
Dif	$y = 1055,2544 + 5500,9563x$	0,9996
Enr	$y = 4315,2308 + 7890,3641x$	0,9993
Eno	$y = 2152,5481 + 2328,5503x$	0,9994
Fle	$y = 3663,6778 + 3329,0094x$	0,9992
Lev	$y = 18091,6474 + 7466,6541x$	0,9961
Mar	$y = 3984,2503 + 1584,5997x$	0,9991
Nor	$y = 4574,7485 + 1616,1681x$	0,9990
Sar	$y = 2335,4597 + 2829,5875x$	0,9990
Spa	$y = 11382,9291 + 15838,0051x$	0,9957

A 3.2 Kalibrierfunktionen

Tetracycline:

**Abb. 98:** Kalibrierfunktion: α-Apo-Oxytetracyclin

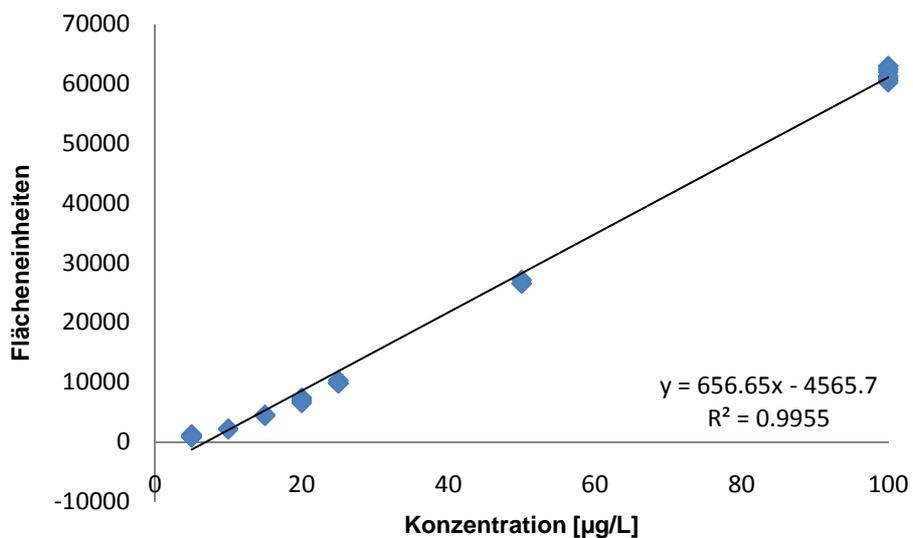


Abb. 99: Kalibrierfunktion: β -Apo-Oxytetracyclin

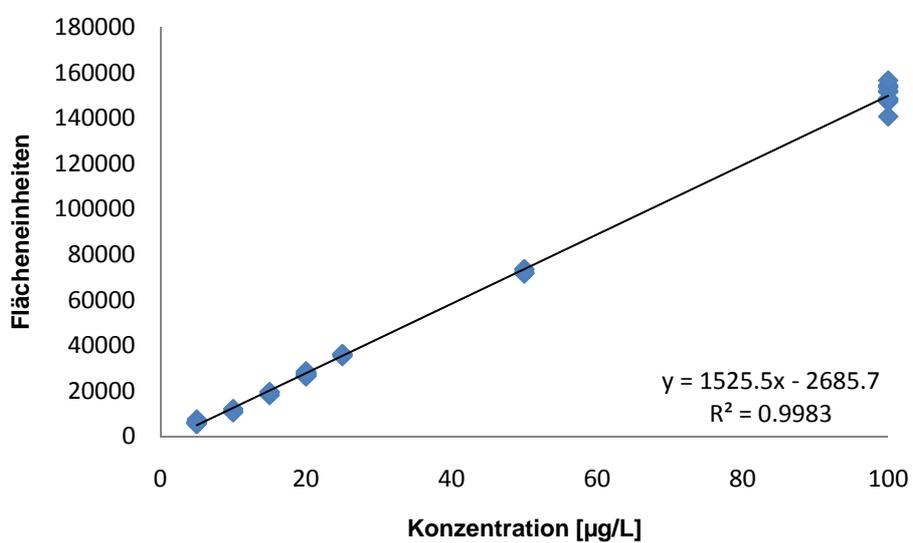


Abb. 100: Kalibrierfunktion: Anhydrotetracyclin

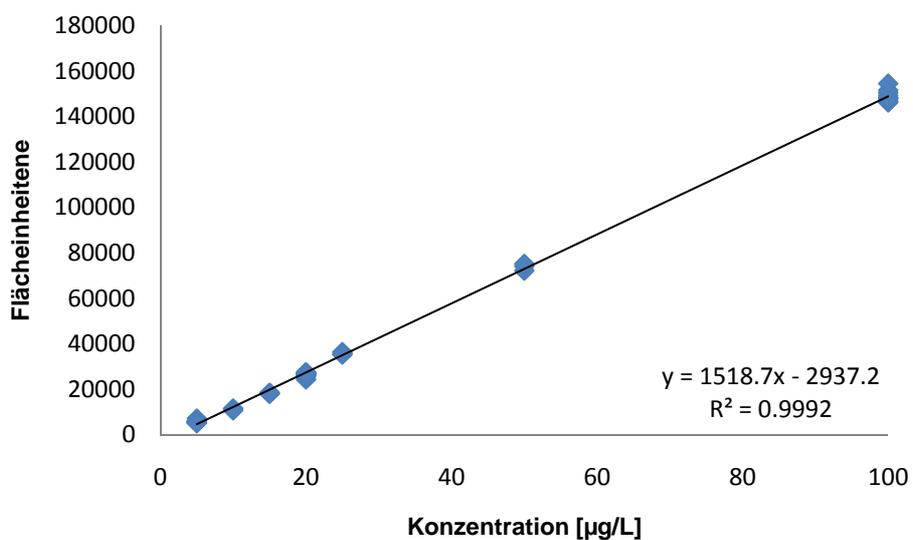


Abb. 101: Kalibrierfunktion: Epi-Anhydrotetracyclin

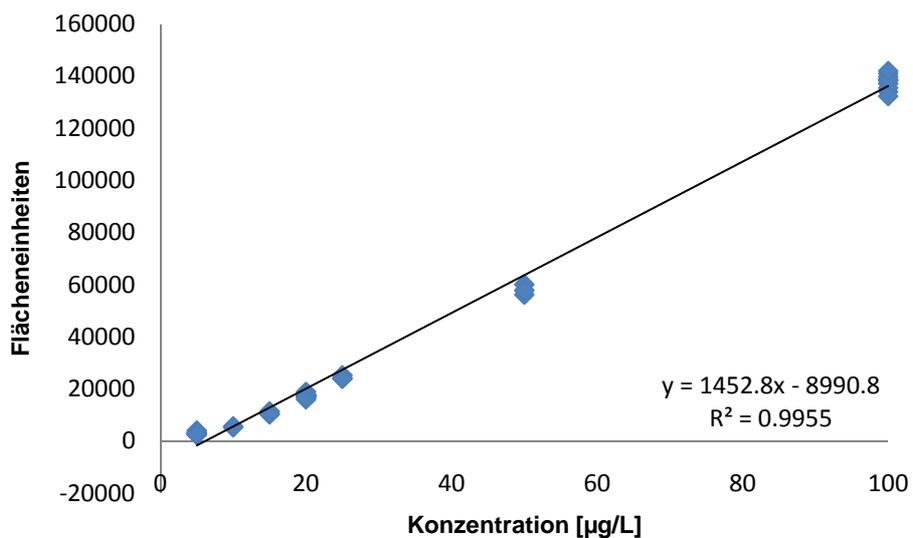


Abb. 102: Kalibrierfunktion: Anhydrochlortetracyclin

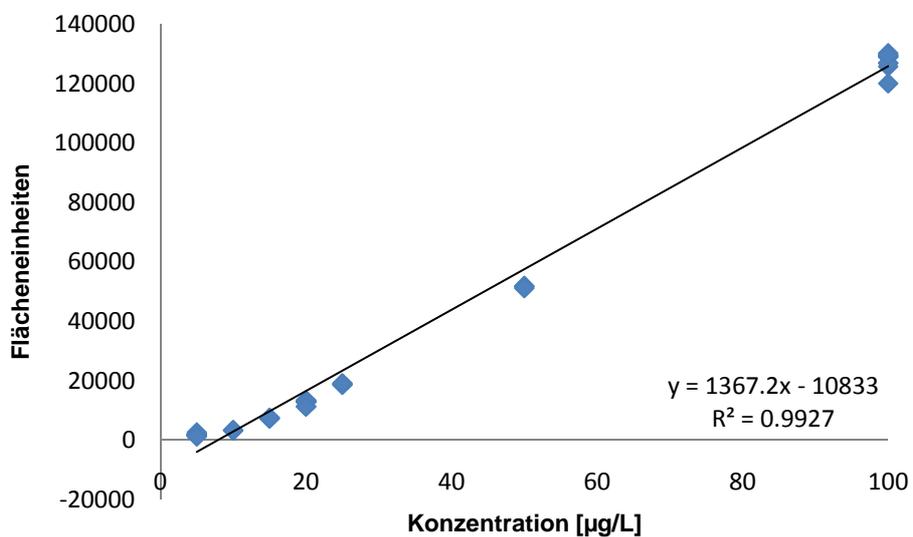


Abb. 103: Kalibrierfunktion: Epi-Anhydrochlortetracyclin

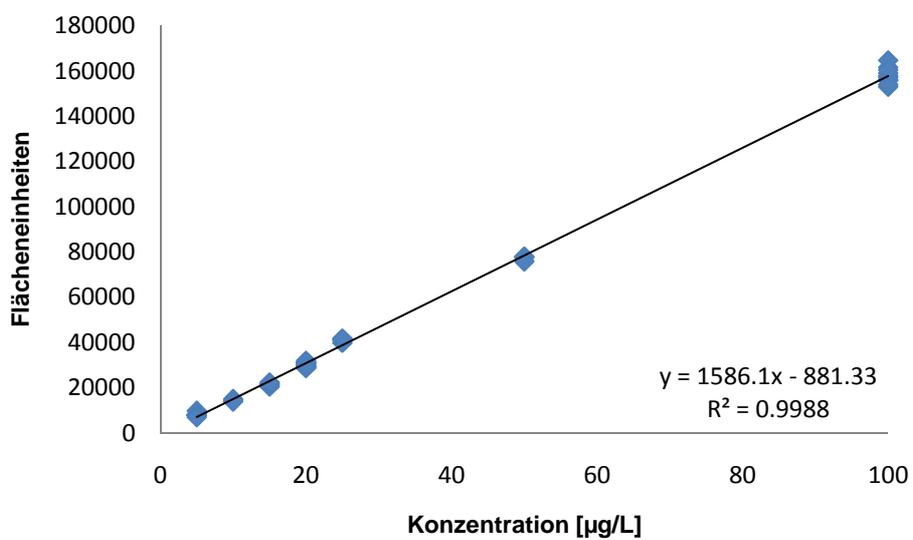


Abb. 104: Kalibrierfunktion: Doxycyclin

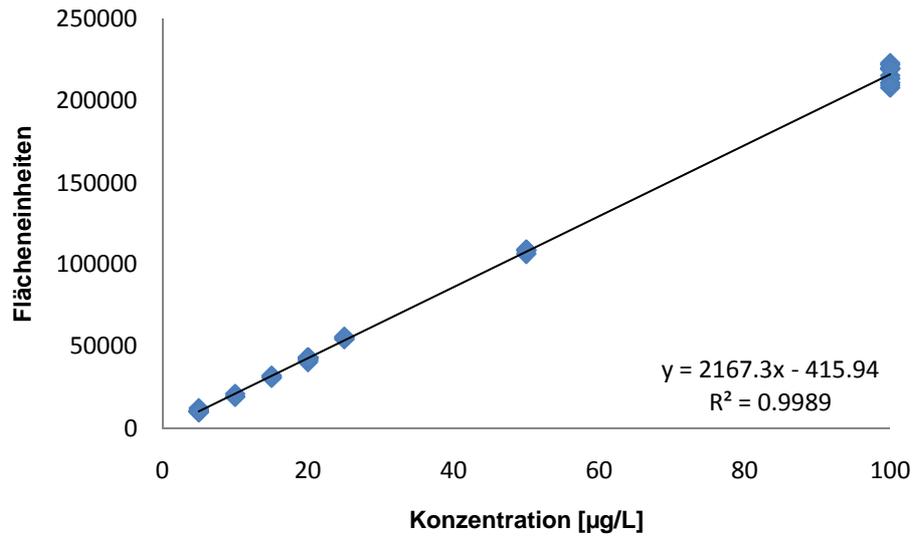


Abb. 105: Kalibrierfunktion: Epi-Doxycyclin

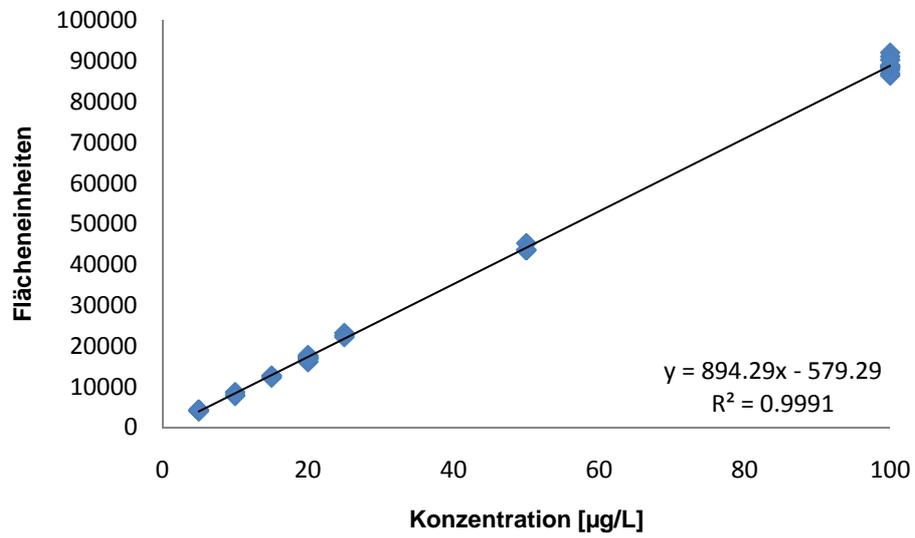


Abb. 106: Kalibrierfunktion: Demeclocyclin

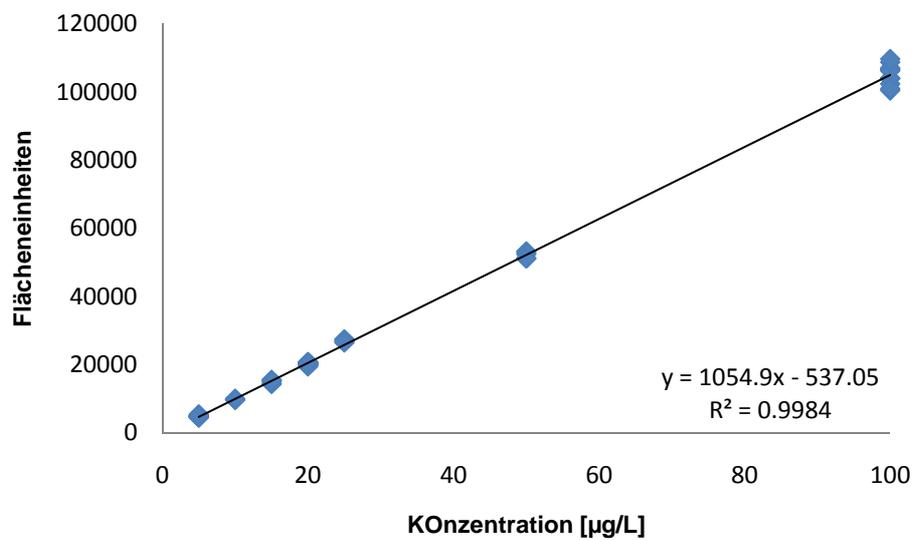


Abb. 107: Kalibrierfunktion: Epi-Demeclocyclin

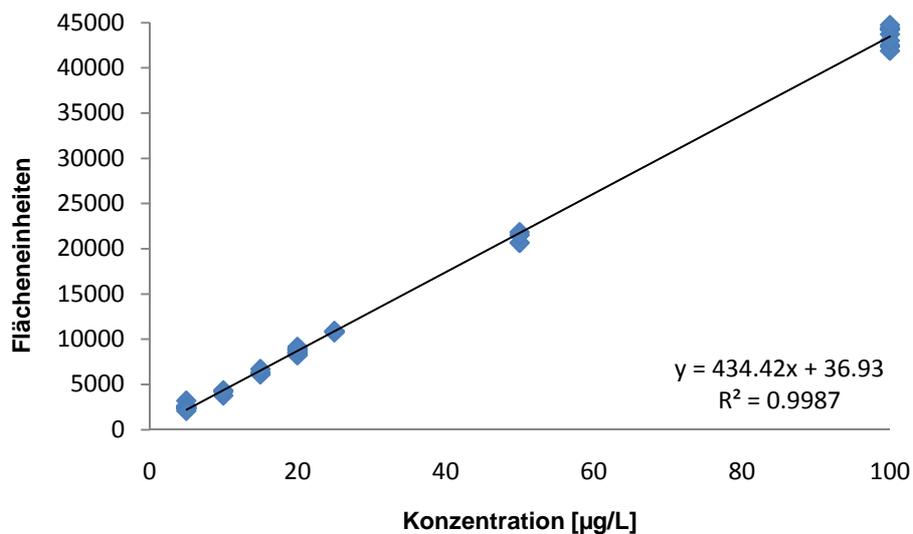


Abb. 108: Kalibrierfunktion: Chlortetracyclin

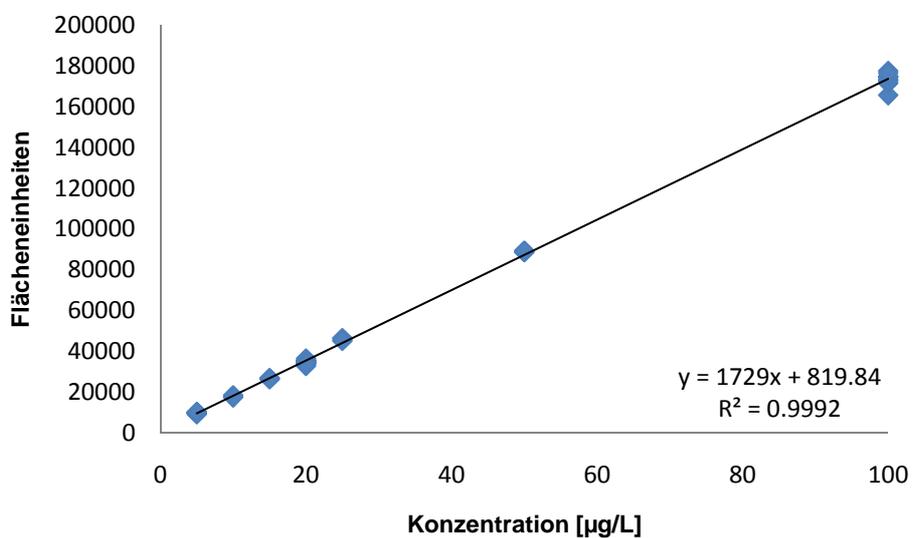


Abb. 109: Kalibrierfunktion: Iso-Chlortetracyclin

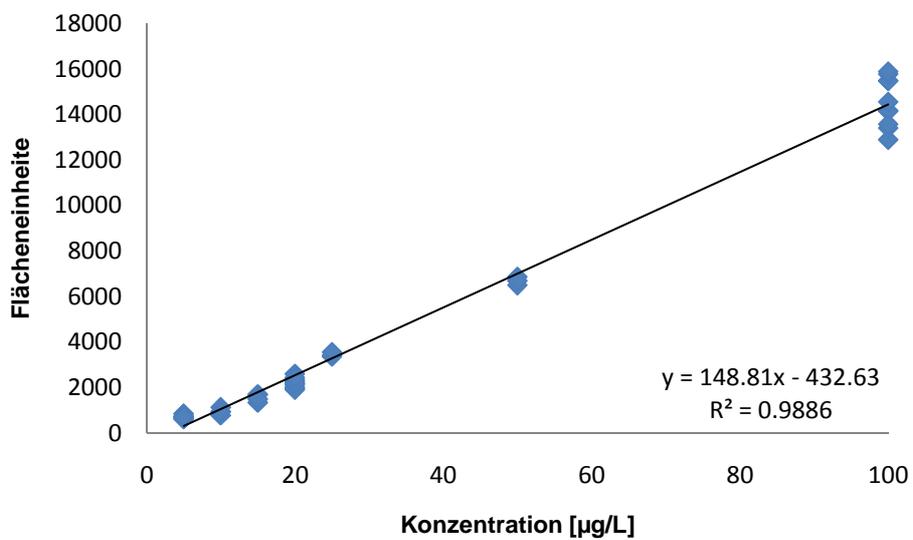


Abb. 110: Kalibrierfunktion: Epi-Iso-Chlortetracyclin

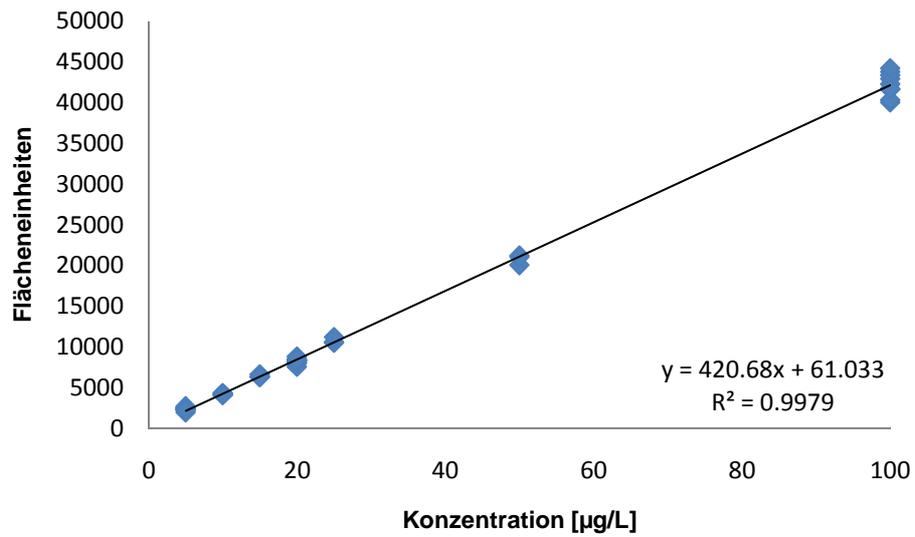


Abb. 111: Kalibrierfunktion: Epi-Enol-Chlortetracyclin

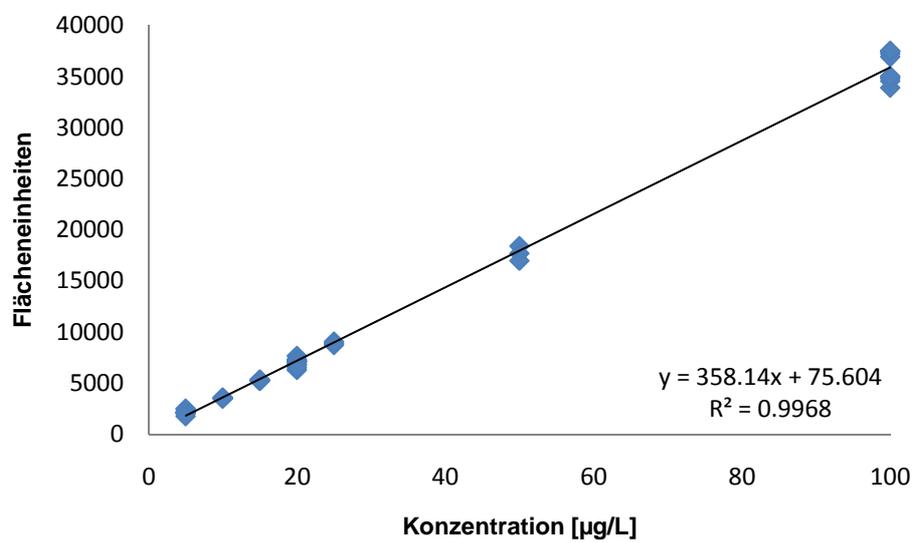


Abb. 112: Kalibrierfunktion: Epi-Keto-Chlortetracyclin

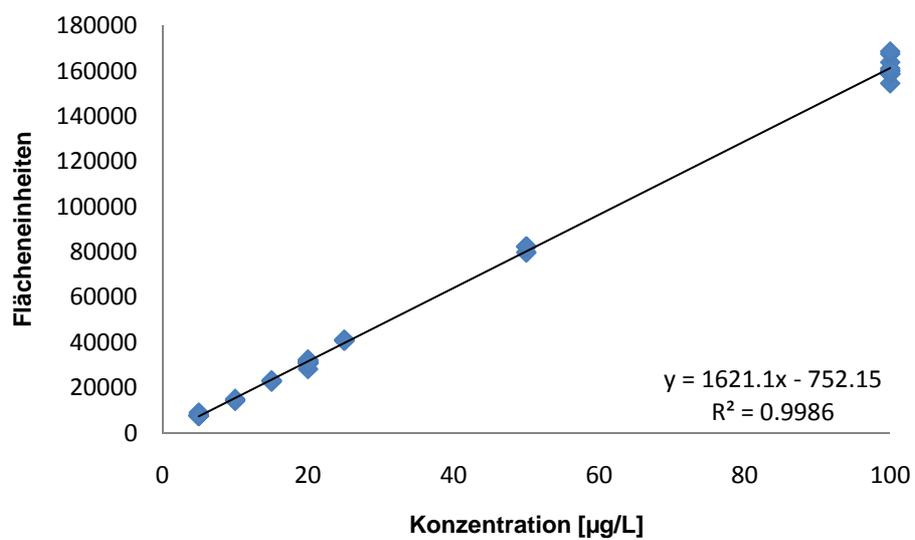


Abb. 113: Kalibrierfunktion: Methacyclin

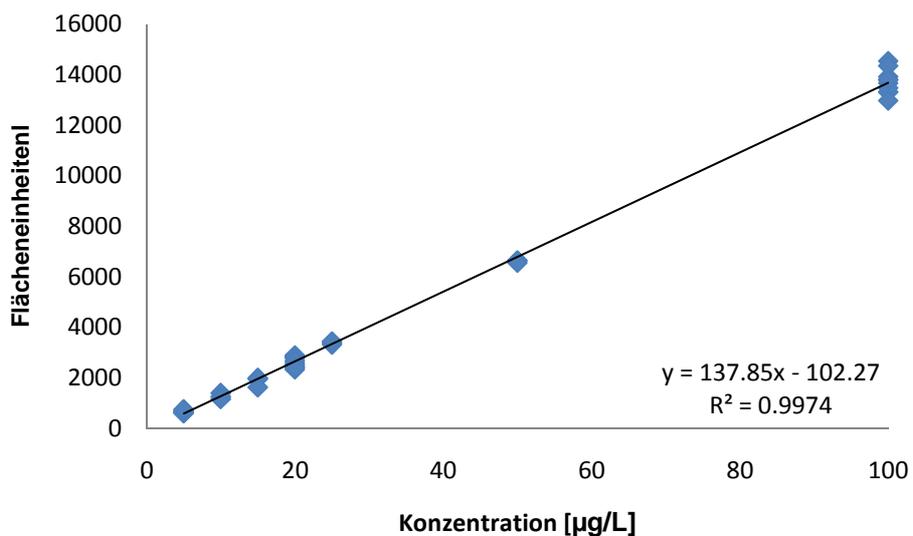


Abb. 114: Kalibrierfunktion: Oxytetracyclin

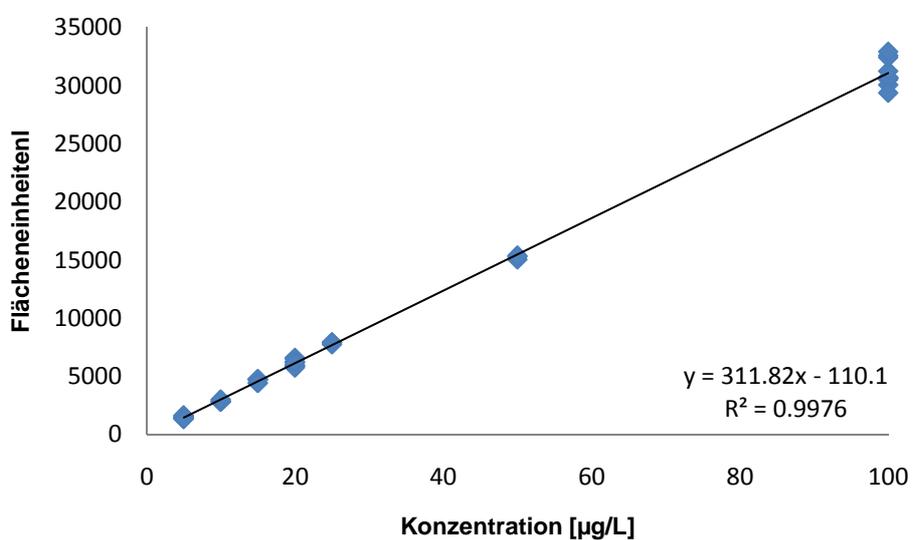


Abb. 115: Kalibrierfunktion: Epi-Oxytetracyclin

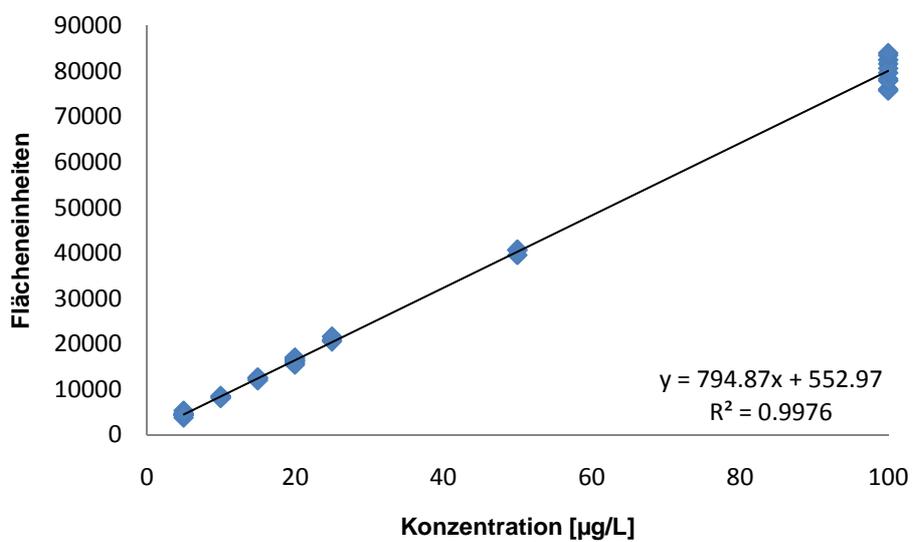


Abb. 116: Kalibrierfunktion: Tetracyclin

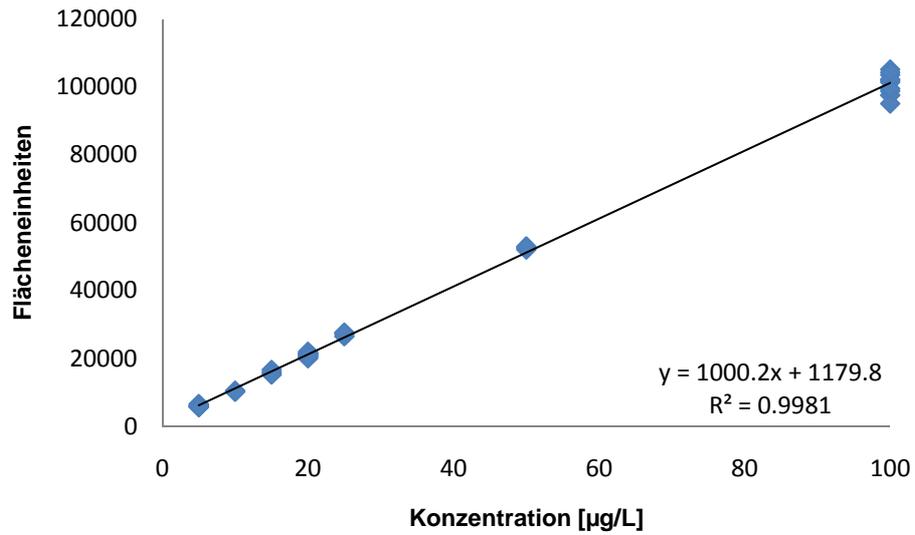


Abb. 117: Kalibrierfunktion: Epi-Tetracyclin

Sulfonamide und Trimethoprim:

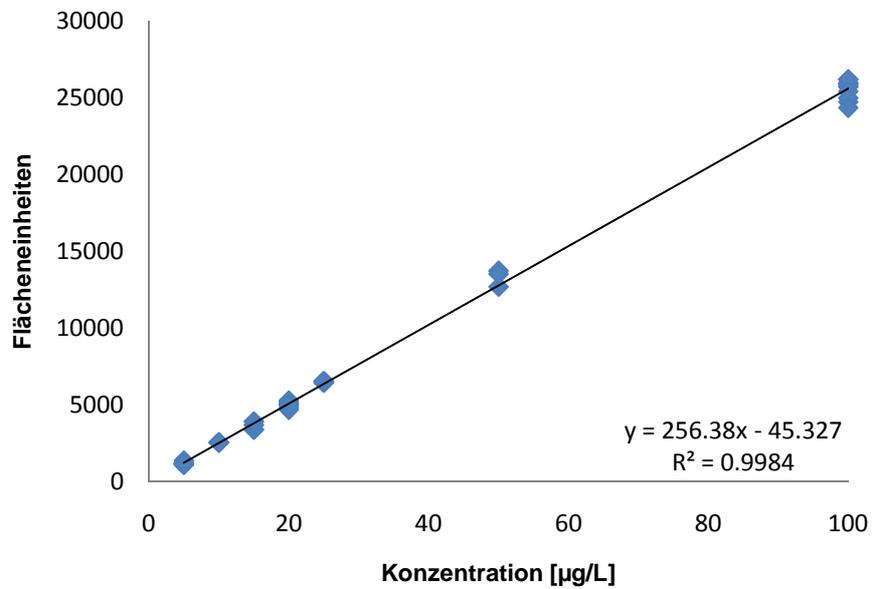


Abb. 118: Kalibrierfunktion: Sulfachlorpyridazin

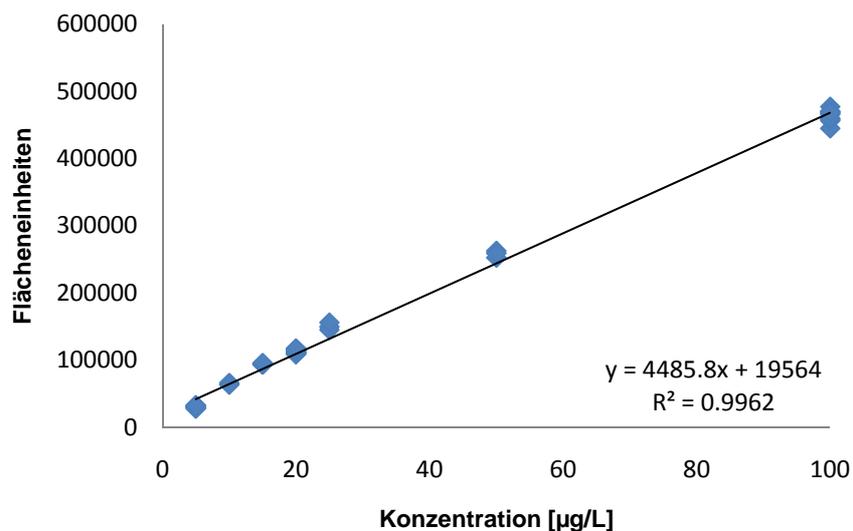


Abb. 119: Kalibrierfunktion: Sulfadimidin (Sulfamethazin)

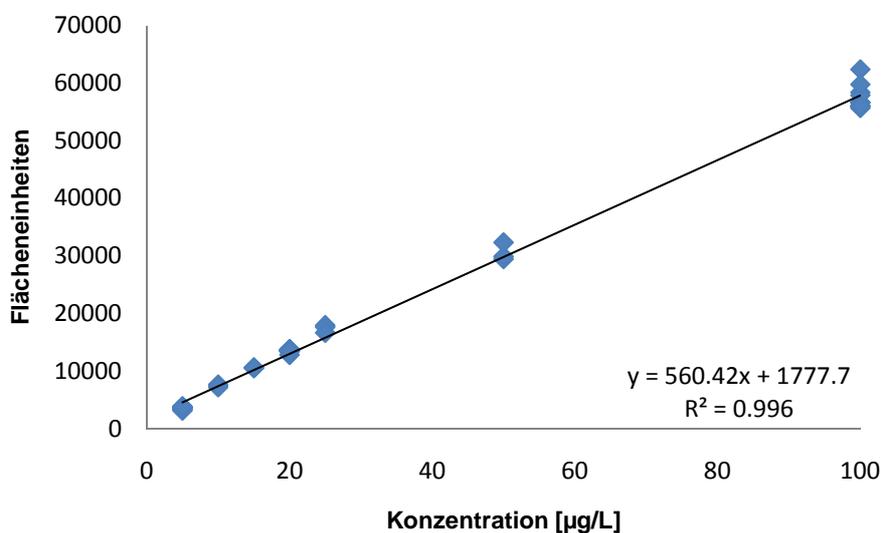


Abb. 120: Kalibrierfunktion: Sulfadiazin

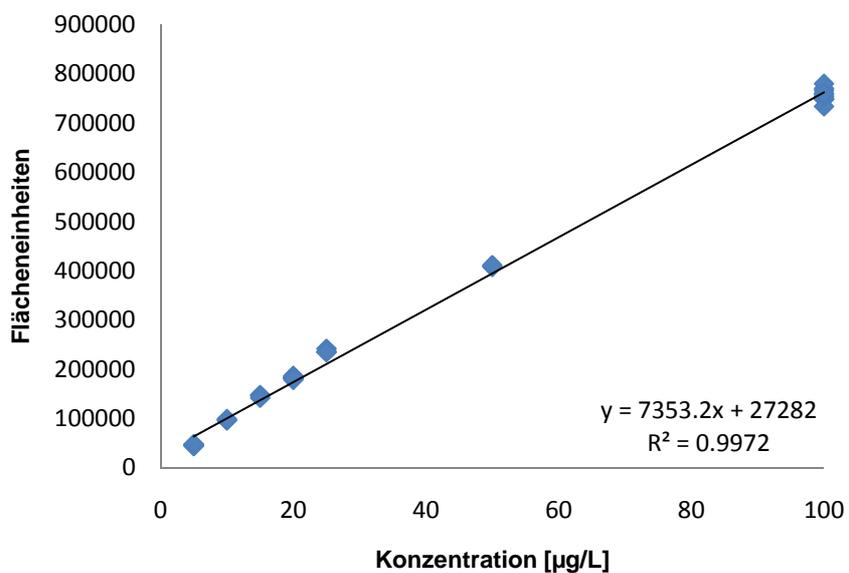


Abb. 121: Kalibrierfunktion: Sulfadimethoxin

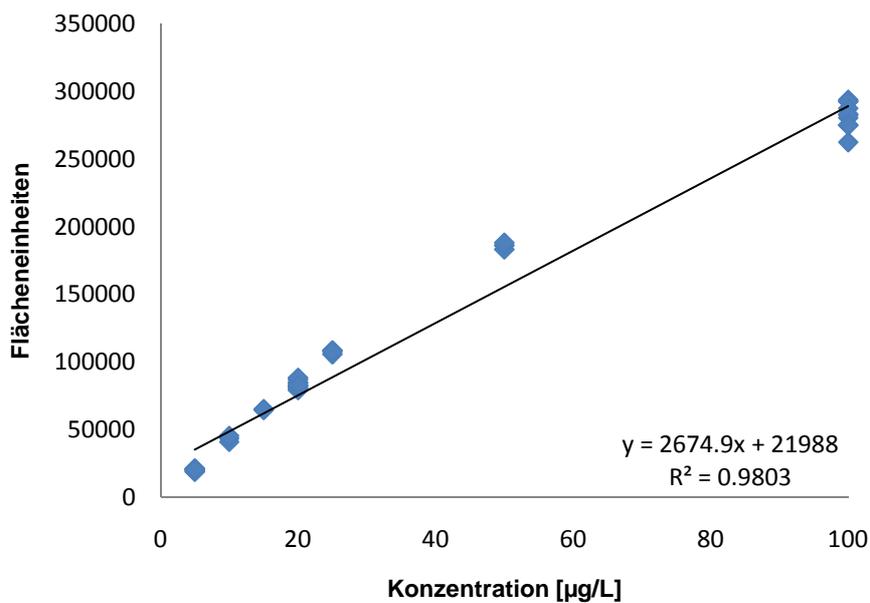


Abb. 122: Kalibrierfunktion: Sulfadoxin

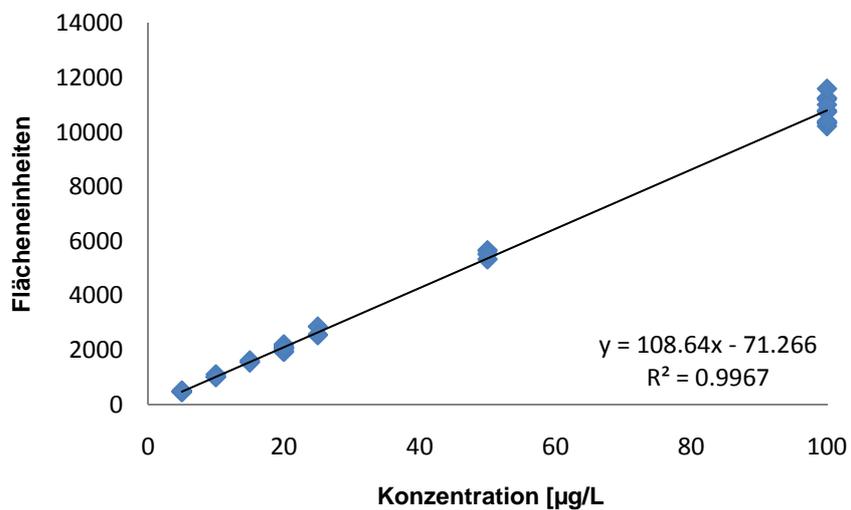


Abb. 123: Kalibrierfunktion: Sulfaguanidin

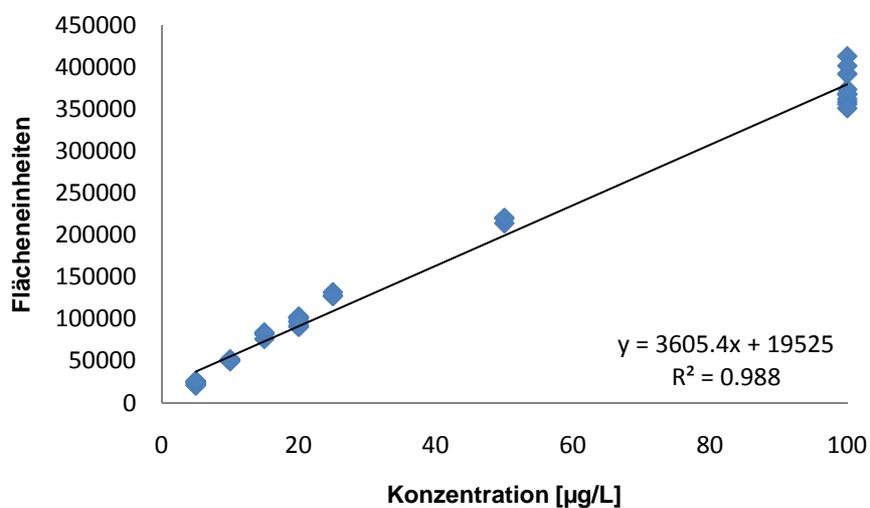


Abb. 124: Kalibrierfunktion: Sulfameter

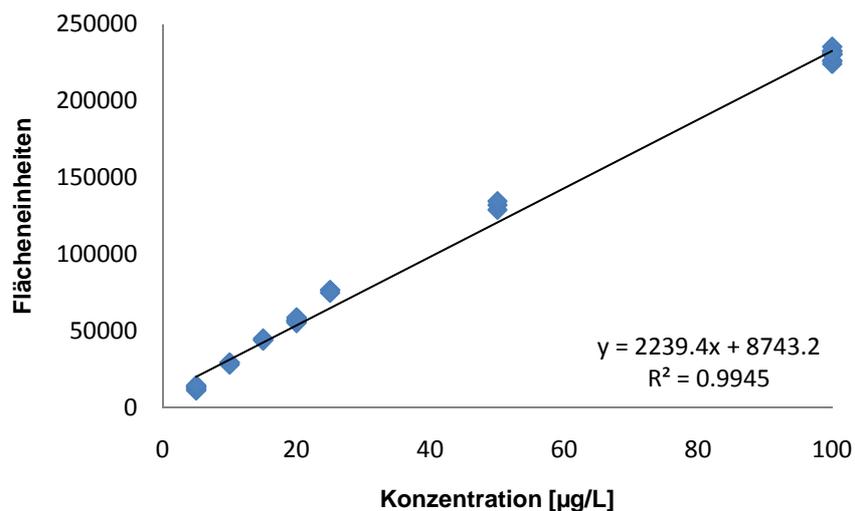


Abb. 125: Kalibrierfunktion: Sulfamerazin

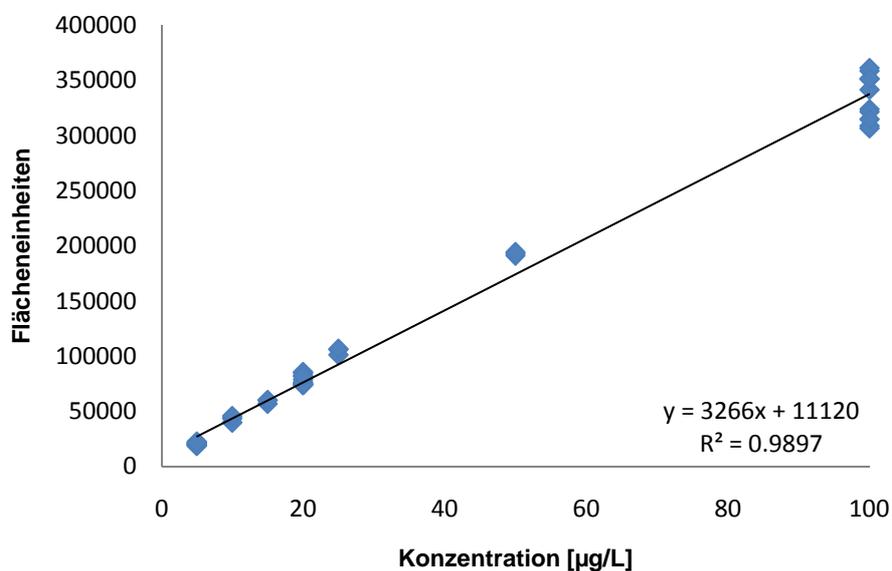


Abb. 126: Kalibrierfunktion: Sulfamethoxyipyridazin

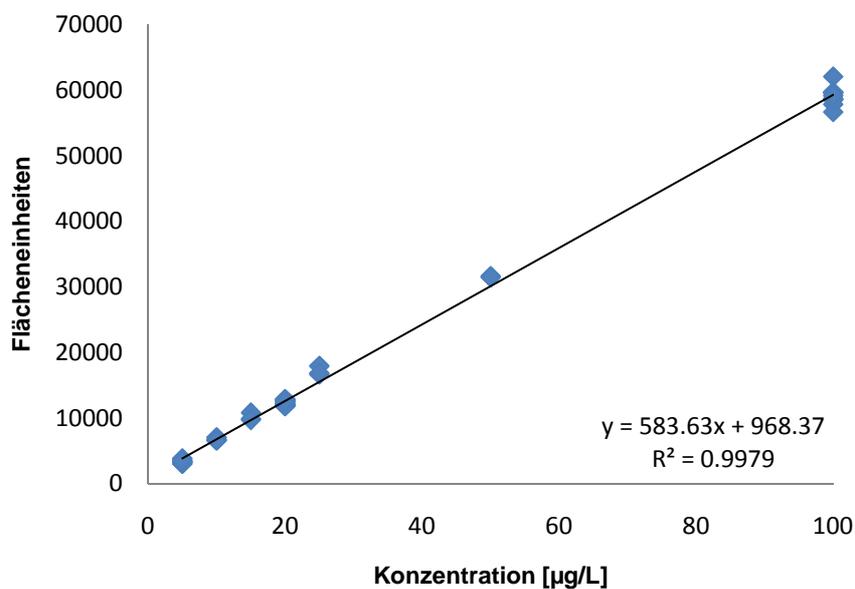


Abb. 127: Kalibrierfunktion: Sulfamethoxazol

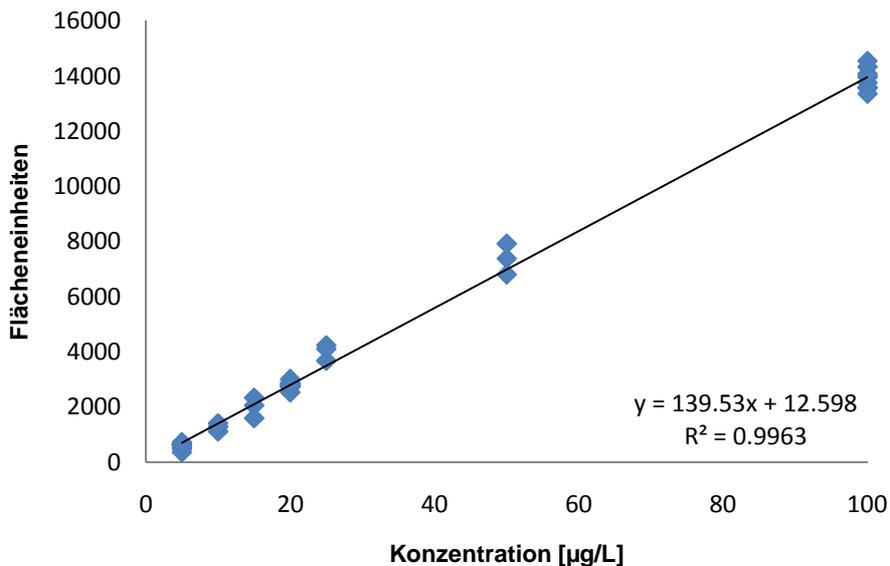


Abb. 128: Kalibrierfunktion: Sulfamethizol

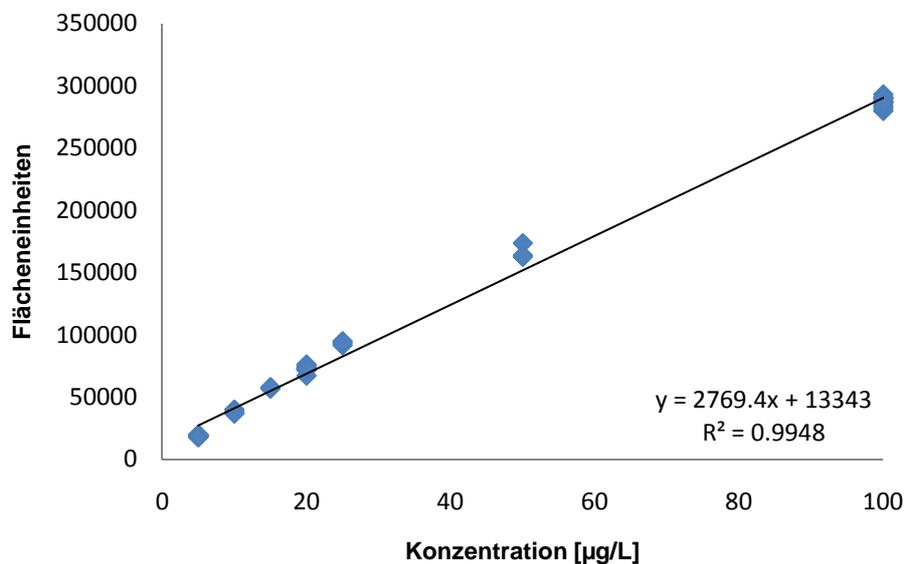


Abb. 129: Kalibrierfunktion: Sulfapyridin

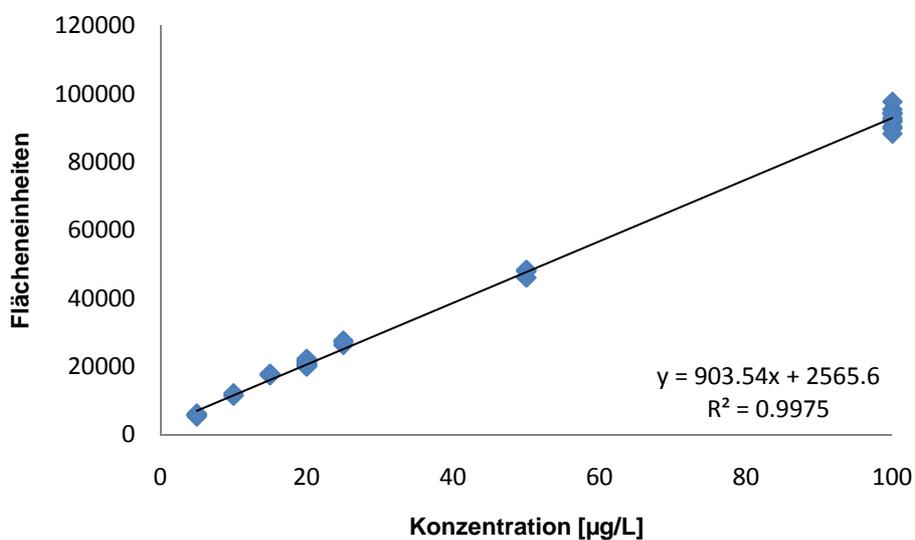


Abb. 130: Kalibrierfunktion: Sulfathiazol

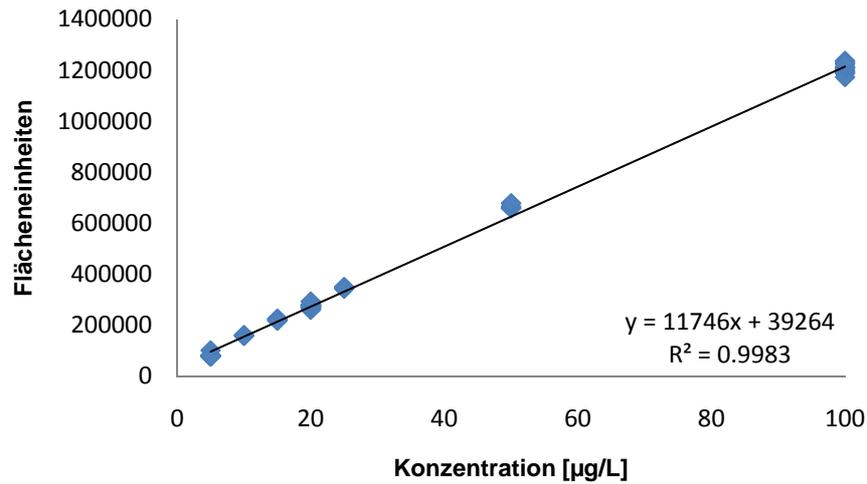


Abb. 131: Kalibrierfunktion: Trimethoprim

Chloramphenicol:

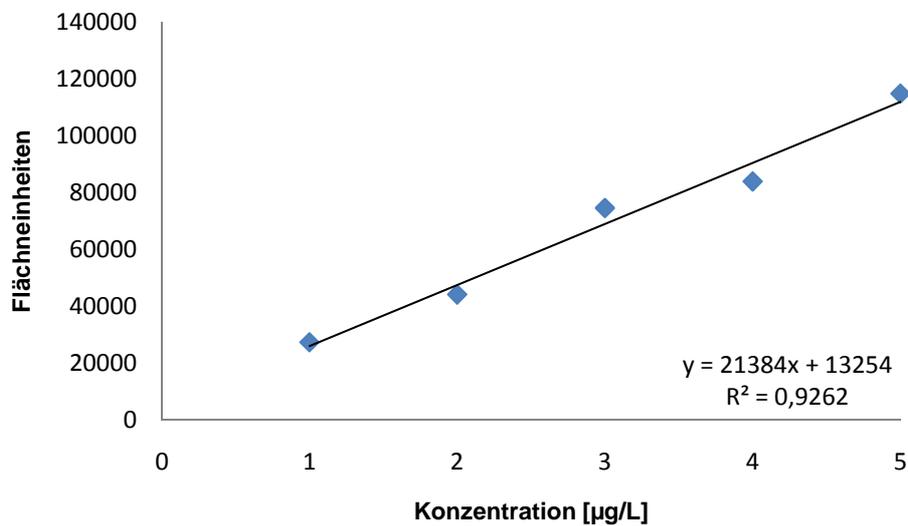


Abb. 132: Kalibrierfunktion: Chloramphenicol (Mittelwerte der Konzentrationen)

Nitrofurantololmetabolite:

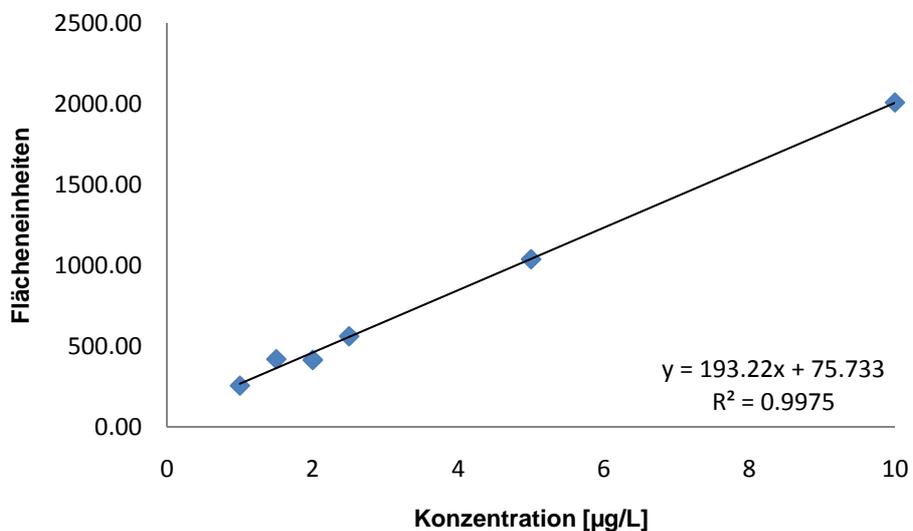


Abb. 133: Kalibrierfunktion: AHD

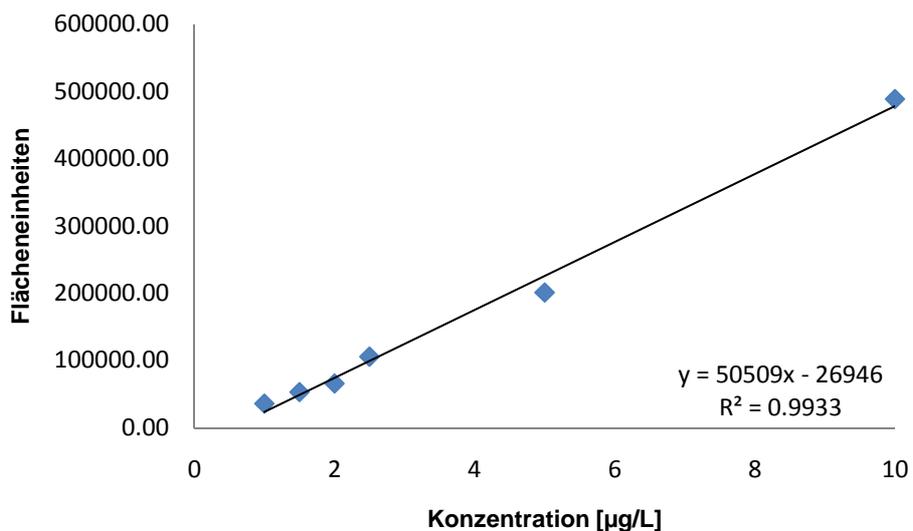


Abb. 134: Kalibrierfunktion: AMOZ

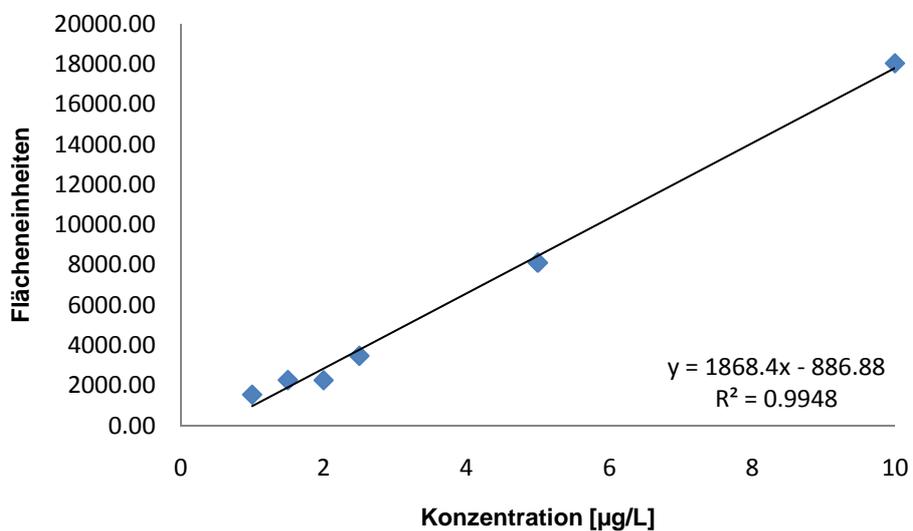


Abb. 135: Kalibrierfunktion: AOZ

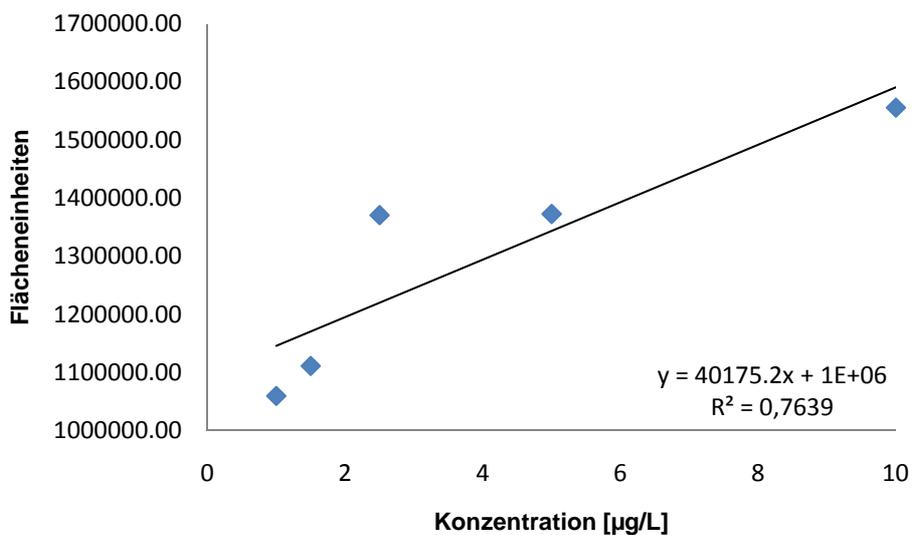


Abb. 136: Kalibrierfunktion: SEM

Fluorchinolone:

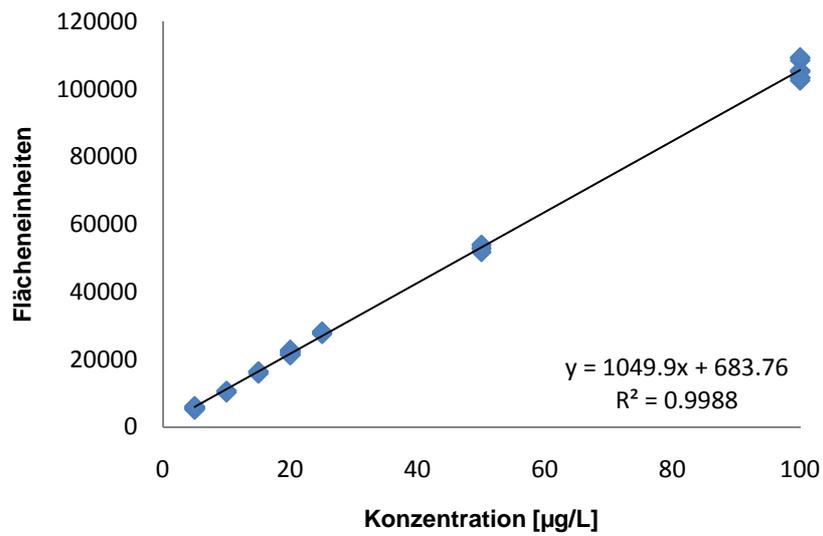


Abb. 137: Kalibrierfunktion: Ciprofloxacin

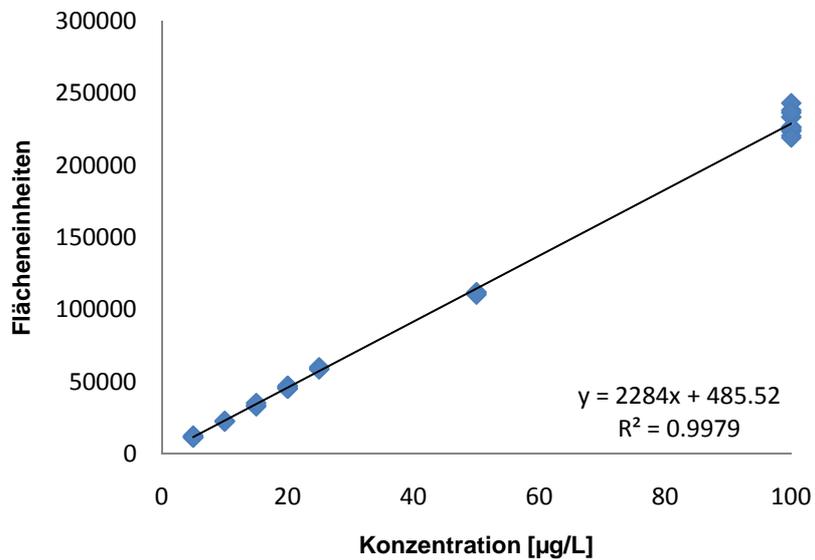


Abb. 138: Kalibrierfunktion: Danofloxacin

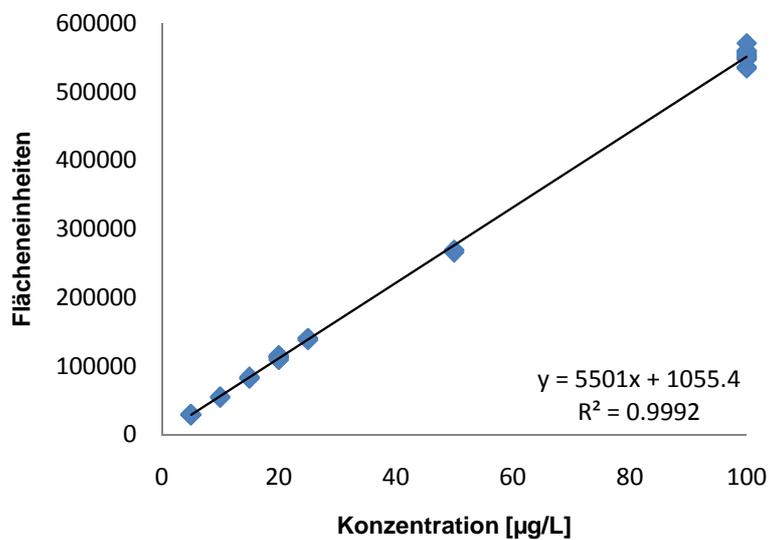


Abb. 139: Kalibrierfunktion: Difloxacin

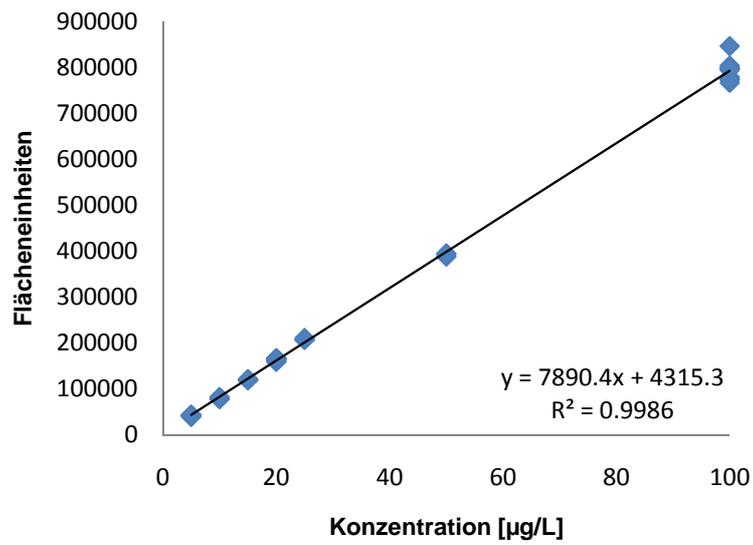


Abb. 140: Kalibrierfunktion: Enrofloxacin

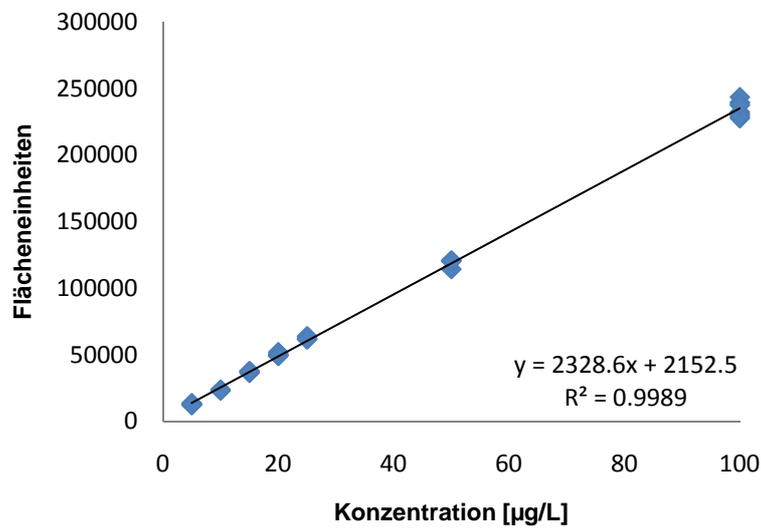


Abb. 141: Kalibrierfunktion: Enoxacin

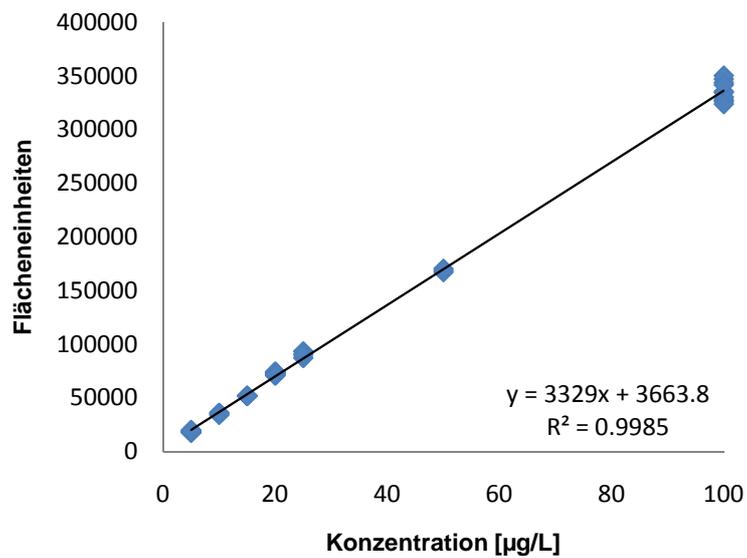


Abb. 142: Kalibrierfunktion: Fleroxacin

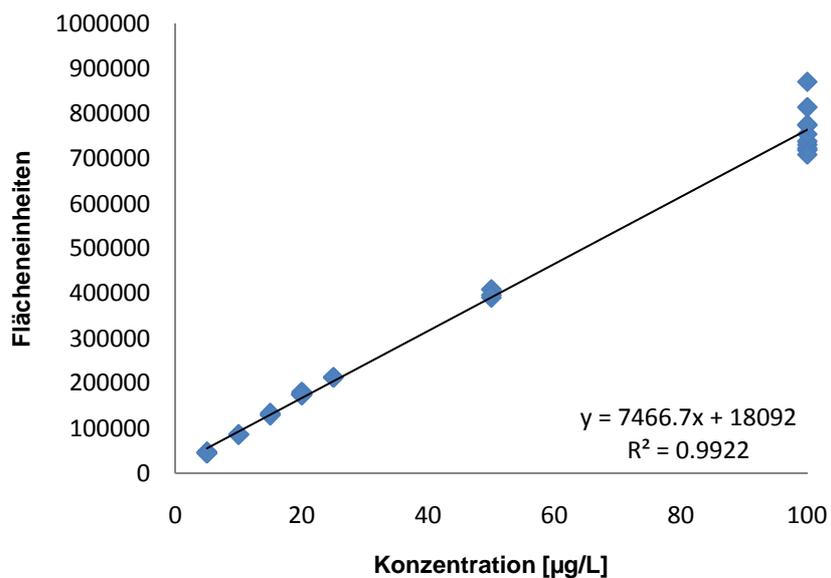


Abb. 143: Kalibrierfunktion: Levofloxacin

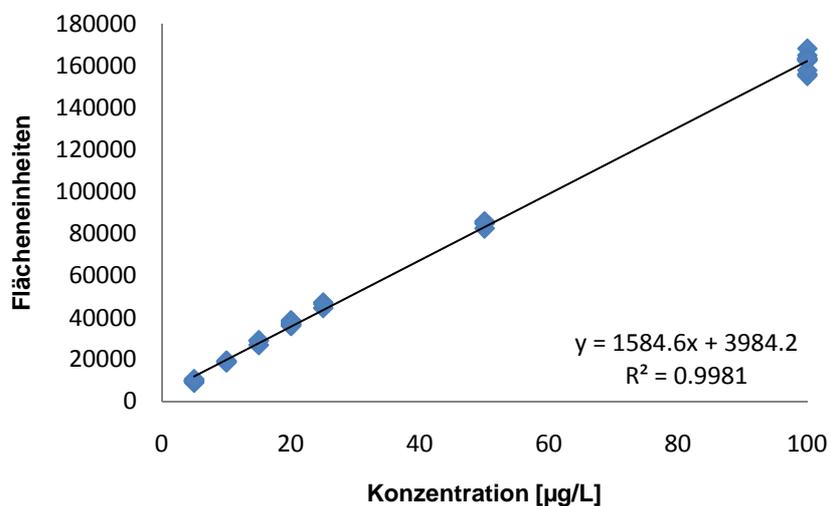


Abb. 144: Kalibrierfunktion: Marbofloxacin

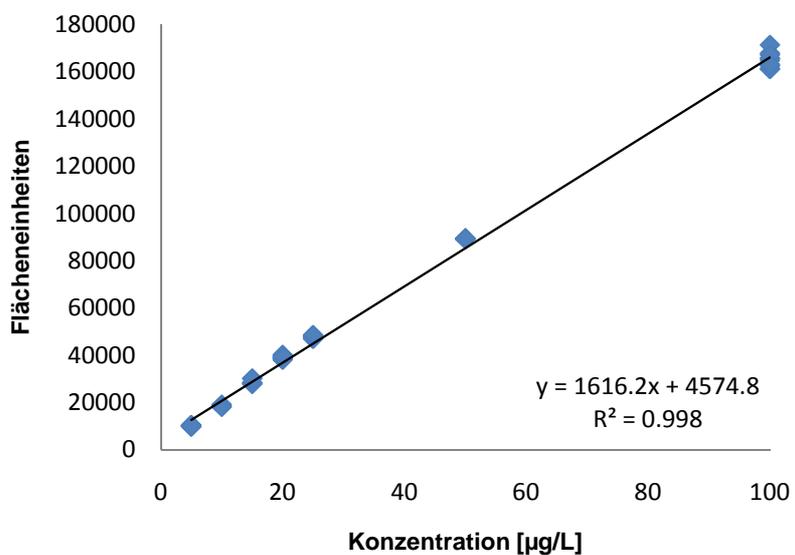


Abb. 145: Kalibrierfunktion: Norfloxacin

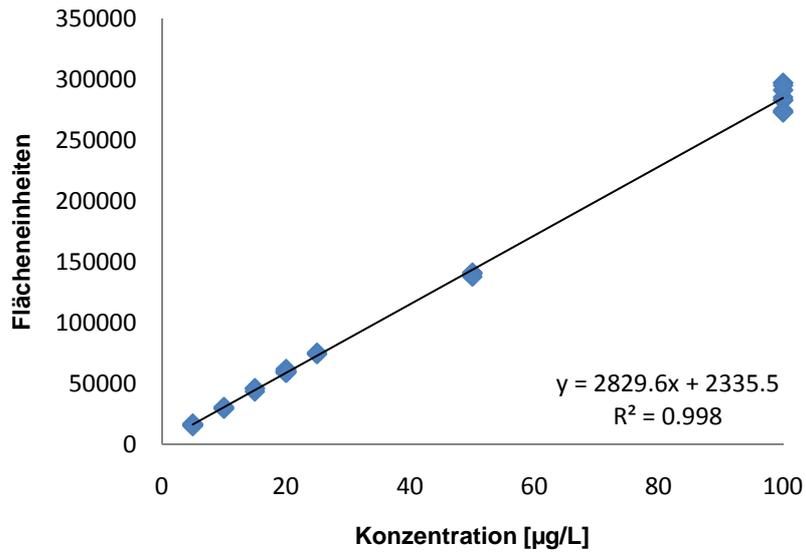


Abb. 146: Kalibrierfunktion: Sarafloxacin

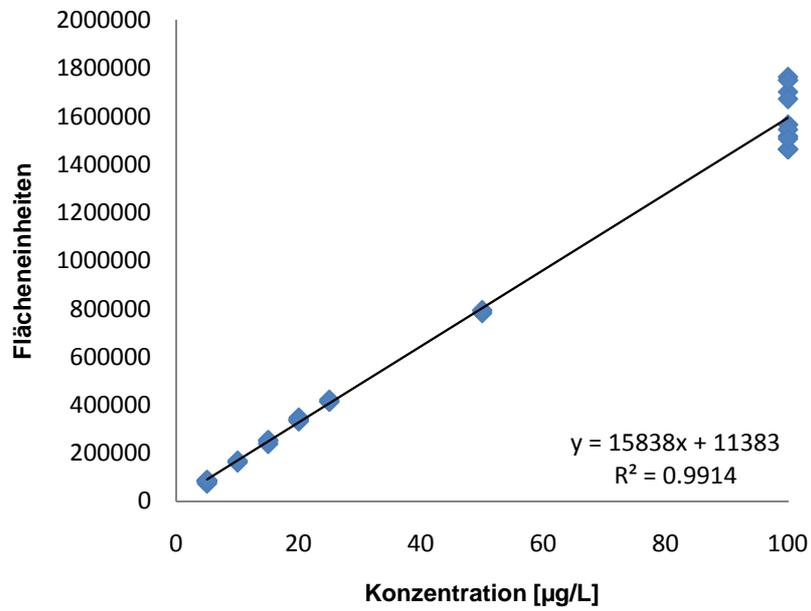


Abb. 147: Kalibrierfunktion: Sparfloxacin

A 3.3 Anpassungstest nach Mandel

Tab. 48: Tetracycline: Anpassungstest nach Mandel: $f_1=1$, $f_2=N-3$, $P=99\%$, $F=7,3333$
(Arbeitsbereich: untere Grenze 10 µg/L, obere Grenze 100 µg/L, $n=10$)

Abk.	PG
α-Apo-OTC	13,2448
β-Apo-OTC	99,3203
ATC	2,2550
Epi-ATC	0,7872
ACTC	111,1376
Epi-ACTC	140,6855
DC	1,8222
Epi-DC	0,0696
DMC	0,1698
Epi-DMC	0,0086
CTC	3,2173
Iso-CTC	1,0905
Epi-Iso-CTC	6,2525
Epi-Enol-CTC	1,3983
Epi-Keto-CTC	2,5440
MeTC	0,1269
OTC	2,0664
Epi-OTC	0,1445
TC	0,0517
Epi-TC	2,4393

Tab. 49: Sulfonamide und Trimethoprim: Anpassungstest nach Mandel: $f_1=1$, $f_2=N-3$, $P=99\%$, $F=7,3333$ (Arbeitsbereich: untere Grenze 10 $\mu\text{g/L}$, obere Grenze 100 $\mu\text{g/L}$, $n=10$)

Abk.	PG
SCPD	3,9389
SDD	70,4690
SDM	86,4481
SDX	270,3331
SDZ	13,6115
SGD	0,1661
SM	37,0612
SMZ	213,9826
SMOPD	17,4669
SMOAZ	13,0005
SMTZ	12,2134
SPD	227,2373
STZ	5,0848
TMP	

Tab. 50: Chloramphenicol: Anpassungstest nach Mandel: $f_1=1$, $f_2=N-3$, $P=99\%$, $F=7,4693$ (Arbeitsbereich: untere Grenze 1 $\mu\text{g/L}$, obere Grenze 10 $\mu\text{g/L}$, $n=10$)

Abk.	PG
CAP	11,0895

Tab. 51: Nitrofurantolinderivate: Anpassungstest nach Mandel: $f_1=1$, $f_2=N-3$, $P=99\%$, $F=7,4202$ (Arbeitsbereich: untere Grenze 1 $\mu\text{g/L}$, obere Grenze 10 $\mu\text{g/L}$, $n=10$)

Abk.	PG
AHD	0,0003
AMOX	39,0328
AOZ	26,1647
SEM	12,7952

Tab. 52: Makrolide: Anpassungstest nach Mandel: $f_1=1$, $f_2=N-3$, $P=99\%$, $F=7,3333$
(Arbeitsbereich: untere Grenze 10 $\mu\text{g/L}$, obere Grenze 100 $\mu\text{g/L}$, $n=10$)

Abk.	PG
Cip	0,8281
Dan	0,5112
Dif	1,8164
Enr	0,0567
Eno	2,7582
Fle	1,5887
Lev	3,0863
Mar	14,8381
Nor	65,7529
Sar	0,0835
Spa	0,0752

A 3.4 Residualanalyse

Tetracycline:

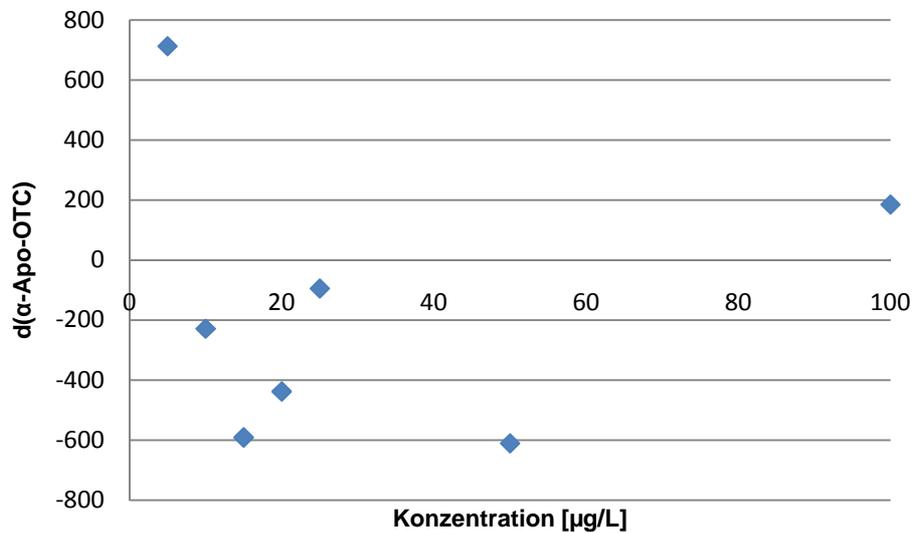


Abb. 148: Residualanalyse: α -Apo-Oxytetracyclin

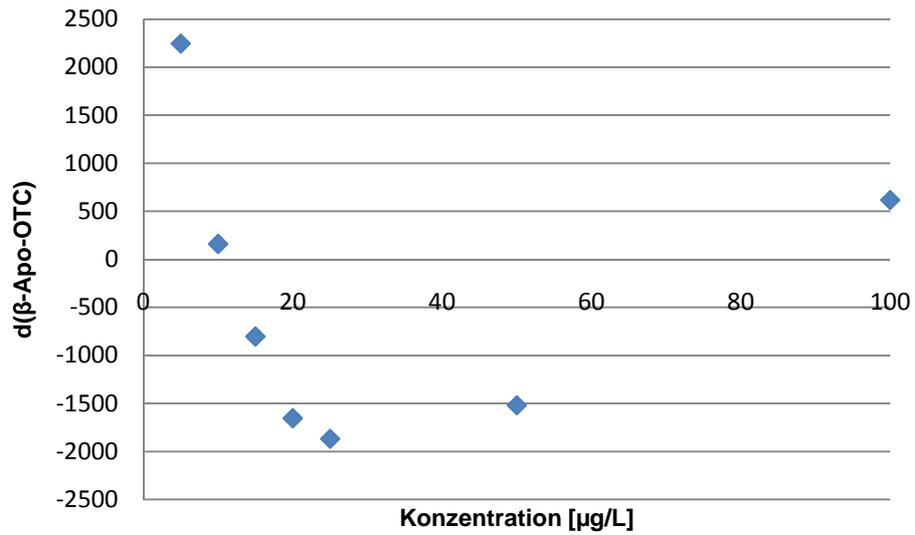


Abb. 149: Residualanalyse: β-Apo-Oxytetracyclin

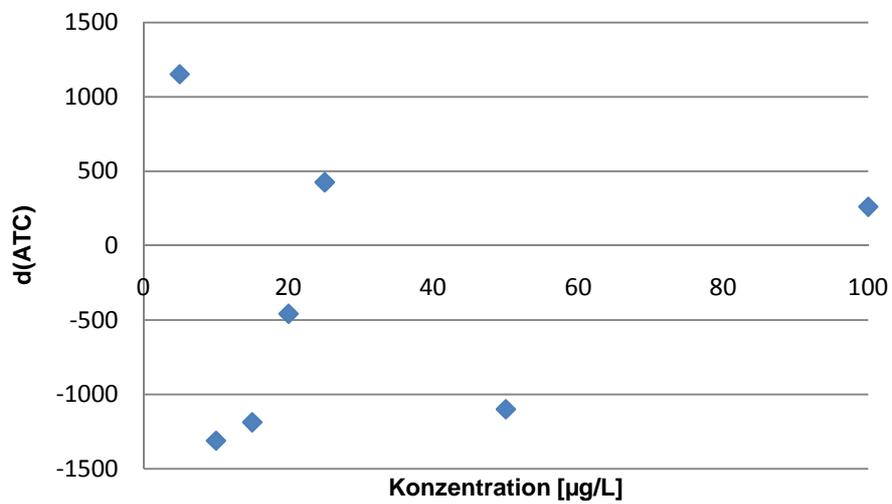


Abb. 150: Residualanalyse: Anhydrotetracyclin

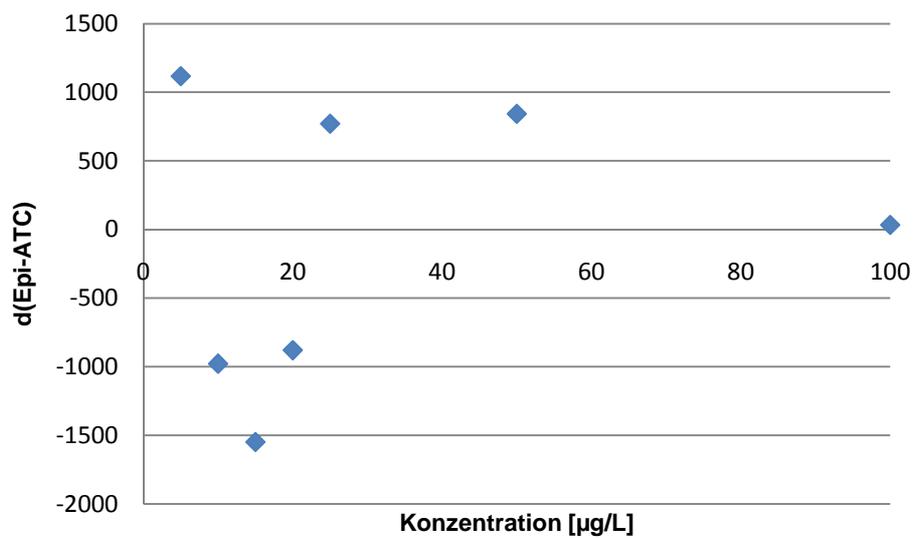


Abb. 151: Residualanalyse: Epi-Anhydrotetracyclin

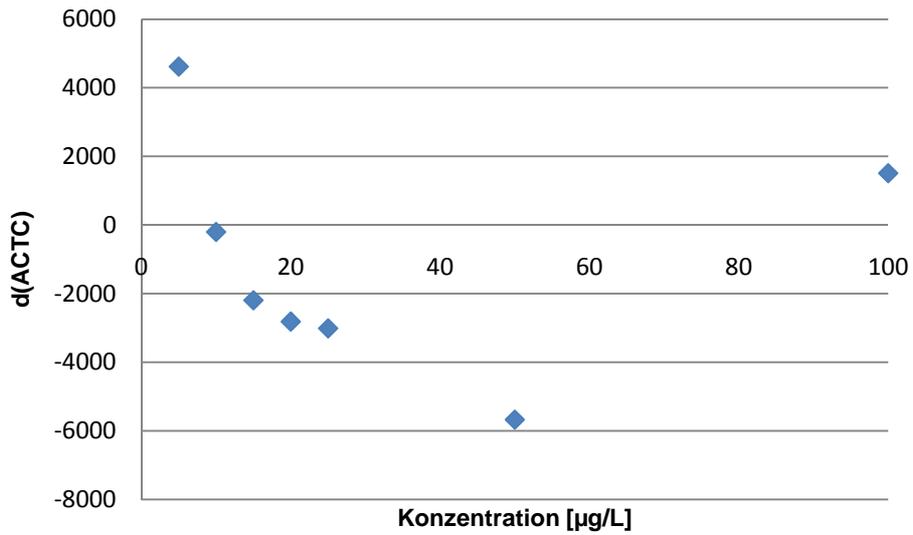


Abb. 152: Residualanalyse: Anhydrochlortetracyclin

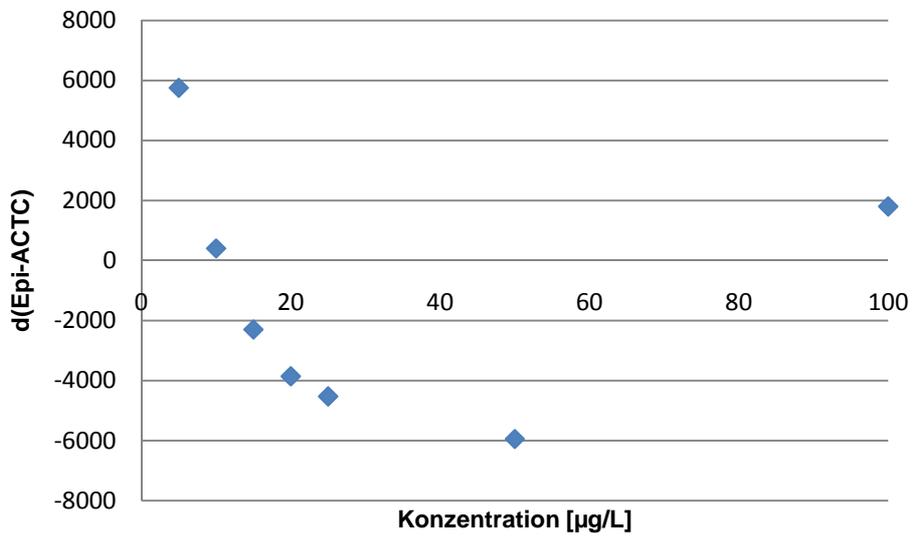


Abb. 153: Residualanalyse: Epi-Anhydrochlortetracyclin

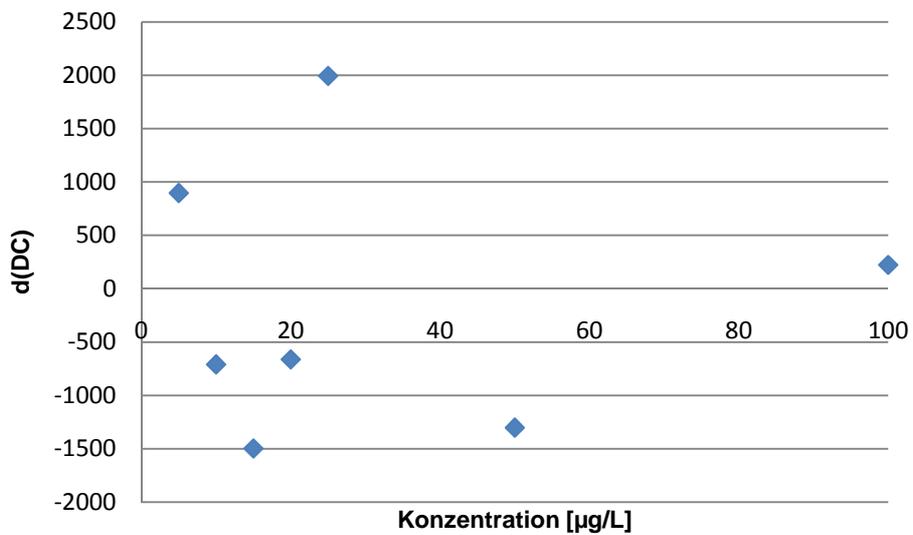


Abb. 154: Residualanalyse: Doxycyclin

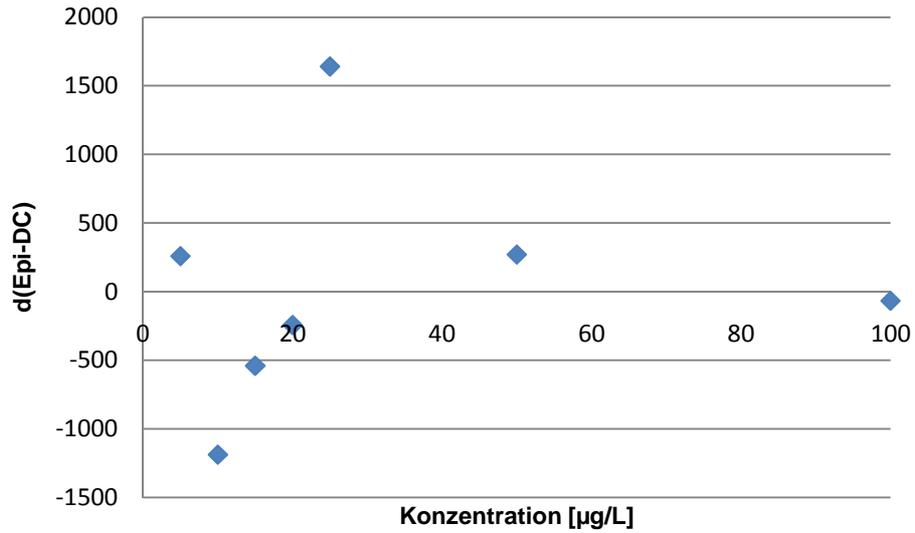


Abb. 155: Residualanalyse: Epi-Doxycyclin

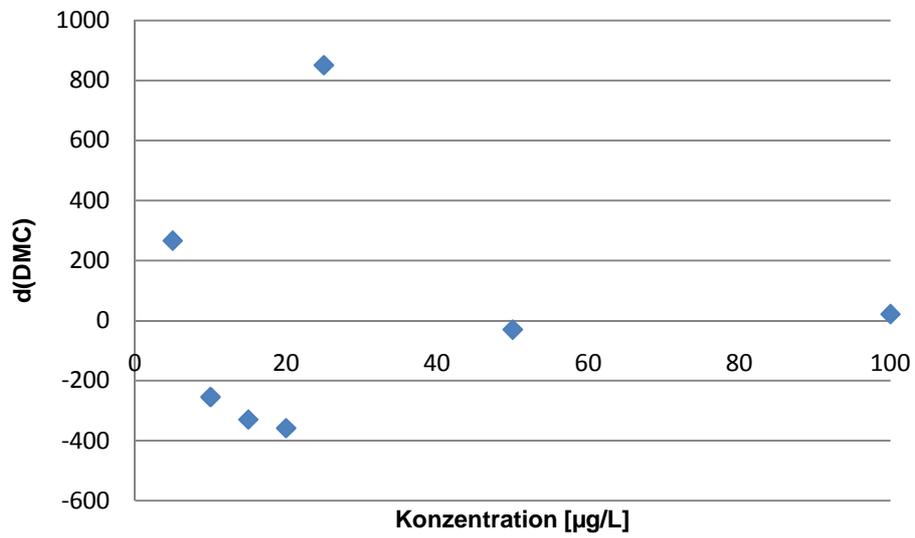


Abb. 156: Residualanalyse: Demeclocyclin

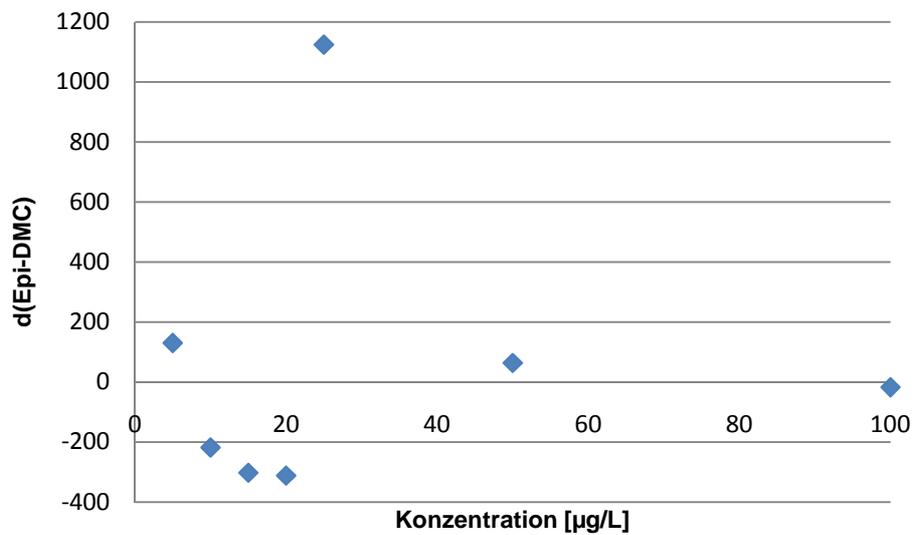


Abb. 157: Residualanalyse: Epi-Demeclocyclin

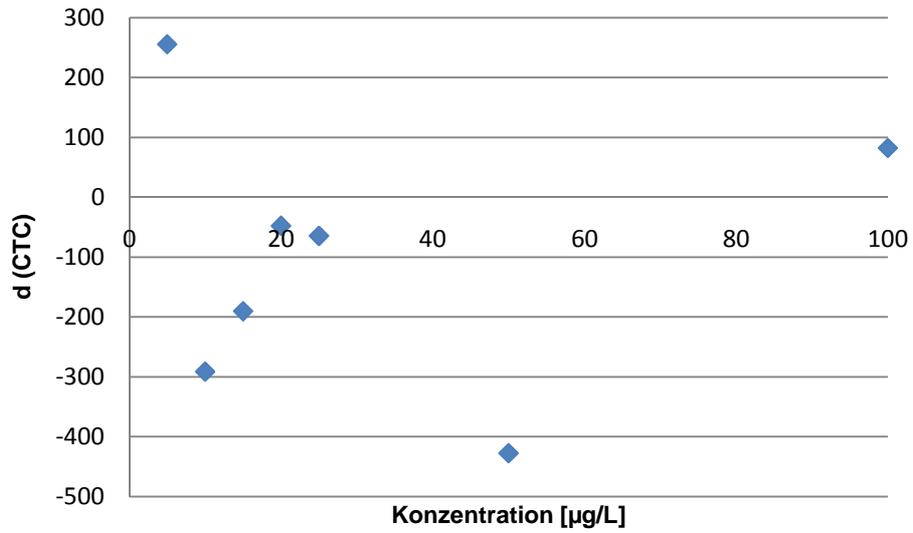


Abb. 158: Residualanalyse: Chlortetracyclin

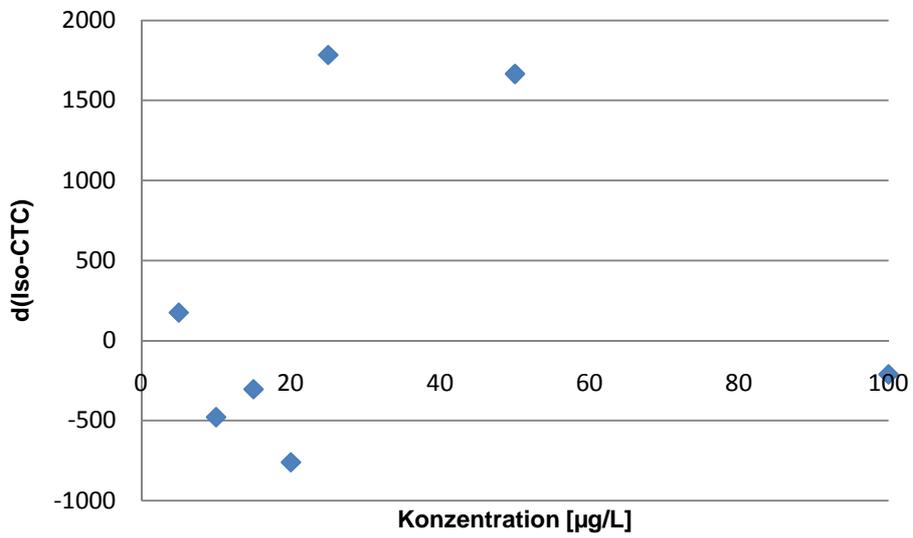


Abb. 159: Residualanalyse: Iso-Chlortetracyclin

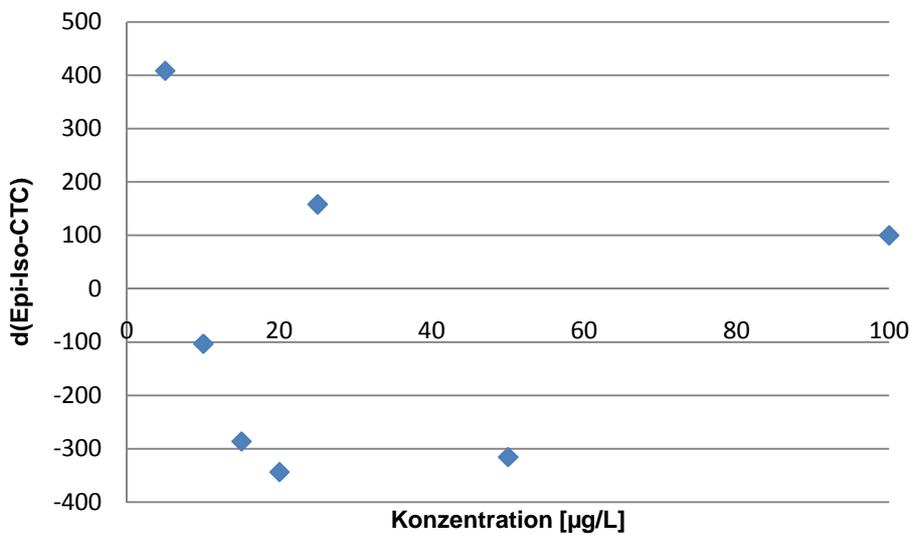


Abb. 160: Residualanalyse: Epi-Iso-Chlortetracyclin

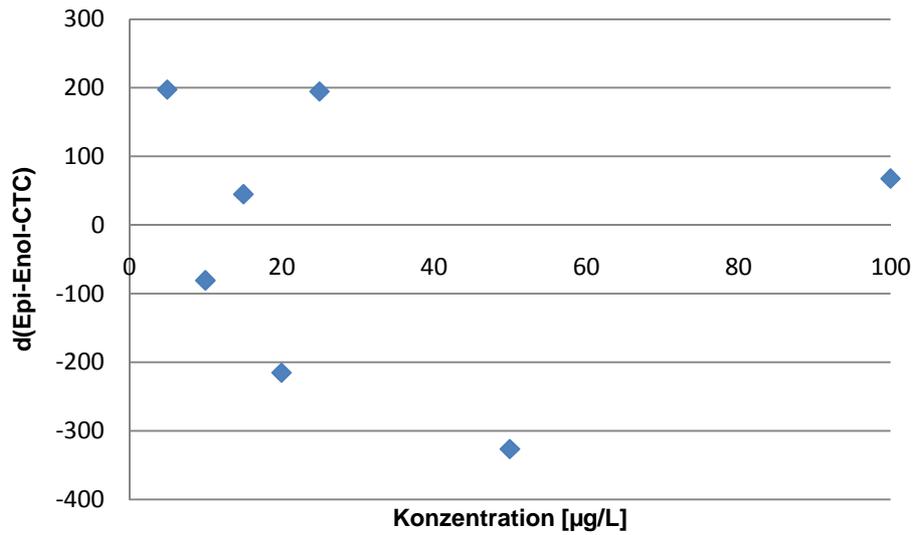


Abb. 161: Residualanalyse: Epi-Enol-Chlortetracyclin

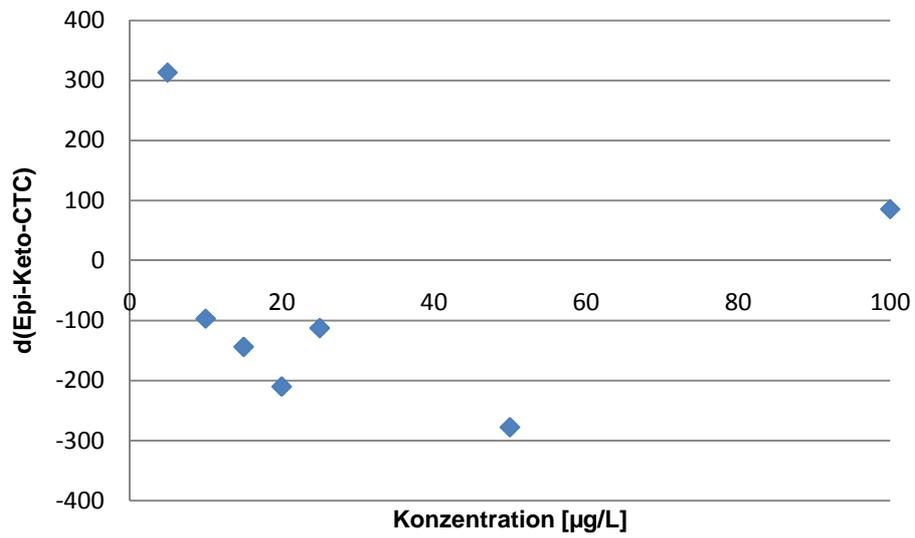


Abb. 162: Residualanalyse: Epi-Keto-Chlortetracyclin

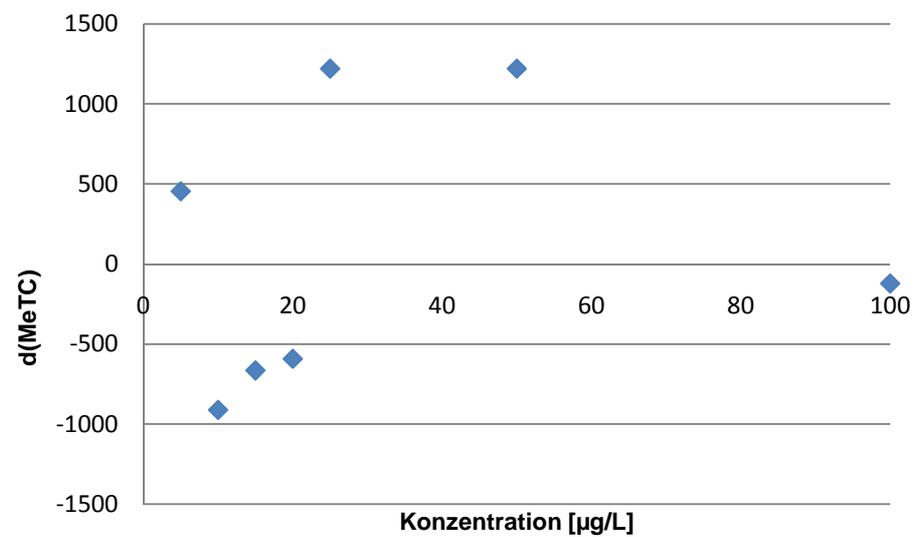


Abb. 163: Residualanalyse: Methacyclin

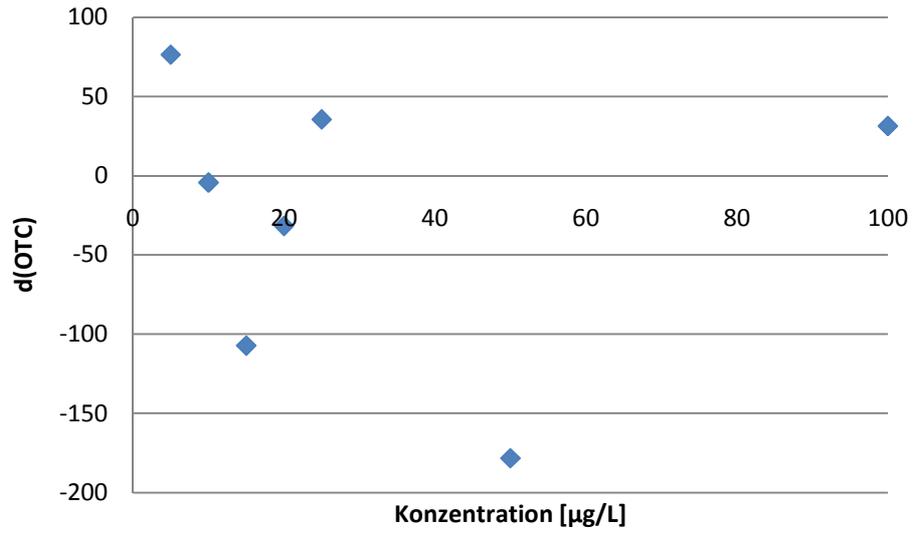


Abb. 164: Residualanalyse: Oxytetracyclin

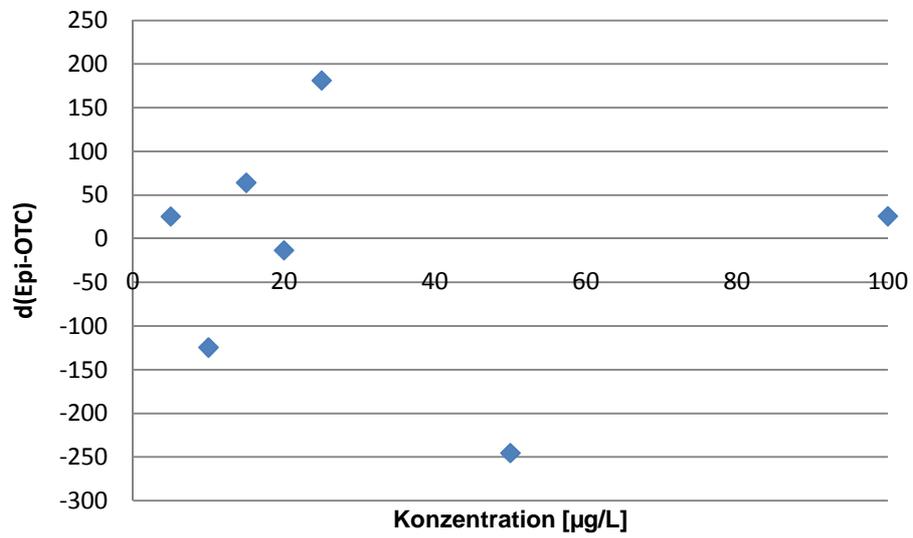


Abb. 165: Residualanalyse: Epi-Oxytetracyclin

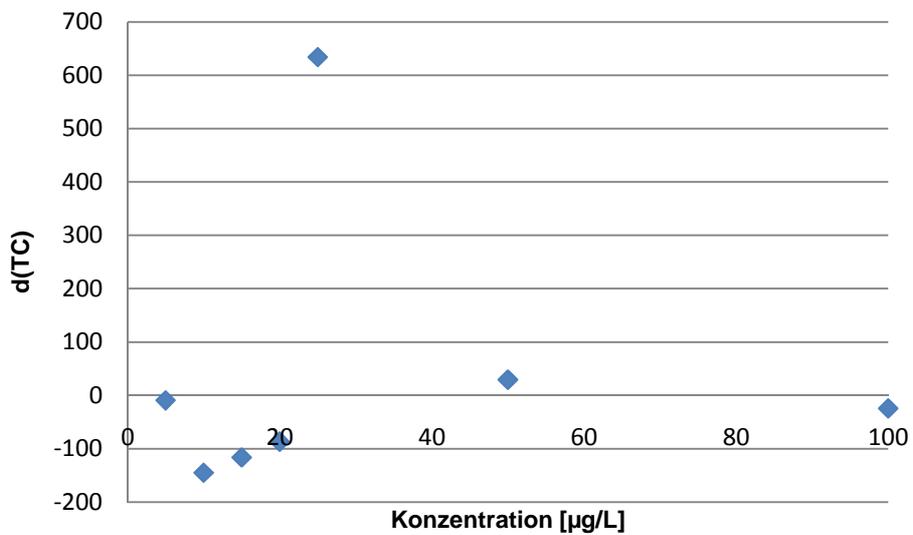


Abb. 166: Residualanalyse: Tetracyclin

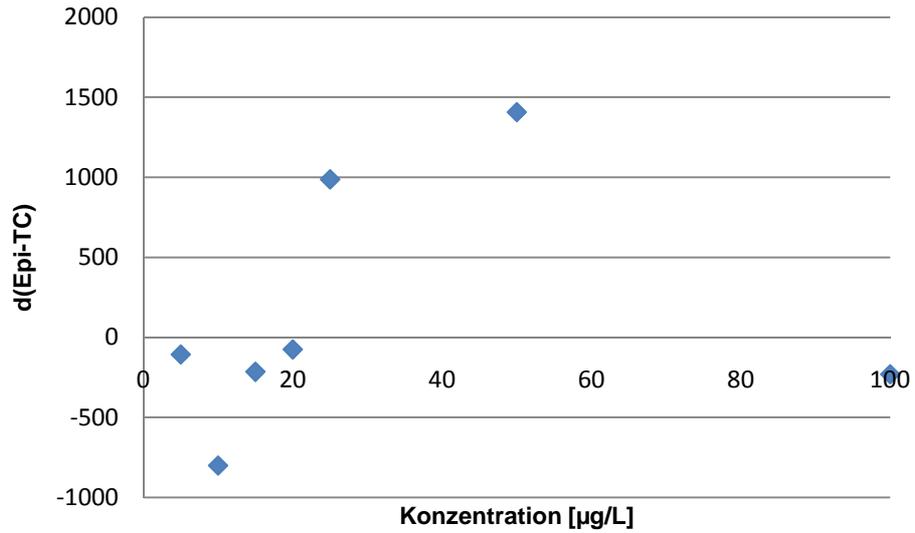


Abb. 167: Residualanalyse: Epi-Tetracyclin

Sulfonamide und Trimethoprim:

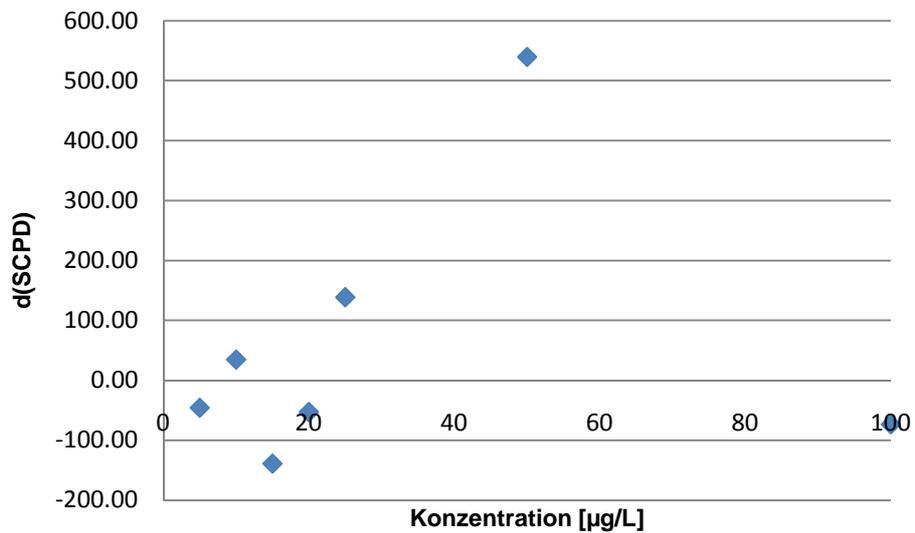


Abb. 168: Residualanalyse: Sulfachlorpyridazin

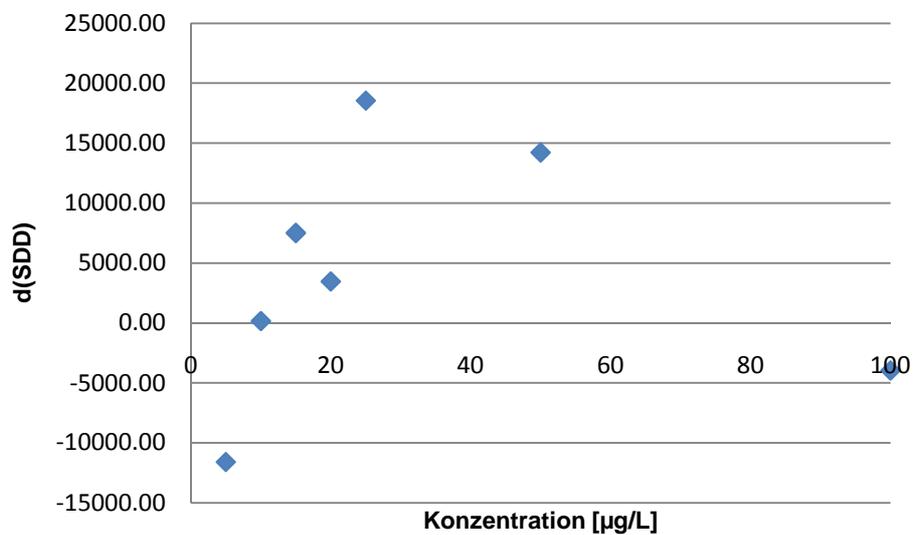


Abb. 169: Residualanalyse: Sulfadimidin (Sulfamethazin)

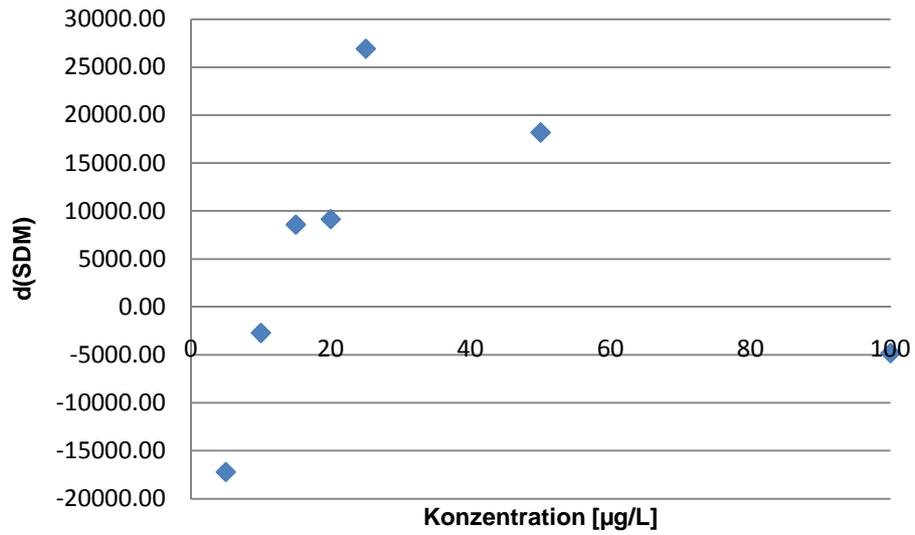


Abb. 170: Residualanalyse: Sulfadimethoxin

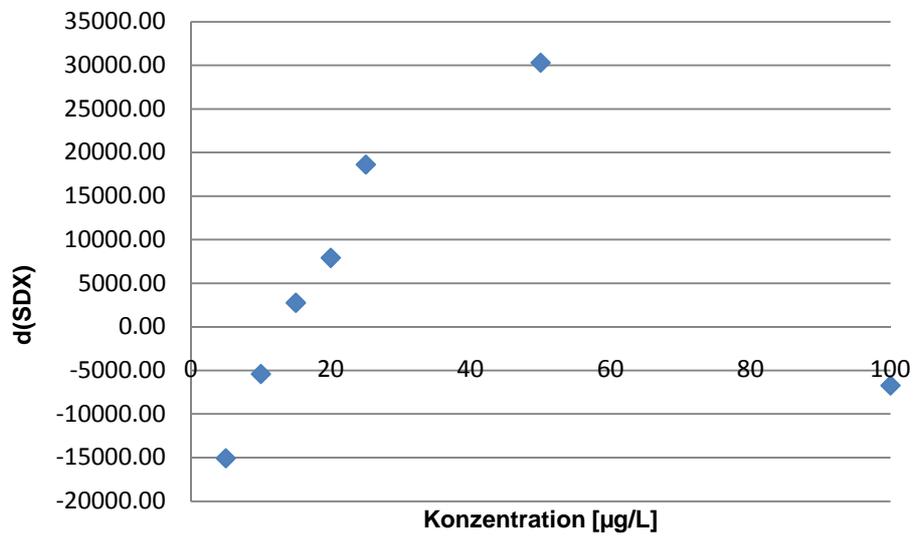


Abb. 171: Residualanalyse: Sulfadoxin

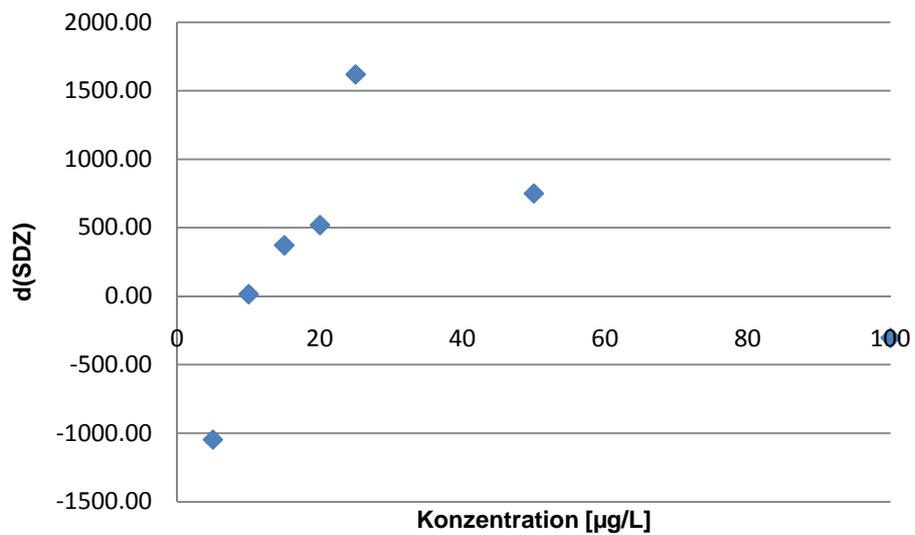


Abb. 172: Residualanalyse: Sulfadiazin

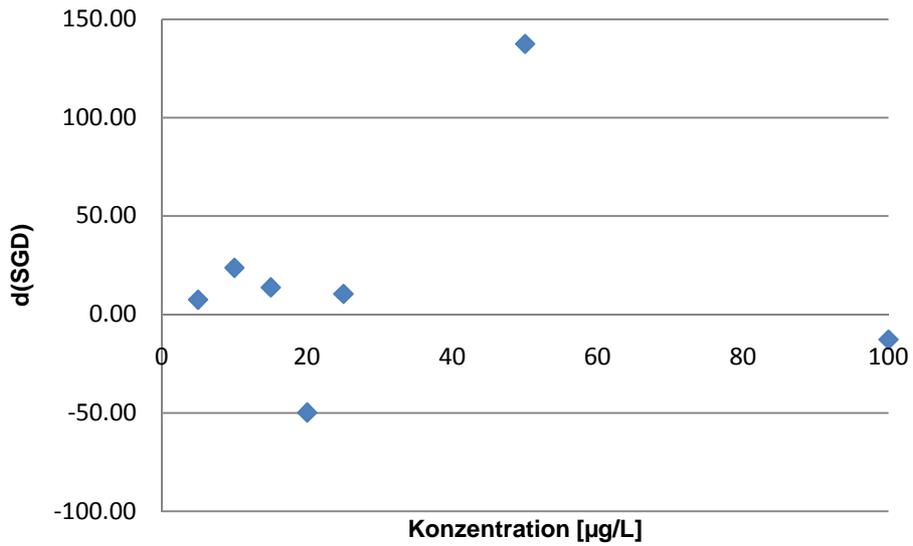


Abb. 173: Residualanalyse: Sulfaguanidin

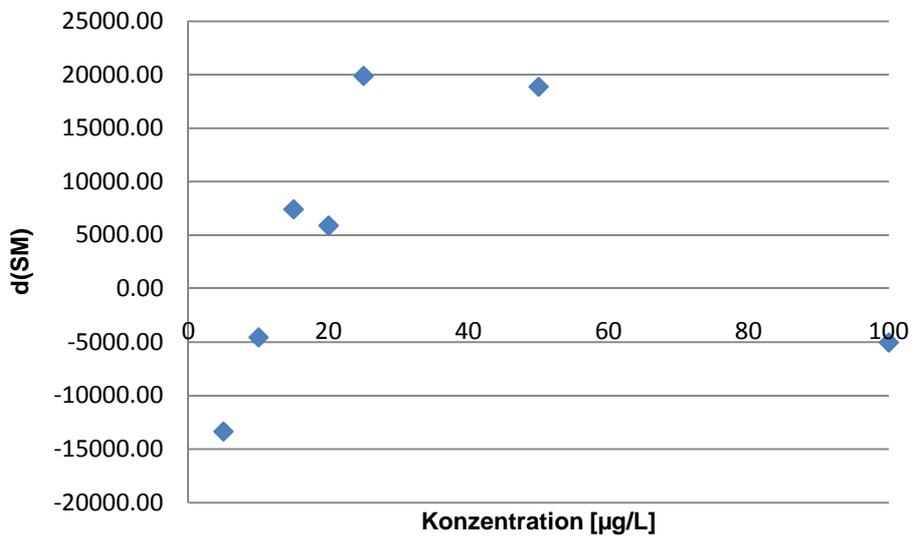


Abb. 174: Residualanalyse: Sulfameter

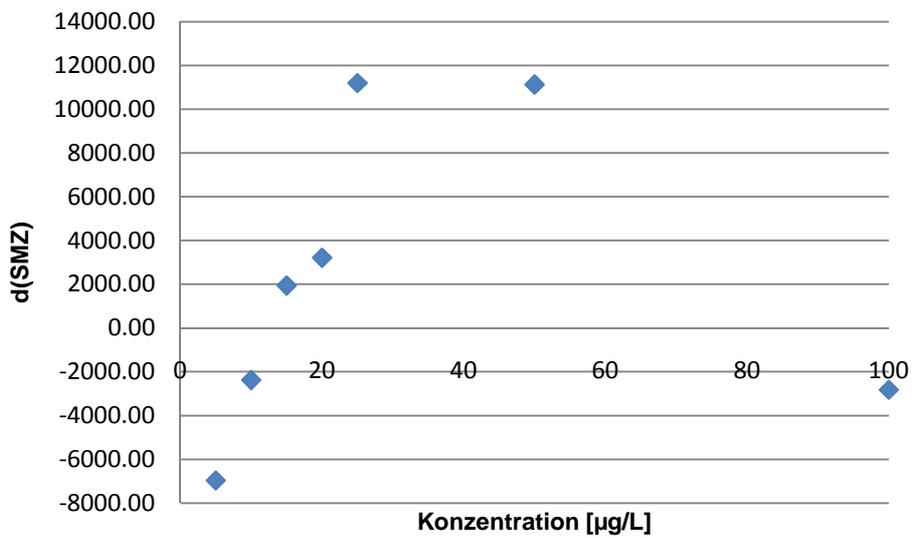


Abb. 175: Residualanalyse: Sulfamerazin

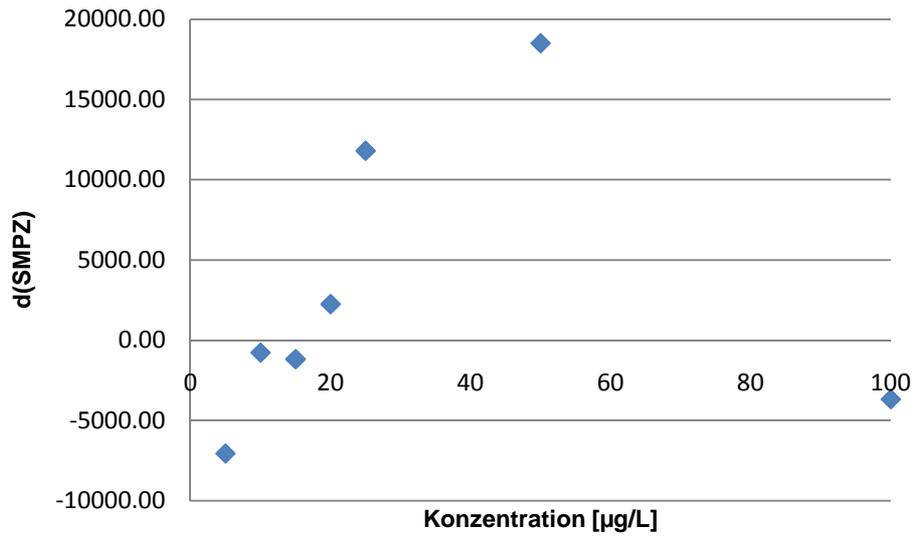


Abb. 176: Residualanalyse: Sulfamethoxyypyridazin

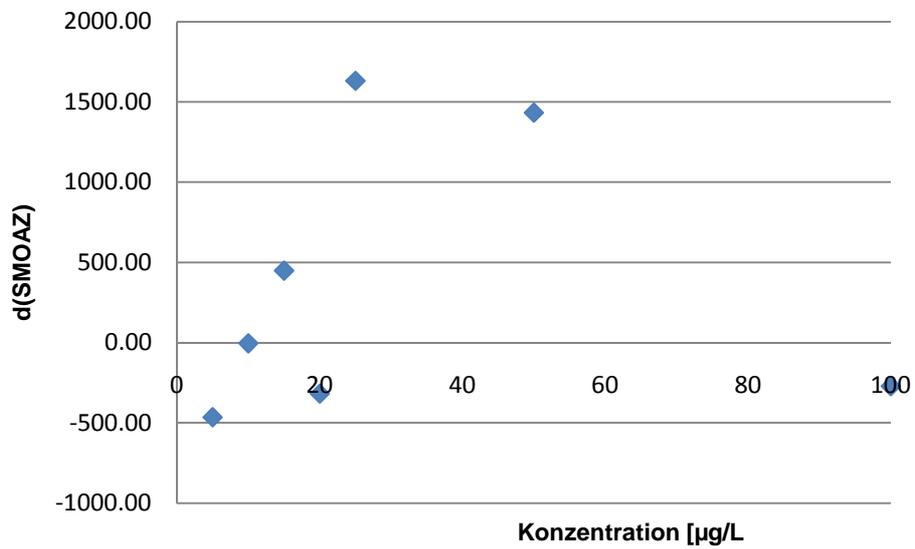


Abb. 177: Residualanalyse: Sulfamethoxazol

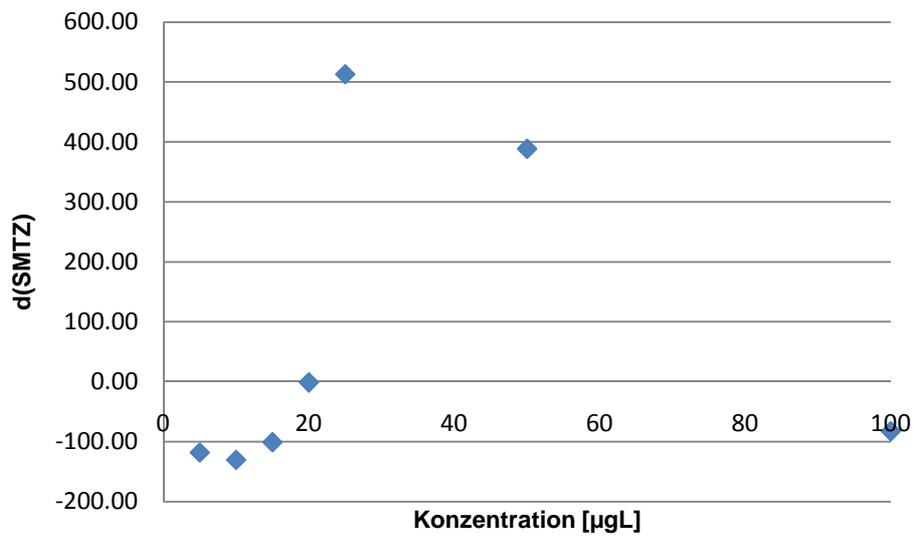


Abb. 178: Residualanalyse: Sulfamethizol

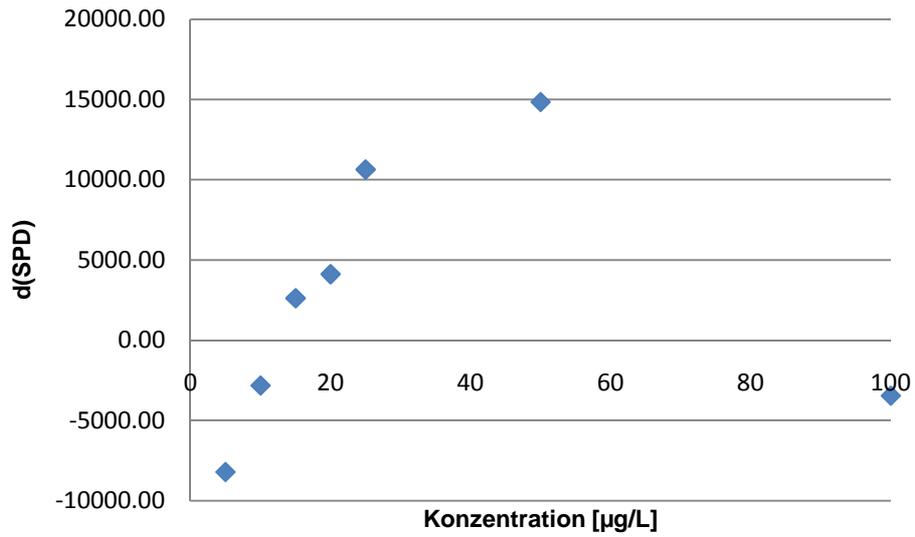


Abb. 179: Residualanalyse: Sulfapyridin

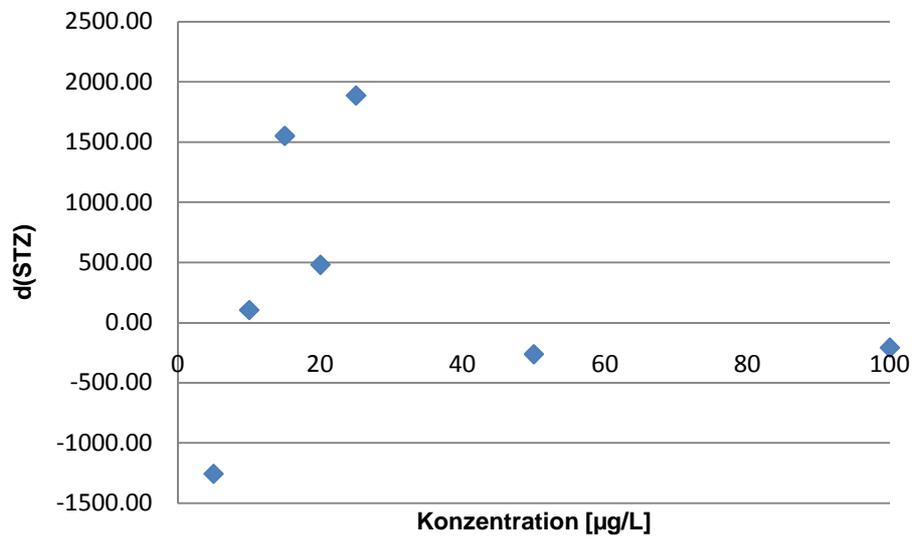


Abb. 180: Residualanalyse: Sulfathiazol

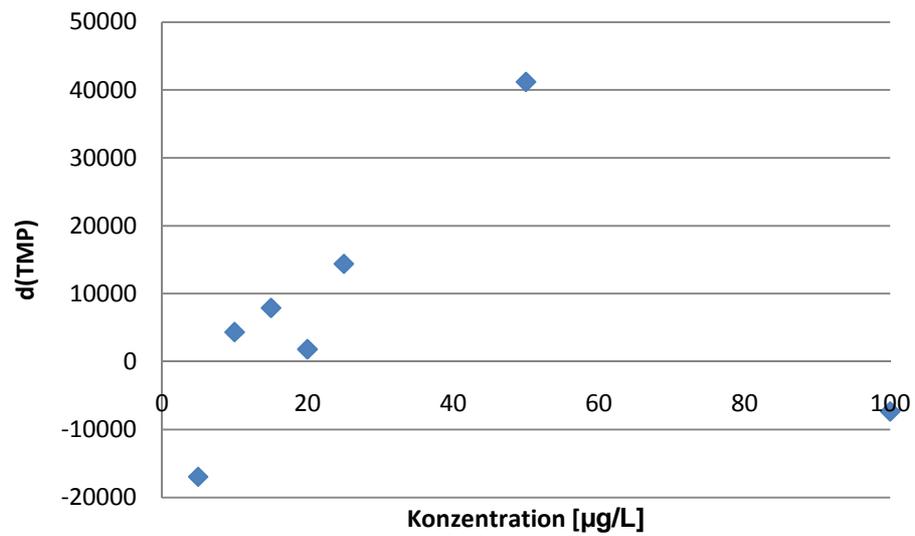


Abb. 181: Residualanalyse: Trimethoprim

Chloramphenicol:

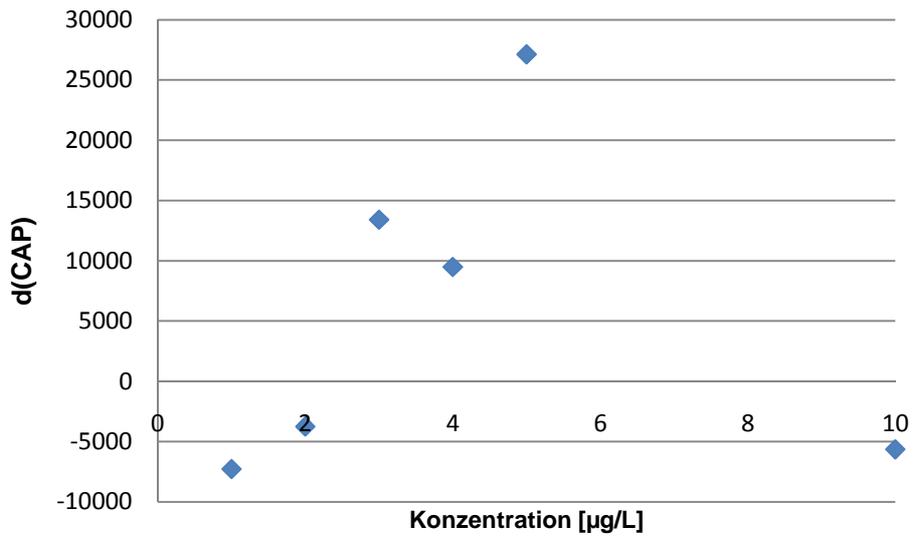


Abb. 182: Residualanalyse: Chloramphenicol

Nitrofurantololmetabolite:

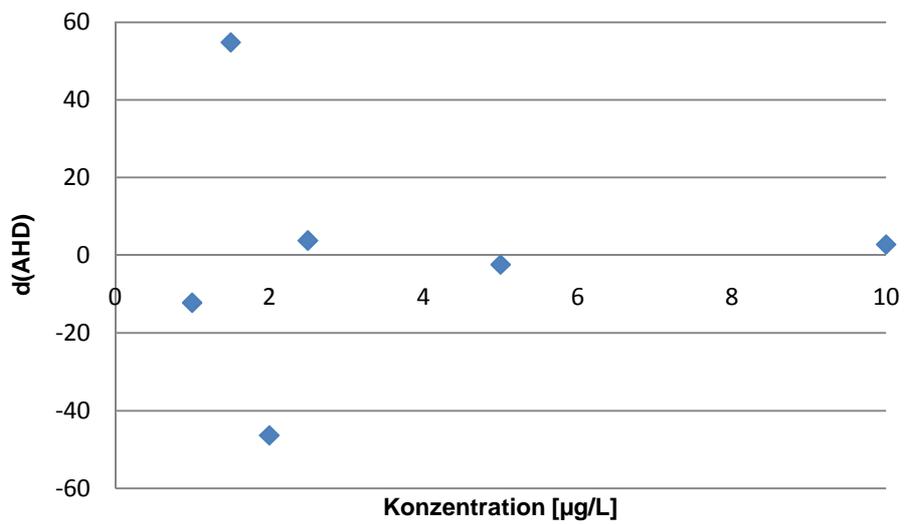


Abb. 183: Residualanalyse: AHD

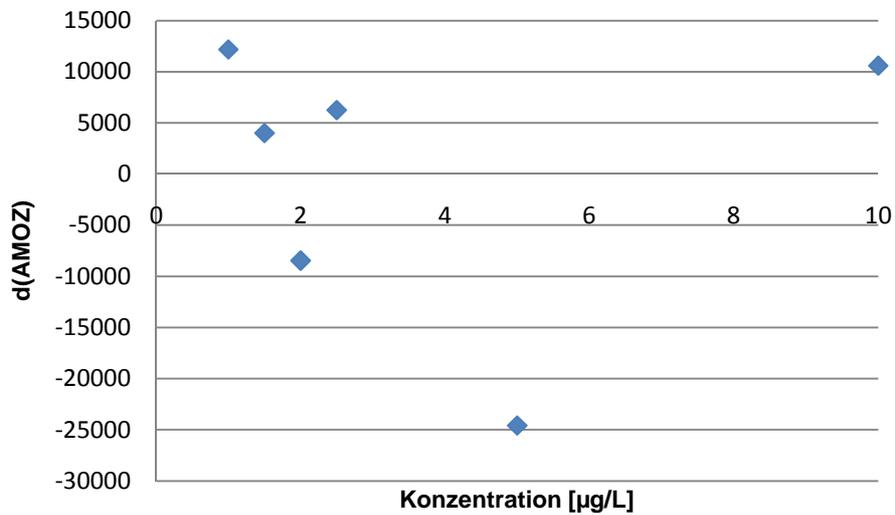


Abb. 184: Residualanalyse: AMOZ

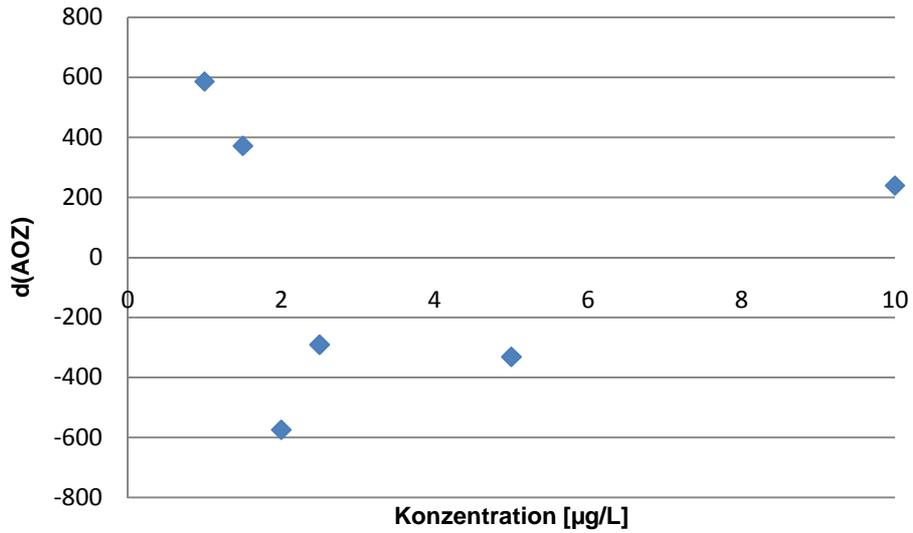


Abb. 185: Residualanalyse: AOZ

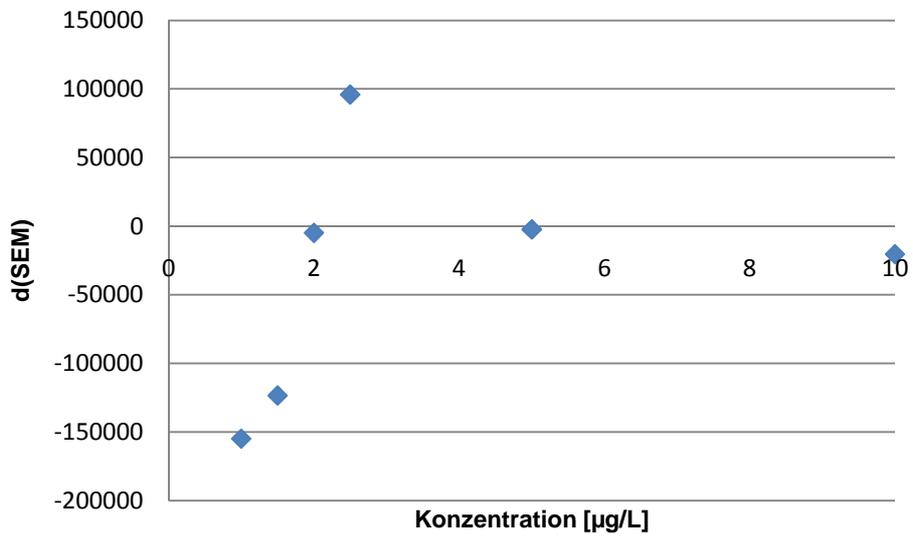


Abb. 186: Residualanalyse: SEM

Fluorchinolone:

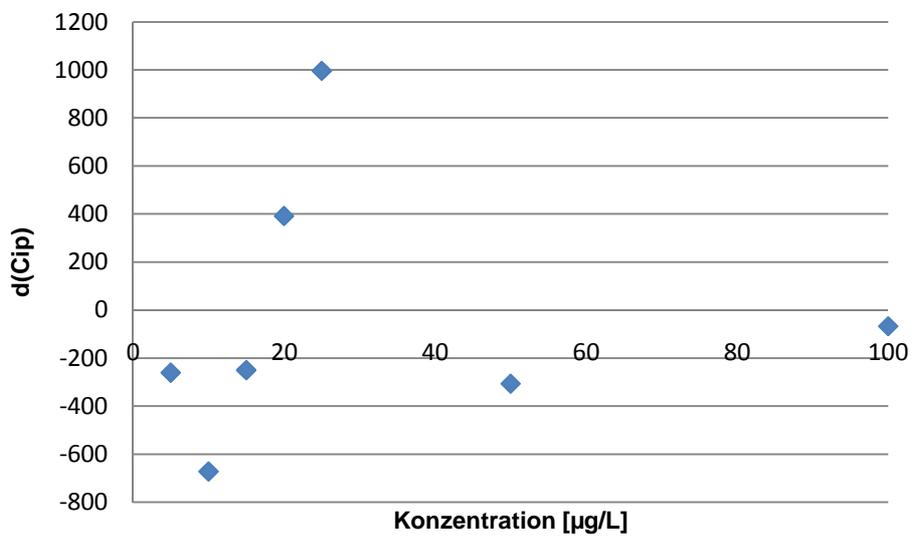


Abb. 187: Residualanalyse: Ciprofloxacin

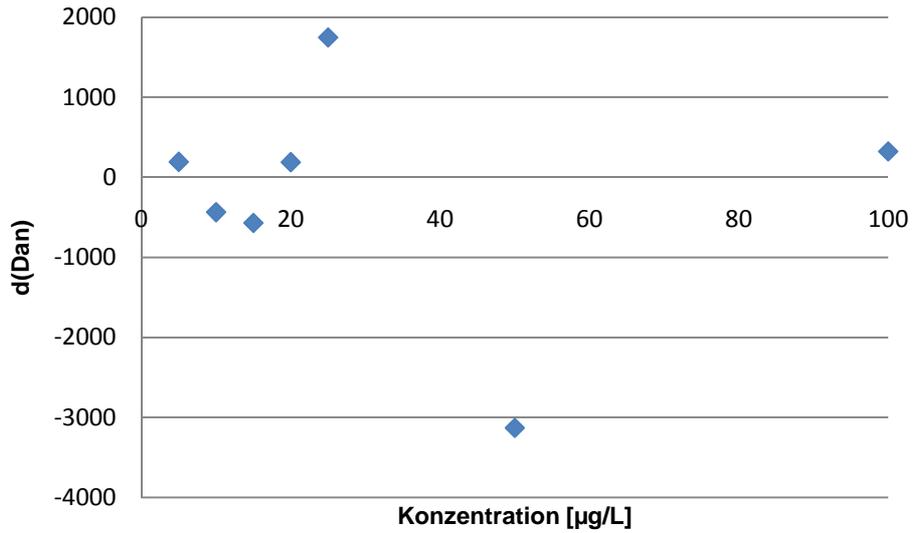


Abb. 188: Residualanalyse: Danofloxacin

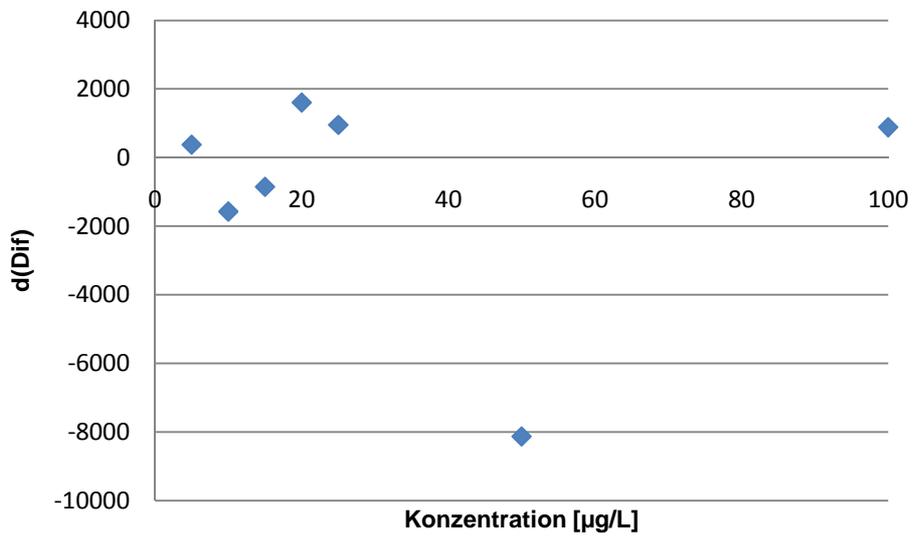


Abb. 189: Residualanalyse: Difloxacin

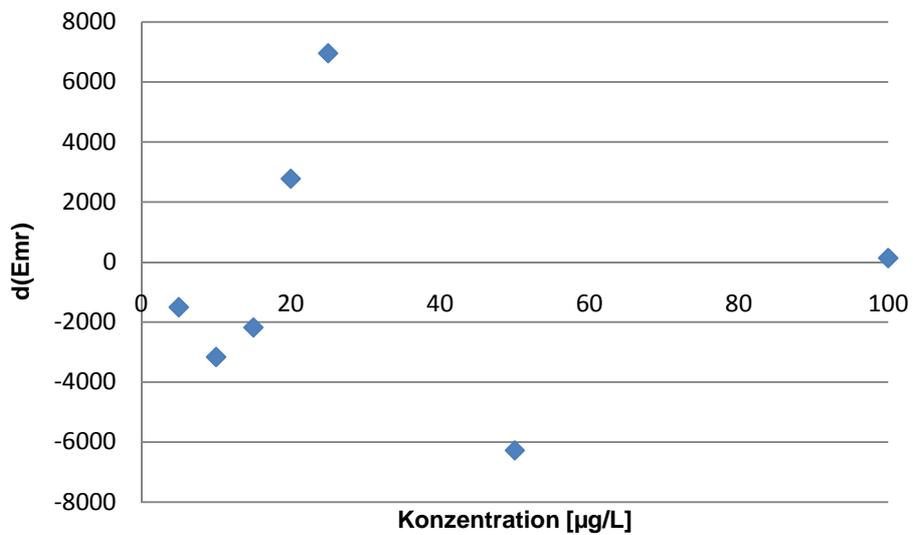


Abb. 190: Residualanalyse: Enrofloxacin

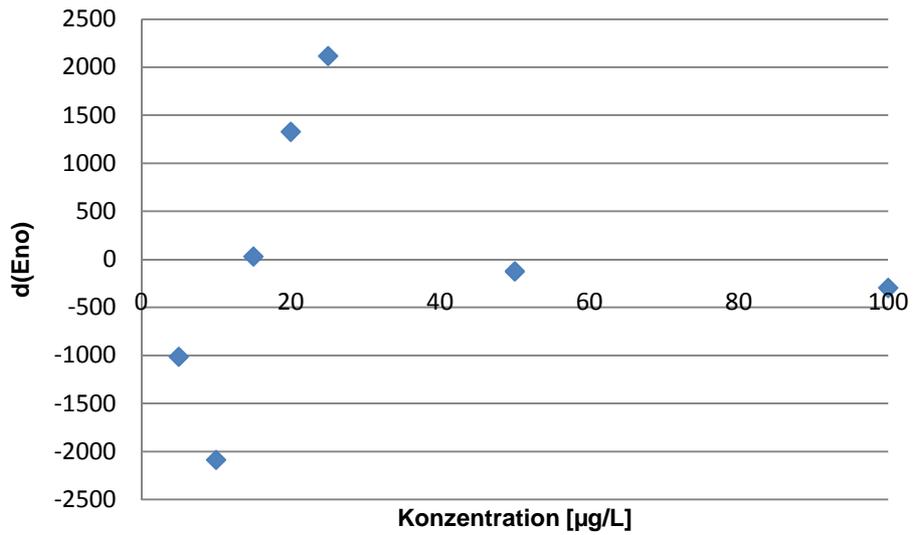


Abb. 191: Residualanalyse: Enoxacin

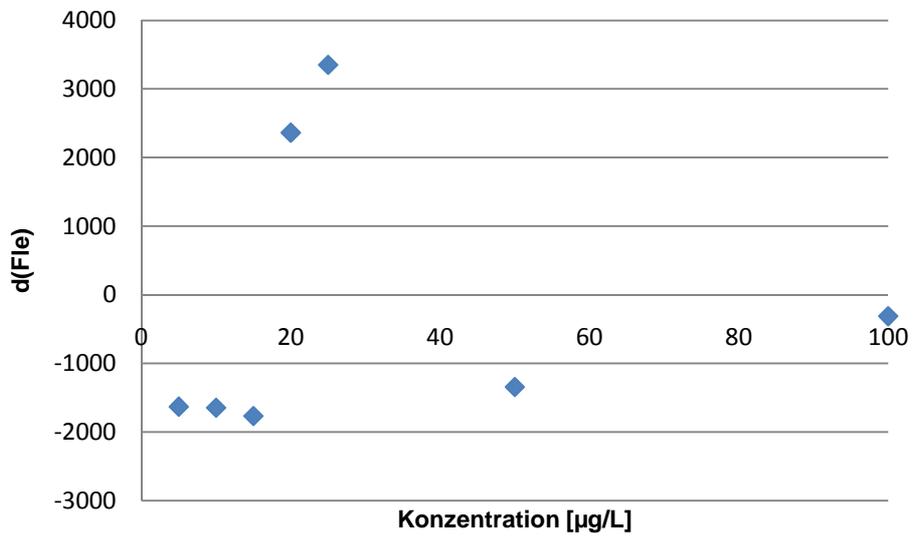


Abb. 192: Residualanalyse: Fleroxacin

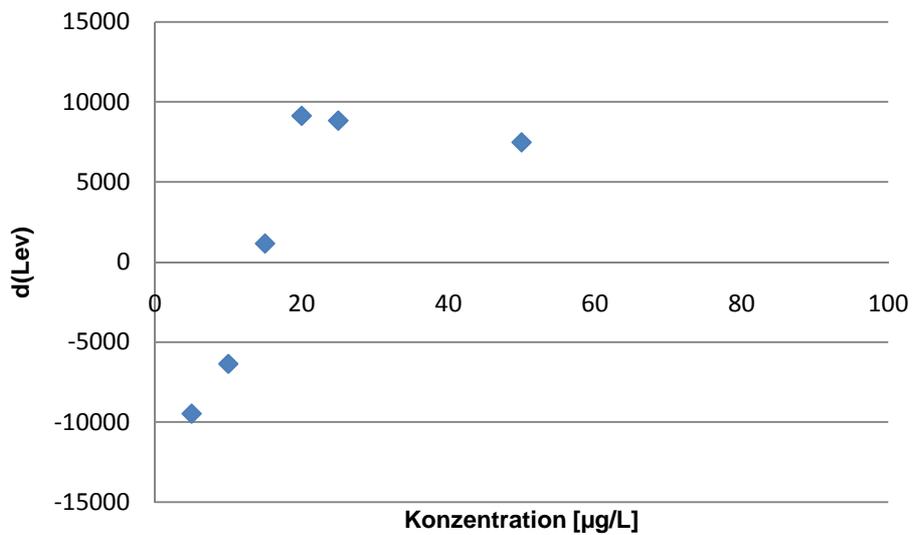


Abb. 193: Residualanalyse: Levofloxacin

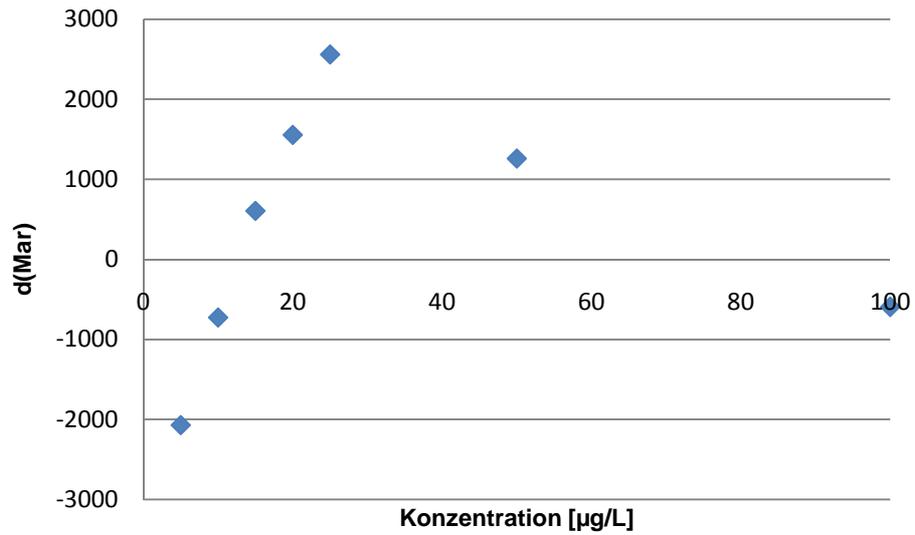


Abb. 194: Residualanalyse: Marbofloxacin

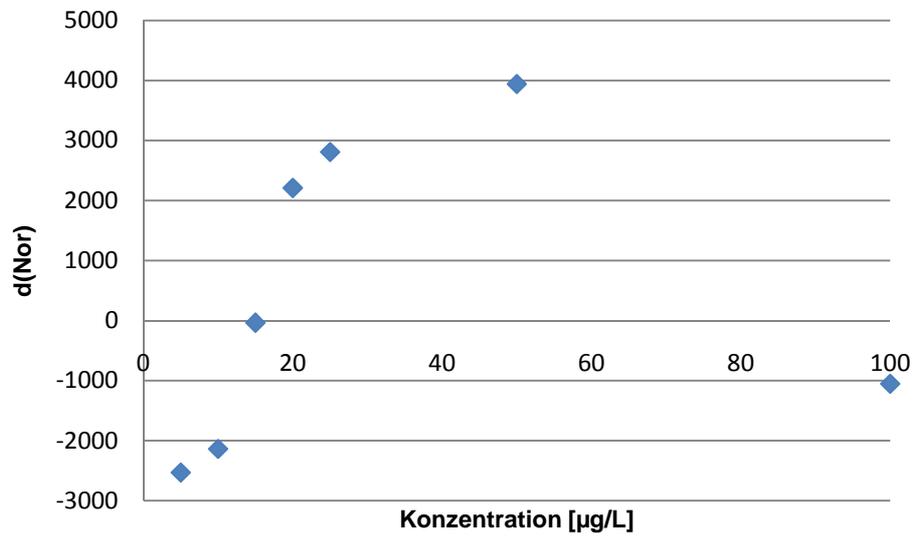


Abb. 195: Residualanalyse: Norfloxacin

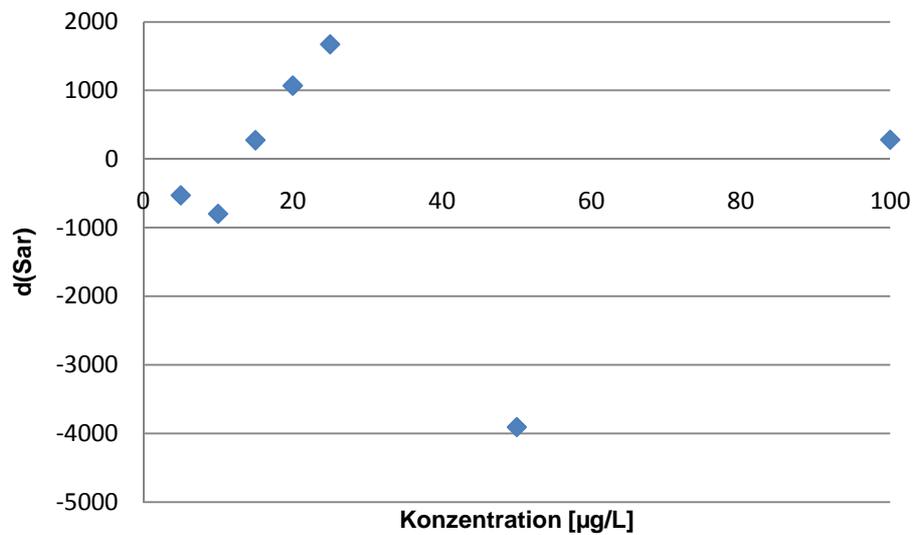


Abb. 196: Residualanalyse: Sarafloxacin

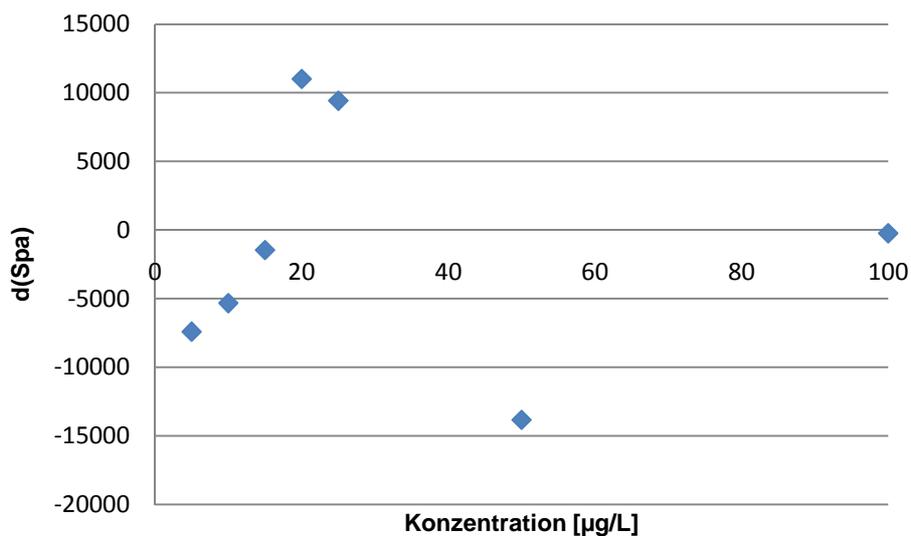


Abb. 197: Residualanalyse: Sparfloxacin

A 3.5 Verfahrenskennndaten

Tab. 53: Tetracycline: Absolute Standardabweichung, Verfahrensstandardabweichung und Variationskoeffizient (Arbeitsbereich: 10-100 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3)

Abk.	s_y [Flächeneinheiten]	s_{x_0} [µg/L]	V_{x_0} [%]
α-Apo-OTC	808,78	1,58	4,28 %
β-Apo-OTC	1666,12	2,54	6,88 %
ATC	2368,80	1,55	4,21 %
Epi-ATC	1655,19	1,09	2,95 %
ACTC	3720,41	2,56	6,94 %
Epi-ACTC	4432,82	3,24	8,79 %
DC	2081,56	1,31	3,56 %
Epi-DC	2718,10	1,25	3,40 %
DMC	989,75	1,11	3,00 %
Epi-DMC	1583,36	1,50	4,07 %
CTC	586,53	1,35	3,66 %
Iso-CTC	1847,60	1,07	2,90 %
Epi-Iso-CTC	604,77	4,06	11,01 %
Epi-Enol-CTC	734,77	1,75	4,73 %
Epi-Keto-CTC	763,42	2,13	5,78 %
MeTC	2268,56	1,40	3,79 %
OTC	265,56	1,93	5,22 %
Epi-OTC	580,71	1,86	5,05 %
TC	1461,62	1,84	4,98 %
Epi-TC	1645,40	1,65	4,46 %

Tab. 54: Sulfonamide und Trimethoprim: Absolute Standardabweichung, Verfahrensstandardabweichung und Variationskoeffizient (Arbeitsbereich: 10-100 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3)

Abk.	s_y [Flächeneinheiten]	s_{x_0} [µg/L]	V_{x_0} [%]
SCPD	384,15	1,50	4,06 %
SDD	10487,37	2,34	6,33 %
SDM	15094,15	2,05	5,56 %
SDX	14346,46	5,36	14,53 %
SDZ	1347,83	2,41	6,52 %
SGD	236,88	2,18	5,91 %
SM	15061,37	4,18	11,32 %
SMZ	6310,27	2,82	7,64 %
SMOPD	12637,55	3,87	10,49 %
SMOAZ	1003,86	1,72	4,66 %
SMTZ	322,08	2,31	6,25 %
SPD	7587,35	2,74	7,42 %
STZ	1709,10	1,89	5,13 %
TMP	18574,83	1,58	4,28 %

Tab. 55: Chloramphenicol: Absolute Standardabweichung, Verfahrensstandardabweichung und Variationskoeffizient (Arbeitsbereich: 1-10 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3)

Abk.	s_y [Flächeneinheiten]	s_{x_0} [µg/L]	V_{x_0} [%]
CAP	19520,87	1,47	34,65 %

Tab. 56: Nitrofurantolmetabolite: Absolute Standardabweichung, Verfahrensstandardabweichung und Variationskoeffizient (Arbeitsbereich: 1-10 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3)

Abk.	s_y [Flächeneinheiten]	s_{x_0} [µg/L]	V_{x_0} [%]
AHD	99,60	0,51	12,00 %
AMOZ	11545,55	0,23	5,42 %
AOZ	522,11	0,28	6,64 %
SEM	130312,03	3,24	71,81 %

Tab. 57: Makrolide: Absolute Standardabweichung, Verfahrensstandardabweichung und Variationskoeffizient (Arbeitsbereich: 10-100 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3)

Abk.	s_y [Flächeneinheiten]	s_{xo} [µg/L]	V_{xo} [%]
Cip	1359,02	1,30	3,51 %
Dan	3996,03	1,75	4,74 %
Dif	5900,00	1,07	2,91 %
Enr	11383,96	1,44	3,91 %
Eno	2980,22	1,28	3,47 %
Fle	4889,84	1,47	3,98 %
Lev	25121,12	3,36	9,12 %
Mar	2615,33	1,65	4,47 %
Nor	2773,62	1,72	4,65 %
Sar	4815,70	1,70	4,61 %
Spa	56031,35	3,54	9,59 %

A 3.6 NWG, BG, cc_α und cc_β

Tab. 58: Tetracycline: Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Nachweisvermögen und Erfassungsgrenze (Arbeitsbereich: 10-100 $\mu\text{g/L}$, 7 Konzentrationsstufen, $n=3$; cc_α und cc_β auf Basis der Standardabweichung von drei dotierten Honigen berechnet (10 $\mu\text{g/kg}$))

Abk.	NWG [$\mu\text{g/kg}$]	BG [$\mu\text{g/kg}$]	cc_α [$\mu\text{g/kg}$]	cc_β [$\mu\text{g/kg}$]
α -Apo-OTC	2,36	7,82	1,70	2,79
β -Apo-OTC	3,79	12,49	3,04	4,99
ATC	2,32	7,69	1,08	1,77
Epi-ATC	1,63	3,26	0,82	1,34
ACTC	3,82	12,61	0,75	1,23
Epi-ACTC	4,85	15,91	0,99	1,62
DC	1,96	6,51	0,05	0,09
Epi-DC	1,88	6,22	0,51	0,83
DMC	1,66	5,50	0,50	0,82
Epi-DMC	2,25	7,44	0,76	1,24
CTC	2,00	6,70	0,99	1,63
Iso-CTC	1,60	5,31	0,37	0,60
Epi-Iso-CTC	6,08	19,87	0,12	0,20
Epi-Enol-CTC	2,61	8,64	0,50	0,83
Epi-Keto-CTC	3,19	10,52	0,46	0,75
MeTC	2,09	6,94	0,17	0,28
OTC	2,88	9,52	1,09	1,78
Epi-OTC	2,79	9,21	0,44	0,72
TC	2,75	9,09	1,25	2,04
Epi-TC	2,46	8,14	1,15	1,89

Tab. 59: Sulfonamide und Trimethoprim: Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Nachweisvermögen und Erfassungsgrenze (Arbeitsbereich: 10-100 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3; cc_α und cc_β auf Basis der Standardabweichung von drei dotierten Honigen berechnet (10 µg/kg); Werte für SGD, SMZ, SMOAZ und STZ bei 50 µg/kg berechnet)

Abk.	NWG [µg/kg]	BG [µg/kg]	cc_α [µg/kg]	cc_β [µg/kg]
SCPD	2,24	7,42	3,45	5,67
SDD	3,50	11,53	1,26	2,06
SDM	3,07	10,13	0,39	0,64
SDX	8,02	26,10	1,42	2,33
SDZ	3,60	11,85	4,22	6,91
SGD	3,26	10,76	5,73	9,40
SM	6,25	20,41	4,29	7,04
SMZ	4,21	13,86	4,91	8,06
SMOPD	5,79	18,93	1,91	3,13
SMOAZ	2,57	8,51	9,91	16,25
SMTZ	3,45	11,38	7,64	12,53
SPD	4,10	13,48	1,18	1,94
STZ	2,83	9,35	9,27	15,20
TMP	2,36	7,83	2,33	3,82

Tab. 60: Chloramphenicol: Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Nachweisvermögen und Erfassungsgrenze (Arbeitsbereich: 1-10 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3; cc_α und cc_β auf Basis der Standardabweichung von drei dotierten Honigen berechnet (1 µg/kg))

Abk.	NWG [µg/kg]	BG [µg/kg]	cc_α [µg/kg]	cc_β [µg/kg]
CAP	2,28	7,39	0,13	0,22

Tab. 61: Nitrofurantolmetabolite: Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Nachweisvermögen und Erfassungsgrenze (Arbeitsbereich: 1-10 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3; cc_α und cc_β auf Basis der Standardabweichung von drei dotierten Honigen berechnet (1 µg/kg))

Abk.	NWG [µg/kg]	BG [µg/kg]	cc_α [µg/kg]	cc_β [µg/kg]
AHD	0,79	2,55	0,11	0,18
AMOZ	0,35	1,14	0,04	0,06
AOZ	0,43	1,40	0,08	0,13
SEM	5,16	21,81	0,09	0,14

Tab. 62: Makrolide: Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Nachweisvermögen und Erfassungsgrenze (Arbeitsbereich: 10-100 µg/L, 7 Konzentrationsstufen, n=3; cc_{α} und cc_{β} auf Basis der Standardabweichung von drei dotierten Honigen berechnet (10 µg/kg) Werte für Dif, Spa und Mar bei 50 µg/kg berechnet, für Sar aufgrund von Matrixinterferenzen keine Berechnung möglich)

Abk.	NWG [µg/kg]	BG [µg/kg]	cc_{α} [µg/kg]	cc_{β} [µg/kg]
Cip	1,94	6,42	1,81	2,98
Dan	2,62	8,65	1,72	2,83
Dif	1,60	5,33	38,09	62,47
Enr	2,16	7,15	1,17	1,91
Eno	1,91	6,35	2,33	3,65
Fle	2,20	7,28	1,46	2,39
Lev	5,03	16,50	2,30	3,77
Mar	2,47	8,17	4,78	7,84
Nor	2,57	8,49	3,71	6,09
Sar	2,55	8,42	-	-
Spa	5,29	17,33	22,84	37,45

A 3.7 Wiederfindung**Tab. 63:** Tetracycline: Mittelwert der Wiederfindung in Prozent (Dotierte Honige 5 µg/kg, 10 µg/kg, 25 µg/kg und 50 µg/kg wurden jeweils dreimal vorbereitet und analysiert; Quantifizierung erfolgt gegen einen matrixkalibrierten Mischstandard 10 µg/kg)

Abk.	Wiederfindung [%]
α-Apo-OTC	28,3
β-Apo-OTC	17,7
ATC	82,8
Epi-ATC	36,9
ACTC	119,1
Epi-ACTC	94,9
DC	100,5
Epi-DC	102,9
DMC	100,3
Epi-DMC	70,1
CTC	111,5
Iso-CTC	69,1
Epi-Iso-CTC	125,4
Epi-Enol-CTC	62,9
Epi-Keto-CTC	92,9
MeTC	98,9
OTC	93,1
Epi-OTC	60,5
TC	85,2
Epi-TC	86,2

Tab. 64: Sulfonamide und Trimethoprim: Mittelwert der Wiederfindung in Prozent (Dotierter Honig 50 µg/kg wurden jeweils dreimal vorbereitet und analysiert; Quantifizierung erfolgt gegen einen matrixkalibrierten Mischstandard 50 µg/kg)

Abk.	Wiederfindung [%]
SCPD	104,5
SDD	107,4
SDM	96,1
SDX	100,5
SDZ	104,8
SGD	91,1
SM	97,6
SMZ	96,2
SMOPD	116,4
SMOAZ	115,8
SMTZ	123,2
SPD	105,5
STZ	106,1
TMP	96,9

Tab. 65: Chloramphenicol: Mittelwert der Wiederfindung in Prozent (Dotierter Honig 0,5 µg/kg wurde jeweils dreimal vorbereitet und analysiert; Quantifizierung erfolgt gegen eine externe Standardlösung 1 µg/L)

Abk.	Wiederfindung [%]
CAP	89,5

Tab. 66: Nitrofurantolinderivate: Mittelwert der Wiederfindung in Prozent (Dotierte Honige 0,5 µg/kg, 1,0 µg/kg, 2,5 µg/kg und 5,0 µg/kg wurden jeweils dreimal vorbereitet und analysiert; Quantifizierung erfolgt gegen einen matrixkalibrierten Mischstandard 1,0 µg/kg)

Abk.	Wiederfindung [%]
AHD	91,7
AMOX	97,5
AOZ	95,4
SEM	92,8

Tab. 67: Makrolide: Mittelwert der Wiederfindung in Prozent (Dotierter Honig, 10 µg/kg wurde jeweils dreimal vorbereitet und analysiert; Quantifizierung erfolgt gegen einen matrixkalibrierten Mischstandard 10 µg/kg; Werte für Dif, Spa und Mar bei 50 µg/kg berechnet, für Sar aufgrund von Matrixinterferenzen keine Berechnung möglich)

Abk.	Wiederfindung [%]
Cip	103,8
Dan	99,9
Dif	117,4
Enr	102,6
Eno	88,3
Fle	97,2
Lev	93,8
Mar	97,5
Nor	107,2
Sar	-
Spa	113,1